



**AMYGDALIN'IN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK
VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ**

Esra ERİKEL

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- 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 çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra ERİKEL

02/08/2021

AMYGDALIN'İN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Esra ERİKEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2021

ÖZET

Amygdalin kayısı, şeftali, acı badem, erik ve elma gibi *Rosaceae* familyasına ait bitki tohumlarının ana bileşenidir. Kanserin önlenmesi, ateş düşürücü ve öksürüğü giderici gibi farklı farmakolojik özelliklerinden dolayı alternatif tıpta kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Amygdalin'in insan periferik lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkileri metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda ve varlığında değerlendirilmiştir. Bu amaçla kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılmıştır. S9 karışım içermeyen deneylerde, Amygdalin'in antigenotoksik aktivitesi, Mitomisin-C (MMC) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2) karşı üç antigenotoksisite protokolü olan ön-, eş ve geç zamanlı muameleler kullanılarak araştırılmıştır. Lenfositlere, Amygdalin'in farklı konsantrasyonları (0,68; 1,72; 3,43; 6,86 ve 13,75 $\mu g/mL$) tek başına ve MMC (0,20 $\mu g/mL$) ve H_2O_2 (100 μM) ile birlikte uygulanmıştır. S9 karışım varlığında antigenotoksisite değerlendirmesi Siklofosfamid'e (SF) karşı eş zamanlı muamele protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amygdalin, S9 karışım yokluğunda ve varlığında test edilen hiçbir konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermemiştir. Diğer yandan, Amygdalin tüm muamele tipleri ve tüm konsantrasyonda MMC'nin neden olduğu kromozomal sapmaları (özellikle 48 saatte), KKD ve MN frekanslarını (ön ve eş zamanlı muamelede 0,86 $\mu g/mL$ hariç) önemli ölçüde azaltmıştır. Ek olarak, Amygdalin SF ile indüklenen KA ve KKD frekanslarını en düşük konsantrasyon (0,86 $\mu g/mL$) dışında diğer tüm konsantrasyonlarda önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, Amygdalin genotoksinler (MMC ve SF) tarafından büyük ölçüde azaltılan Mİ'yi artırmış, ancak Rİ ve NBİ'yi önemli ölçüde etkilememiştir. Comet testinde, Amygdalin tüm konsantrasyonlarda ve tüm muamele türlerinde H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuçlar, Amygdalin'in test edilen konsantrasyonlarda genotoksik olmadığını ve antigenotoksik bir etki sergilediğini göstermiştir. Amygdalin *in vitro* insan lenfositlerinde genomik hasarı teşvik eden genotoksik ajanlara karşı kemopreventif aktivite sergilemiştir.

Bilim Kodu : 20316

Anahtar Kelimeler : Amygdalin, Genotoksisite, Antigenotoksisite, Kromozomal anormallikler, Kardeş kromatid değişimleri, Mikronükleus, Comet

Sayfa Adedi : 196

Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF AMYGDALIN IN IN VITRO
HUMAN LYMPHOCYTES

(Ph. D. Thesis)

Esra ERİKEL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2021

ABSTRACT

Amygdalin is a major component of the seeds of *Rosaceae* family of plants such as especially apricots, peaches, bitter almond, plum, and apple. It is used in alternative medicine due to its different pharmacological properties including cancer prevention, fever reducer and cough suppressant. In the present study, *in vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of Amygdalin have been evaluated in human peripheral lymphocytes in the absence and presence of metabolic activator (S9 mix). For this purpose, chromosomal aberrations (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronucleus (MN), and comet assays were used. In experiments without S9 mix, the antigenotoxic activity of Amygdalin was investigated against the Mitomycin-C (MMC) and Hydrogen peroxide (H₂O₂) using three antigenotoxicity protocols, pre-, simultaneous and post-treatment. The lymphocytes were treated with different concentrations of Amygdalin (0.68, 1.72, 3.43, 6.86, and 13.75 µg/mL) alone and in combination with MMC (0.20 µg/mL) and H₂O₂ (100 µM). In the presence of S9 mix, antigenotoxicity assessment was performed against Cyclophosphamide (CP) using a simultaneous treatment protocol. Amygdalin did not show genotoxic effects at all concentrations tested, both in the absence and presence of S9 mix. On the other hand, Amygdalin significantly decreased chromosomal aberrations (especially at 48h), frequencies of KKD and MN (except 0.86 µg/mL in pre- and simultaneous treatment) induced by MMC in all treatment types and all concentrations. In addition, Amygdalin significantly reduced CP-induced CA and SCE frequencies at all concentrations except the lowest concentration (0.86 µg/mL). Also, Amygdalin enhanced MI which was reduced by genotoxins (MMC and CP) but it did not significantly effect RI and NBI. In comet assay, Amygdalin significantly reduced oxidative DNA damage induced by H₂O₂ at all concentrations and all treatment types. The results demonstrated that Amygdalin exhibited antigenotoxic effects but not genotoxic effect in tested concentrations. Amygdalin exhibited chemopreventive activity against genotoxic agents that promote genomic damage in human lymphocytes *in vitro*.

Science Code : 20316

Key Words : Amygdalin, Genotoxicity, Antigenotoxicity, Chromosomal aberrations, Sister chromatid exchanges, Micronucleus, Comet

Page Number : 196

Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca her konuda desteğini hiç esirgemeyen, sahip olduğu tecrübe, bilgi ve görüşleri ile bana yol gösteren, saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a ve tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen tez izleme komitesi üyesi hocam Prof. Dr. Serkan YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her konuda yardım sağlayan, çalışmalarımda destek olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ'a, manevi desteklerinden ötürü Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevgi ÜNAL KARAKUŞ ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Sevcan Mamur'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Beyza Merve YILDIZ ve Sabire BÜLBÜL'ün yanı sıra tüm lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım dahil olmak üzere her konuda yardımcı olan sevgili dostum Cemile ALPEREN'e, iş hayatımda bana her türlü kolaylığı sağlayan ve desteğini asla esirgemeyen sevgili ekip arkadaşım Dilek UZUN'a, her konuda destekçim olan Nazmiye ATASEVEN'e, mesafeleri aşarak desteklerini her şekilde bana ulaştıran can dostlarım Merve TULUNOĞLU ve Nihal ALAK'a ve onların nezdinde hayatıma katkı sağlayan tüm dostlarıma teşekkürü borç bilirim. Her şeyden önce hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini yanımda hissettiğim, bana insan olmanın hakikatini öğreten, varlıklarından onur ve gurur duyduğum annem Nefise ERİKEL ve babam Cemal ERİKEL'e, yardımsever kardeşlerim Osman Yunus ERİKEL ve Şeyma ERİKEL'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının bir kısmı TÜBİTAK tarafından 118Z574 no'lu proje kodu ile desteklenmiştir. Maddi yardımlarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser ve Küresel Yüğü	5
2.2. Karsinogenez.....	6
2.3. Genetik Toksisite ve Kanser ilişkisi.....	8
2.3.1. Kanser'in 'Genotoksik' ve 'Genotoksik Olmayan' mekanizmaları	10
2.3.2. Karsinojen aracılı oksidatif stres	13
2.3.3. Antioksidan savunma sistemleri.....	15
2.4. Antigenotoksisite.....	17
2.5. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Değerlendirmelerinde Kullanılan Testler...	19
2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi.....	23
2.5.2. Kardeş kromatid değişim (KKD) testi.....	25
2.5.3. Mikronükleus (MN) testi	26
2.5.4. Comet testi	28
2.6. Tamamlayıcı, Alternatif ve Bütünleyici (İntegratif) Tıp.....	29
2.7. Kemoprevensiyon ve Önemi.....	30

	Sayfa
2.8. Bitki Metabolitleri	32
2.8.1. Allelokimyasallar.....	32
2.8.2. Bitki Toksinleri (Fitotoksinler).....	33
2.9. Siyanojenik Glikozitler	34
2.9.1. Amygdalin	36
2.9.2. Amygdalin'in metabolizması	37
2.9.3. Amygdalin'in toksik etkileri.....	39
2.9.4. Amygdalin'in anti-kanser tarihi.....	41
2.9.5 Amygdalin'in anti-kanser etkileri.....	44
2.9.6. Amygdalin'in genotoksik ve antigenotoksik etkileri.....	46
3. MATERYAL VE METOD	51
3.1. Materyal	51
3.1.1. Test materyalleri	51
3.2. Metod	55
3.2.1. Etkinliği test edilecek olan konsantrasyonların tespiti	55
3.2.2. Metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda insan periferik lenfositleri ile yapılan çalışmalar.....	56
3.2.3. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında insan periferik lenfositleri ile yapılan çalışmalar.....	66
3.2.4. Kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testlerine ait preparatların boyanması	69
3.2.5. Kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testlerine ait preparatların mikroskopik analizi	70
3.2.6. İstatistiksel analizler	72
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	75
4.1. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Kromozom Anormallik (KA) Testi Sonuçları.....	75
4.1.1. Genotoksisite değerlendirmesi	75

	Sayfa
4.1.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi	76
4.2. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişim (KKD) Testi Sonuçları	84
4.2.1. Genotoksisite değerlendirmesi	84
4.2.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi	85
4.3. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Mikronükleus (MN) Testi Sonuçları	92
4.3.1. Genotoksisite değerlendirmesi	92
4.3.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi	93
4.4. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Comet Testi Sonuçları	95
4.4.1. Genotoksisite değerlendirmesi	96
4.4.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi	96
4.5. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Varlığında Gerçekleştirilen Kromozomal Anormallik Testi Sonuçları	98
4.5.1. Genotoksisite değerlendirmesi	99
4.5.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi	99
4.6. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Varlığında Gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişim Testi Sonuçları	103
4.6.1. Genotoksisite değerlendirmesi	103
4.6.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi	103
5. TARTIşMA	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	149
KAYNAKLAR	153
ÖZGEÇMİş	193

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Doğal antioksidan maddeler	16
Çizelge 2.2. Genotoksik ve antigenotoksik ajanların tanımlanmasında kullanılan bazı testler.....	21
Çizelge 2.3. İnsanların gıdalarında bulunan önemli siyanojenik glikozitler ve bitkisel kaynakları.....	35
Çizelge 3.1. Amygdalin'e ait LD ₅₀ konsantrasyonları.....	55
Çizelge 4.1. Amygdalin muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları	76
Çizelge 4.2. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları	78
Çizelge 4.3. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları	81
Çizelge 4.4. Amygdalin muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) değerleri	85
Çizelge 4.5. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) değerleri	87
Çizelge 4.6. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon indeksi (Rİ), mitotik indeks (Mİ) değerleri.....	90
Çizelge 4.7. Amygdalin muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi.....	92
Çizelge 4.8. Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi.....	94
Çizelge 4.9. Amygdalin'in tek başına muamelesi sonucu izole insan periferal lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı	96
Çizelge 4.10. Amygdalin ve Amygdalin+H ₂ O ₂ muamelesi sonucu izole insan periferal lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı	97
Çizelge 4.11. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF uygulaması sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları	100

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF uygulaması sonucu insan periferel lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon ve mitotik indeks değerleri.....	104
Çizelge 4.13. Metabolik aktivatör yokluğunda insan periferel lenfosit kültüründe gerçekleştirilen 24 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi genel test sonuçları.....	107
Çizelge 4.14. Metabolik aktivatör yokluğunda insan periferel lenfosit kültüründe gerçekleştirilen 48 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi genel test sonuçları.....	108
Çizelge 4.15. Metabolik aktivatör yokluğunda izole insan lenfositlerinde gerçekleştirilen 1 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+H ₂ O ₂ muamelesi genel sonuçları	109
Çizelge 4.16. Metabolik aktivatör varlığında (S9 karışım) insan periferel lenfosit kültüründe gerçekleştirilen 3 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi genel test sonuçları.....	110

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser oluşumunun genel şekli	7
Şekil 2.2. Kanser gelişimi ve ilerleme sürecinde genetik ve epigenetik değişimler.....	11
Şekil 2.3. BrDU'nun katılımı ile kardeş kromatidlerde gelişen süreç	26
Şekil 2.4. Geri kalmış tüm bir kromozomun ve bir asentrik kromozom fragmentinin neden olduğu mikronükleus oluşumu.....	27
Şekil 2.5. Sentromerlerinden hücrenin zıt kutuplarına çekilen bir disentrik kromozomun neden olduğu nükleoplazmik köprü ve bu köprünün birden fazla noktada kırılması sonucu ortaya çıkan fragmentlerden meydana gelen mikronükleus oluşumu	27
Şekil 2.6. Siyanojenik glikozitlerin temel yapısı	34
Şekil 2.7. Amygdalin'in kimyasal yapısı ve özellikleri	37
Şekil 2.8. Amygdalin metabolizasyon yolağı	39
Şekil 2.9. Laetrile'nin kimyasal yapısı ve özellikleri	43
Şekil 3.1. Amygdalin'in yapısal formülü.....	52
Şekil 3.2. Mitomisin-C'nin yapısal formülü	52
Şekil 3.3. Siklofosamid'in yapısal formülü	53
Şekil 3.4. Hidrojen peroksit'in yapısal formülü.....	54
Şekil 3.5. Amygdalin'in genotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testi kültür ve preparasyon aşamaları	58
Şekil 3.6. Amygdalin'in antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testi kültür ve preparasyon aşamaları	59
Şekil 3.7. Amygdalin'in genotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan mikronükleus testi kültür ve preparasyon aşamaları.....	61
Şekil 3.8. Amygdalin'in antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan mikronükleus testi kültür ve preparasyon aşamaları.....	62
Şekil 3.9. Amygdalin'in genotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan comet testine ait aşamalar	64

Şekil	Sayfa
Şekil 3.10. Amygdalin'in antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan comet testine ait aşamalar.....	65
Şekil 3.11. Amygdalin'in metabolik aktivatör varlığında genotoksik ve antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişim testi kültür ve preparasyon aşamaları.....	68
Şekil 3.12. Kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testine ait preparatların boyanma aşamaları	70
Şekil 4.1. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi	79
Şekil 4.2. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik sayısı.....	79
Şekil 4.3. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi	82
Şekil 4.4. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik sayısı.....	82
Şekil 4.5. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimi frekansları	88
Şekil 4.6. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde gözlenen mitotik indeks değerleri.....	88
Şekil 4.7. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimi frekansları	91
Şekil 4.8. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde gözlenen mitotik indeks değerleri.....	91
Şekil 4.9. Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferall lenfositlerinde oluşan mikronükleus frekansı.....	95
Şekil 4.10. Amygdalin+H ₂ O ₂ muamelesi sonucunda izole insan periferall lenfositlerinde comet kuyruk yoğunluğu	97
Şekil 4.11. Amygdalin+H ₂ O ₂ muamelesi sonucunda izole insan periferall lenfositlerinde comet kuyruk momenti	98
Şekil 4.12. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi	101
Şekil 4.13. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik sayısı	101

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişim frekansları	105
Şekil 4.15. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen mitotik indeks değerleri	105

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler.....	83
Resim 4.2. a) Amygdalin ve b) Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferall lenfositlerde gözlenen kardeş kromatid değışimlerinden örnekler	92
Resim 4.3. Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferall lenfositlerde gözlenen mikronükleus içeren binükleat hücrelere örnekler...	95
Resim 4.4. Amygdalin ve Amygdalin+H ₂ O ₂ uygulamaları sonucunda izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarından örnekler	98
Resim 4.5. Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferall lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler	102
Resim 4.6. Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucu insan periferall lenfositlerde gözlenen kardeş kromatid değışimleri için örnek resim.....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg/mL	Mikrogram/ Mililitre
µL	Mikrolitre
µmol/L	Mikromol/litre
µM	Mikromolar
Fe	Demir
Cu	Bakır
LD ₅₀	Letal doz 50
mA	Miliamper
mg/kg	Miligram/kilogram
mL	Mililitre
mL/kg	Mililitre/kilogram
mM	milimolar
rpm	Devir sayısı
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklamalar
4-OHC	Hidroksisiklofosfamid
AF-2	2-2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) akrilamid
AO/EB	Akridin oranj/Etidyum bromür
B[a]P	Benzo[a]piren
BrdU	Bromodeoksiüridin
CHO	Çin hamsteri ovaryum hücreleri
CO ₂	Karbondioksit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

Con-A	Concanavalin-A
CONTAM	EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain
CrVI	Hekzavalent krom
Cyt-B	Sitokalsin B
DNA	Deoksiribonükleik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EST	Ehrlich solid tümör
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FM	Fosforamid mustard
GHS	Küresel Uyumlaştırma Sistemi
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HAA	Heterosiklik aromatik aminler
HBV	Hepatit B
HCOO-	Format
HCV	Hepatit C
HepG2	Hepatosellüler karsinom hücre hattı
HL-60	İnsan promiyelositik lösemi hücre hattı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HR	Homolog rekombinasyon
HCN	Hidrojen siyanür
JECFA	Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
KA	Kromozomal anormallik
KAT	Katalaz
KCl	Potasyum klorür
KKD	Kardeş kromatid değişimi
KSN	Potasyum siyanür
MDA	Malondialdehit
Mİ	Mitotik indeks

Kısaltmalar**Açıklamalar**

MMC	Mitomisin-C
MMS	Metil metansülfonat
MN	Mikronükleus
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
NCCIH	Ulusal Tamamlayıcı ve Bütünleyici Sağlık Merkezi
NO	Nitrik oksit
O₂⁻	Süperoksit radikali
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
OH•	Hidroksil radikali
PAH	Poliaromatik hidrokarbonlar
Rİ	Replikasyon indeksi
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROOH	Lipit hidroperoksitler
ROT	Reaktif oksijen türleri
S9	Karaciğer metabolik aktivatör
SAA	Acı kayısı çekirdeği (<i>Semen Armeniacae amarum</i>)
SCN-	Tiyosiyanat
SF	Siklofosfamid
SOD	Süperoksit dismutaz
TAT	Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp
TERC	Telomeraz RNA bileşeni
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b] indol
WHO/DSÖ	World Health Organization/Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kanser, büyüme ve bölünme özellikleri bakımından bozulmuş olan hücrelerin klonal olarak yayılması olarak bilinmektedir. En komplike somatik genetik hastalıklar içerisinde yer alan kanserin insidansı oldukça yüksektir (Yokuş ve Çakır, 2012). Günümüzde kanser, gelişmiş ekonomilere sahip ülkelerde önde gelen ölüm nedeniyken, gelişmekte olan ülkelerde ikinci ölüm nedenidir (Rahman, Iocca, Kufta ve Shanti, 2020). Dünya çapında kanserin görülme sıklığı ve ölüm oranları hızla yükselmektedir. Ne yazık ki bu yük yalnızca ölüm oranları ve vaka sayısında gözlenmemekte aynı zamanda da kanserin teşhis ve tedavisiyle ilişkili olarak ekonomik anlamda da maliyetli olmaktadır (Sung ve diğerleri, 2021).

Normalde genetik faktörlerin etkili olduğu kalıtsal bir hastalık olarak düşünülen kanserin oluşumunda, son yıllarda çevresel faktörlerin (kimyasal ve endüstriyel kanserojenler, enfeksiyonlar, tütün ve beslenme) daha etkili olduğu belirlenmiştir (Ruiz ve Hernández, 2016; Woźniak, Krajewski, Makuch ve Agrawal, 2021). Yapılan araştırmalara göre, hücre DNA'sında farklı mutasyonların oluşumuna neden olan bu çevresel ajanlar, karsinogenezin çok adımlı aşamalarına müdahil olmaktadır. Bu aşamaların ilki olan inisiyasyon evresinde, genotoksik hareket neticesinde hücre DNA'sında geri dönüşümsüz olarak onarılamayan bir hasar sonucu mutant bir 'başlangıç' hücresi ortaya çıkmaktadır. Özellikle, önemli genler veya kromozomlarda meydana gelen mutasyonlar, hücrenin bölünme oranını artırmakta ve hücre ölümü oranını azaltmaktadır. İnisiyasyon evresinde oluşan 'başlangıç' hücresinden türevlenerek gelişen ve ilerleyen çok evreli (inisiyasyon, promosyon ve progresyon) ve bir dizi karmaşık süreçler neticesinde ortaya çıkan transformasyon sonucu malign neoplazmi gelişmektedir. Kanser oluşumunun tüm bu süreçlerinde çeşitli genotoksik ve karsinojenik ajanların fonksiyon gösterebildikleri belirtilmektedir (Klaunig ve Wang, 2018; Malacarne ve diğerleri, 2021; Ma ve diğerleri, 2021).

Bugün insanlarda kanserogenezin başlatılması ve gelişiminde etkili olan ajanların büyük çoğunluğunun (%90) doğrudan veya ksenobiyotik metabolizmadan sonra DNA hasarına neden olan genotoksik karsinojenler olarak hareket ettiği bilinmektedir. Oldukça düşük konsantrasyonlarda dahi insanlar için kanser riski teşkil edebilen genotoksik karsinojenlerin bir kısmı, DNA ya da diğer hücresel bileşenlerle metabolik aktivasyondan bağımsız olarak doğrudan etkileşime girerken, bazıları metabolik aktivasyon bağımlı olup reaktif ara ürünlere metabolize olduktan sonra, genotoksik veya kanserojenik etki gösterirler. Her iki

türlü de kanserojenler hücresele düzeyde zararlı etkilerini ekzojen ya da metabolik olarak üretilen elektrofiller ve reaktif oksijen türleri (ROT) aracılığıyla sergilemektedirler (Barnes, Zubair, John, Poirier ve Martin, 2018; Rendic ve Guengerich, 2012). Klasik kanser tedavileri arasında yer alan kemoterapi ve radyoterapi hücre döngüsünü durduran ve kanser hücrelerini öldüren ajanların kullanımını içermektedir. Özellikle, kanser kemoterapisinde kullanılan sitotoksik kimyasalların ana hedeflerinin DNA olması, sadece malign hücrelerde değil aynı zamanda normal hücrelerde de büyük ölçüde DNA hasarları ve hücre ölümlerine yol açarak genotoksik strese neden olmaktadır. Örneğin, birçok kanserin tedavisinde kullanılan mitomisin-C (MMC) ve siklofosfamid (SF) gibi antineoplastik ajanların DNA'da çapraz bağlara neden olan DNA alkilleyici ara ürünler ve oksidatif stresi tetikleyebilen ROT üreterek genotoksik etkilere sebep oldukları ispatlanmıştır (Abdella, 2012; Maatouk ve diğerleri, 2018; Samarth ve diğerleri, 2018; Sassi ve diğerleri, 2021; Swift ve Golsteyn, 2014).

Aerobik metabolizma sonucu üretilen serbest radikaller, oksijen ve nitrojen köken alan reaktif oksijen (ROT) ve nitrojen türleri (RNT) olarak bilinmektedirler. Aslında, bu zararlı oksidan moleküllerin birçok önemli biyolojik süreçte olumlu görevleri bulunmaktadır. ROT düşük konsantrasyonlarda ve fizyolojik koşullarda homeostazın sürekliliğini sağlamak ve hücresele fonksiyonların düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Sharifi-Rad ve diğerleri, 2020). Biyolojik sistemlerde oksidatif hasarlara neden olan en önemli radikaller hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2). Bu genotoksik moleküller DNA başta olmak üzere lipitler, karbohidratlar ve proteinlere ciddi hasarlar vererek hücresele fonksiyonları bozabilmektedirler (Jelic, Mandic, Maricic ve Srdjenovic, 2021; Klaunig ve Wang, 2018). Öte yandan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik yapıdaki ve serbest radikal süpürücüler (E vitamini, ferritinler, farklı tioller ve diğerleri) gibi enzimatik yapıda olmayan hücre içi antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki denge hücresele homeostazı sürdürmeye yardımcı olmaktadır. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozularak endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması oksidatif stresin oluşumuna neden olmaktadır (Çelik ve Ayran, 2020; Kakehashi, Wei, Fukushima ve Wanibuchi, 2013).

Hücre içinde hareket eden ve radikal türleri nötrleştiren veya temizleyen antioksidan savunma sistemine ait bileşenlerin büyük bir kısmı dışarıdan beslenme yoluyla alınmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanların en geniş grubunu bitkiler içerisinde yer alan biyoaktif

fitobileşikler oluşturmaktadır (Ritchie ve Ko, 2021; Sharifi-Rad ve diğerleri, 2020). Bu doğal antioksidan fitobileşiklerin genotoksik stresi azaltarak antigenotoksik etki sergilediği bulunmuş, bu bağlamda anti-mutajenik ve de antikarsinojenik aktiviteleri de aydınlatılmıştır (Liu ve diğerleri, 2018; Słoczyńska, Powroźnik, Pękala ve Waszkielewicz, 2014).

Son dönemlerde insanları kanser gibi kronik hastalıklara karşı korumada başarılı olabilecek fitobileşiklere olan ilgi önemli boyutlarda artmış ve bu bileşikleri saptamak ve tanımlamak amacıyla birçok araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda en fazla yenilebilir bitkiler, tıbbi bitkiler ve toksik bir etkisi bulunmayan bitkiler kullanılarak ekstraksiyon işlemleri yapılmış ve birçok saf bileşik izole edilerek test edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2018). Güvenlik ve ekonomik kaygılar bakımından analiz edilen fitobileşiklerin veya bitki özütlerinin klinik öncesi genotoksik potansiyellerini saptayarak, antigenotoksik, animutajenik ve antikanserojen aktiviteleri bulunan bileşiklerin tanımlanması yeni kemopreventif stratejilerin geliştirilmesinde büyük bir önem taşımaktadır. Bu araştırmalarda genotoksisite testleri kullanılmakta olup, söz konusu değerlendirmeler hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gerçekleştirilmektedir (Di Stasi ve diğerleri; 2002; Sponchiado ve diğerleri, 2016; Tuentner, Creylman, Verheyen, Pieters ve Van Miert, 2020). Testlere ilişkin bilgi ve öneriler testlere ait adımları açıklayan Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) test kılavuzlarında sunulmaktadır. Genotoksik ve antigenotoksik etkilerin taranmasında genellikle memeli hücrelerinin (özellikle insan lenfositleri) kullanıldığı *in vitro* testler tercih edilmektedir. *In vitro* testlerin metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda ve varlığında gerçekleştirilmeleri standart bir uygulama haline gelmiştir. Bu sayede hem test edilen ana bileşiğin hem de metabolik enzimler aracılığıyla açığa çıkan metabolitlerinin toksikolojik potansiyelleri ölçülebilmektedir (Burlinson, 2012; Shao ve diğerleri, 2020). Kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri en sık kullanılan genotoksisite testleridir. Bu testlerden pozitif sonuçların elde edilmesi genotoksik etkiyi işaret ederken, bir genotoksin veya mutajenin artırdığı genetik hasarda gözlenen azalma ise antigenotoksik etkiyi ortaya koymaktadır.

Kanser tedavisinde en az yan etkinin yanında güçlü etkinliği olan yeni moleküllerin geliştirilmesi gerekliliği, bitkisel metabolitleri düşük sitotoksisite ve yüksek aktiviteleri nedeniyle yeni anti-kanser ilaç tasarımları ve hastalıkların tedavisi için iyi birer kaynak haline getirmiştir. Bitki türlerinin yenilebilir kısımlarında bulunan ve insanlar tarafından sıklıkla tüketilen bu bileşikler, son yıllarda alternatif tıp uygulaması olarak halk arasında da

kullanılmaya başlanmış ve besinsel takviye olarak rahatlıkla temin edilebilir hale gelmiştir (Kasali, Mtewa ve Tabakam, 2021: 31). Bu bileşiklerden biri olan Amygdalin, siyanojenik glikozitler grubuna dahil olan bir bitki toksinidir. Amygdalin, doğada *Rosaceae* bitki tohumlarında farklı oranlarda bulunan bir bileşik olmakla birlikte en fazla acı badem ve kayısı çekirdeğinde yer almaktadır. Amygdalin'in yarı sentetik formu olan Laetrile uzun yıllar antitümör ilacı olarak kullanılmıştır. Bugün Amygdalin kullanımı yalnızca birkaç ülke ile sınırlandırılrsa dahi özellikle alternatif tıpta bazı hasatalıkların tedavisinde tercih edilmektedir. Amygdalin 1970'lerde kanser hastaları arasında popülerlik kazanmış ve 21. yüzyılın başlarında bu bileşiğe ilgi oldukça yükselmiştir (Dorr ve Paxinos, 1978; He ve diğerleri, 2020). Son yıllarda tamamlayıcı ve alternatif tıba olan ilginin giderek arttığı göz önüne alınacak olursa, internet promosyonu ve pazarlamasıyla yönlendirilen binlerce Amygdalin ürününün ve tüketicilerinin sayısı halen belirsizliğini korumaktadır. Özellikle kanser tedavisi için yeni bir umut haline gelen Amygdalin'e yeteri kadar bilimsel çalışma eşlik etmemektedir. Uzun yıllar ilaç olarak kullanılmış olmasına rağmen, farmasötiklerin kullanıma sunulmadan önce yapılması mecburi olan genotoksisite testlerini içeren ulaşılabilir bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı Amygdalin'in genotoksik ve antigenotoksik etkilerini *in vitro* insan lenfositlerinde metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda ve varlığında incelemektir. Metabolik aktivatör yokluğunda gerçekleştirilen tüm çalışmalarda kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişim (KKD), mikronükleus ve comet testleri, metabolik aktivatör varlığında ise yalnızca KA ve KKD testleri kullanılarak gerçekleştirilmiş. Çalışmanın antigenotoksisite kısmında ise Amygdalin'in hem alkilleyici kemoterapi ajanları olan MMC ve SF hem de oksidan bir bileşik olan H_2O_2 'e karşı genomik hasarı engelleme düzeyini ölçmek planlanmıştır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan üç farklı uygulama protokolü olan ön, eş ve geç zamanlı muameleler kullanılarak test edilen bileşiğin etki mekanizması ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Böylece, bugün hala geçerliliğini koruyan Amygdalin'in artı ve eksilerine ilişkin çelişkilerin giderilmesine yönelik önemli bilgilere ulaşılacağı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların çağımızın hastalığı olan ve uygulanan pek çok tedavi yöntemlerine rağmen görülme sıklığı giderek artan kanser hastalığı için umut arayışının yönü konusunda belirleyici bir rol oynayacağına inanılmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Küresel Yükü

Kanser gelişimi, çok faktörlü etiyoloji, çok adımlı ve multi-genetik değişiklikleri kapsayan bir hastalıktır. Kanser terim olarak bozulmuş hücre ölümü, sınırsız hücre proliferasyonu ve genellikle metastaz oluşturmak üzere uzak dokulara invazyon sonucu malign tümör oluşumuna neden olan hücre fizyolojisindeki zamansal-mekansal değişimleri içeren bir dizi karmaşık süreç olarak tanımlanabilir (George, Dellaire ve Rupasinghe, 2017; Seyfried ve Shelton, 2010). Normalde genetik kökeni olan bir hastalık olarak düşünülmesine rağmen son yıllarda yapılan araştırmalar çeşitli epigenetik ve çevresel faktörlerin de kanserin gelişmesinde ve/veya ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Pogribny ve Rusyn, 2013: 215; Sharma, McClees ve Afaq, 2017).

Kanser ekonomik olarak gelişmiş olan ülkelerde ölümlerin ana nedenidir. Gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci sıradadır (Jemal ve diğerleri, 2011; N. M. Meybodi, Mortazavian, Monfared, Sohrabvandi ve F. A. Meybodi, 2017; Rahman ve diğerleri, 2020; Schottenfeld, Beebe-Dimmer, Buffler ve Omenn, 2013). Dünya sağlık örgütüne (DSÖ-World Health Organization) göre kanserden ölümlerin yaklaşık %70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir ve küresel olarak, bugün yaklaşık olarak her 6 ölümden 1'i kansere bağlıdır (WHO, 2021). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer) tarafından hazırlanan GLOBOCAN 2020 yılı tahminlerine göre dünya çapındaki kanser insidansı ve ölüm oranları açıklanmıştır. Buna göre 2020 yılında 19,3 milyon yeni vaka olduğu tahmin edilmiş ve yaklaşık 10 milyon kanser nedenli ölümler olduğu bildirilmiştir. Kadın meme kanseri tahmini olarak 2,3 milyon yeni vaka (%11,7) ile en sık teşhisi konulan kanser tipi olmuş ve bunu sırasıyla akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemiştir. Akciğer kanseri, tahmini 1,8 milyon ölümle (%18) kanser nedenli ölümlerin önde gelen sebebi olmayı sürdürürken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri takip etmiştir. Bununla birlikte, küresel kanser yükünün 2040 yılında 28,4 milyon vaka olması beklenmektedir ki bu da 2020'deki kanser oranlarına göre %47'lik bir artış temsil etmektedir (Sung ve diğerleri, 2021). Bunların yanında, kanserin ekonomik etkileri de giderek önemli oranda artmaktadır. Örneğin, yalnızca 2010 yılı için kanserin toplam yıllık ekonomik maliyetinin 1,16 trilyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2021). Genel

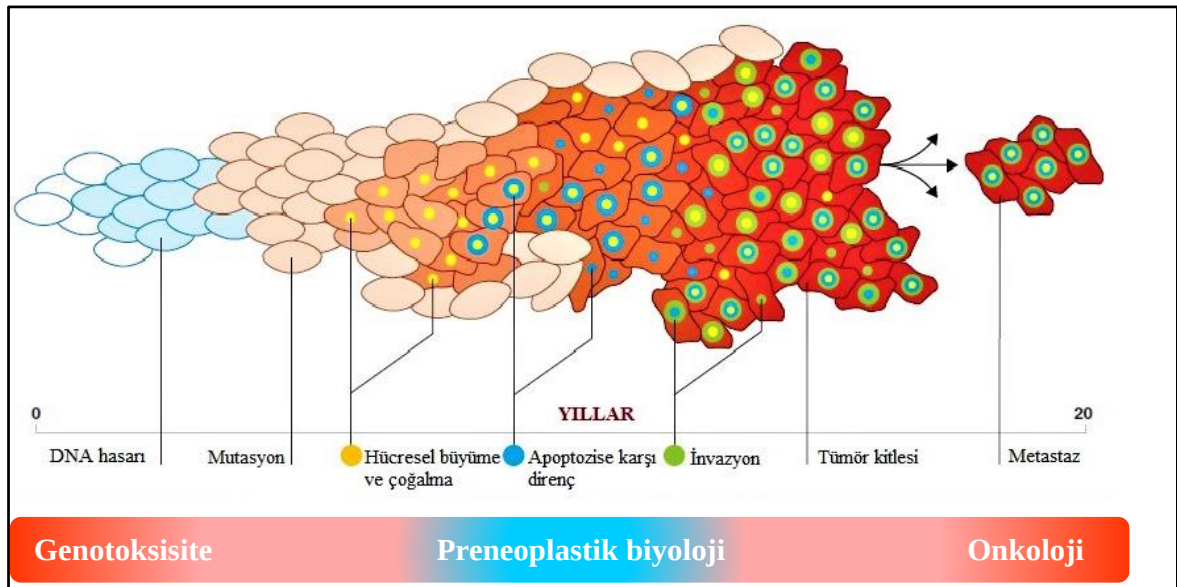
olarak, kanser insidansı ve ölüm oranları dünya çapında hızlı bir artış göstermektedir. Bu küresel yük, büyük ölçüde hem yaşlanmayı hem de nüfusun büyümesinin yanında birçoğu sosyoekonomik gelişmeyle ilişkili kansere neden olan ana risk faktörlerinin prevalansındaki ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtmaktadır (Sung ve diğerleri, 2021).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücresel seviyede kanserin somatik hücrelerin genetik hastalığı olduğunu öne sürerek, kanser kavramına yeni bir yaklaşım getirmiştir. Normal bir hücreden tam olarak malign bir hücreye dönüşüm hücre büyümesini ve hücreler arası etkileşimleri düzenlemede rol oynayan genlerin değişiminden kaynaklanan bir seri mutasyon aracılığıyla meydana gelir. Bu mutasyonlar DNA sentezi ve hücre replikasyonu sırasında çevresel ajanlara maruziyet sonucu oluşabilir ya da germ hücre mutasyonları gibi kalıtsal olabilir (Wachsman, 1997; Radu, Mihalache ve Mihalache, 2014). DSÖ tarafından verilen bilgilere göre kanser insidansı ve ölümlerin büyük bir kısmının bazı davranışsal ve besinsel risklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu riskler, yüksek vücut kitle indeksi, meyve ve sebze alımının az olması, fiziksel aktivite eksikliği, tütün ve alkol kullanımı, hepatit B (HBV), hepatit C (HCV) ve bazı tip insan papilloma virüslerinden kaynaklanan kronik inflamasyonlardır (WHO, 2021). Bu nedenle kanser bir dizi risk faktörünü içermesi nedeniyle yaygın bir yaşam tarzı hastalığı olarak kabul edilmektedir. Kanser neden olan davranışların giderek çoğalması ile kanser yükünün artışı arasında bir ilişki olduğu kabul görmektedir (Meybodi ve diğerleri, 2017; Schottenfeld ve diğerleri, 2013). Bu yaklaşım, tüm kanserler için risk faktörlerinden yalnızca yaklaşık %5-10'unun genetik faktörlere ve %90-95'inin çevresel faktörlere (%10-15 kimyasal ve endüstriyel kanserojenler, %15-20 enfeksiyonlar, %25-30 tütün ve %30-35 beslenme) dayanması dolayısıyla haklı görünmektedir (Irigaray ve diğerleri, 2007; Ruiz ve Hernández, 2016; Woźniak ve diğerleri, 2021).

2.2. Karsinogenez

Karsinogenez, çeşitli moleküler ve hücresel olaylardan oluşan çok adımlı neoplazik bir süreçtir. Hücresel DNA'nın genetik modifikasyonu sonucu mutasyona uğramış bir hücrenin ortaya çıkması ve bu hücrenin seçici olarak büyümesi neoplazik sürecin temelini oluşturmaktadır. Hücresel büyüme mutasyona uğramış hücrenin bölünme oranındaki artış ve/veya bu hücrenin ölüm oranındaki (apoptozis) azalma ile tetiklenebilir. Mutasyonlu hücre bölünmeye devam ettikçe, yeni oluşan lezyonda ilave epigenetik ve genetik değişiklikler

oluşur. Hücresel ve patolojik aşamaları tanımlamak amacıyla, karsinogeneze neden olan değişimler inisiyasyon (başlangıç), promosyon (gelişme) ve progresyon (ilerleme) şeklinde adlandırılarak tanımlanmıştır. Başlangıç aşaması, bir genotoksik hareket sonucu özellikle önemli genler veya kromozomlarda oluşan mutasyon kaynaklı pre-neoplastik bir hücrenin oluşumunu içermektedir (Şekil 2.1). Büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri, protein kinazlar, apoptotik sinyalizasyon proteinleri veya adhezyon moleküllerini kodlayan genlerde olası mutasyonların ortaya çıkması başlangıç aşaması sırasında bir hücrenin tümörigenik hale gelmesine zemin hazırlamaktadır (A. Chahar, N. Chahar, Kabirai ve Gupta, 2020; Ma ve diğerleri, 2021; Spandidos, 1986; Vincent ve Gatenby, 2008). Başlangıç hücresi ayrıca bilinmeyen bir sebepten spontan olarak da oluşabilmektedir. Pre-neoplastik başlangıç hücresinin oluşumu geri dönüşümü olmayan ve doza bağlı bir süreçtir. Bundan sonra, hasar uygun şekilde onarılmazsa kalıcı olarak genoma dahil edilecektir (Angelieri, Yujra, Oshima ve Ribeiro, 2017; Digiovanni, 1992; Klaunig ve Wang, 2018; Schulte-Hermann, Timmermann-Trosiener ve Schuppler, 1983; Schulte-Hermann, Grasl-Kraupp ve Bursch, 1994).



Şekil 2.1. Kanser oluşumunun genel şekli (Salk ve Kennedy, 2020)

Nisbeten uzun süren promosyon aşaması, hedef hücre popülasyonunda gerçekleşen tekrarlayan çoğalma döngüleri ve seçici klonal genişleme ile karakterize edilir. Bununla beraber, genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanan bir dizi karmaşık olayların da dahil olduğu düşünülmektedir. Bu aşamada hücreler sürekli anjiyogenezin eşlik ettiği programlanmış hücre ölümü olan apoptozisten ve immün denetimden kaçma yeteneği

kazanmışlardır. Bu evredeki olaylar da doza bağlıdır ancak tümör promosyon uyarısı ortadan kalktığında geri döndürülebilir. Üçüncü aşama olan progresyon ise pre-neoplastik evreden malign neoplaziye geçişin meydana geldiği hücrel ve moleküler değişimleri içermektedir. Karsinogenezin bu aşaması, geri döndürülemezdir. Genetik kararsızlık, çekirdek ploidisinde değişiklikler ve kromozom bütünlüğünün bozulması gibi farklılaşmaları barındırmaktadır (Farber ve Cameron, 1980; Schulte-Hermann ve diğerleri, 1994; Klaunig ve Wang, 2018; Malacarne ve diğerleri, 2021). Yapılan pek çok araştırma karsinogenezin çok daha karmaşık olduğunu göstermiştir, ancak üç aşamalı sürecin kullanılması kanser sürecini değiştiren durumların nerede ve nasıl işlendiğini anlamak açısından faydalı olmaktadır. Kanseri indükleyen çeşitli ajanların karsinogenez sürecinin tüm aşamalarında (tam karsinojenler) veya seçici aşamalarda (tümör başlatıcılar-inisiyasyon aşaması) ve promosyon aşamasında (tümör geliştiriciler) işlev görebilecekleri açıktır (Klaunig ve Wang, 2018).

Kanser tedavisi için uygulanan yöntemler arasında cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyasyon ana seçeneklerdir. Bu üç yöntemin tümü doku hasarı ve kanser hücrelerinin ölümü ile harekete geçen lokal ya da sistemik inflamasyonu indükler. Kemoterapi ve radyoterapi kanser hücrelerini çoğunlukla hücre ölümünün pro-inflamatuvar şekli olan nekroz aracılığı ile öldürürken, cerrahi müdahale strese duyarlı yolakların aktif hale gelmesine yol açmaktadır (Grivennikov, Greten ve Karin Vakkila, 2010; Vakkila ve Lotze, 2004). Kanser hücrelerindeki kontrolsüz proliferasyonu hedef alan kemoterapi (sitotoksik bileşikler) ve radyoterapinin (iyonize radyasyon) amacı hücre döngüsünü durdurmak ve/veya kanser hücrelerini öldürmektir. Aslında, hücre döngüsünün en önemli aşaması DNA replikasyonu olması dolayısıyla bu tedavilerde kullanılan ajanların ana hedeflerinden biri DNA'dır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan ajanların genotoksik strese sebep olma potansiyelleri oldukça yüksektir (Attia, 2012; Swift ve Golsteyn, 2014).

2.3. Genetik Toksisite ve Kanser ilişkisi

Genotoksisite, farklı ajanların genetik materyali hasara uğratma kabiliyetidir. Genetik toksisiteye neden olan ajanlar 'genotoksinler' olarak tanımlanmışlardır. Genotoksinler kökenlerine göre fiziksel, kimyasal ve biyolojik olabilmelerinin yanında endojenik veya ekzojenik de olabilirler. Fiziksel kaynaklı genotoksik ajanlara UV ışık ve iyonize radyasyon örnek olarak verilebilir. Kimyasal genotoksinler, pestisitler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), ağır metaller, organik çözücüler, bazı kemoterapi ilaçları vb. bileşikleridir.

içermektedir. Biyolojik genotoksinler ise bazı bakteri, mantar, virüs, parazit ve bitkiler tarafından oluşturulabilmektedir (Izquierdo-Vega ve diğerleri, 2017; López-Romero ve diğerleri, 2018).

Genotoksik ajanlar, mutajen, karsinojen veya teratojen olabilmektedirler. Mutasyonlar, minimum bilgi birimleri olan tek bir gende veya yüksek seviyeli birimler olan kromozomlar üzerinde birden fazla yerde oluşabilirler. Eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu bazı anormallikler nesillere aktarılabilir. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar, kanserin yanı sıra kronik inflamasyon, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve diğer çeşitli patolojik durumları içeren farklı hastalıklara yol açabilirler (López-Romero ve diğerleri, 2018; Luca, Miron ve Aprotosoie, 2016; Słoczyńska ve diğerleri, 2014; Tuenter ve diğerleri, 2020).

Bugün kanserin özellikle tümör baskılayıcılar (Hussain, Hollstein ve Harris, 2000) veya proto-onkogenler (Lowy ve Willumsen, 1993) gibi büyüme düzenleyici genleri de içine alan çoklu mutasyonların birikiminden kaynaklandığı bilinmektedir. Bununla birlikte yapılan araştırmalarda K-RAS, H-RAS, BRAF, PTEN ve TP53 gibi önemli genlerde oluşan mutasyonların farklı kanser tipleri için karakteristik hale geldiği belirlenmiştir (Sonoda, 2016; Zannoni, Angelico ve Santoro, 2020). Bu nedenle kritik genlerde birçok mutasyonun meydana gelmesi kanser hücreleri için ayırt edici bir özellik olmakla birlikte, kanserin geri döndürülemeyen DNA hasarının birikmesiyle ortaya çıktığı iddiasını da desteklemektedir (Hernández, Steeg, Luijten ve Benthem, 2009; Wilde ve diğerleri, 2018).

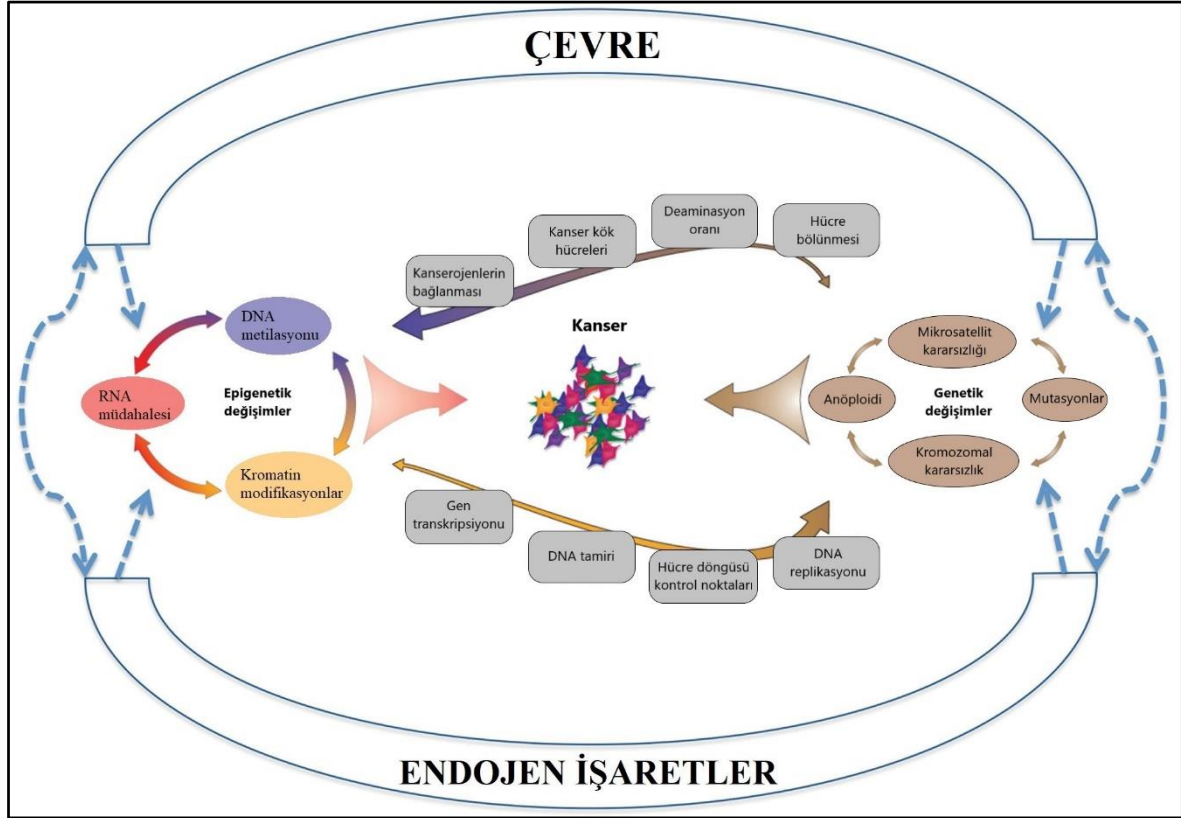
Mutasyonların, özellikle karsinogenez ve genetik hastalıkların ortaya çıkma riskini artırması nedeniyle insan sağlığı üzerinde büyük bir etkisi vardır. Mutagenез ve karsinogenez arasındaki güçlü korelasyon, 50 yılı aşkın süredir genetik toksikoloji araştırmalarının arkasındaki itici güç olmuştur (Salk ve Kennedy, 2020). Genetik toksikoloji, kimyasal ve fiziksel ajanların genetik materyal üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Canlı hücrelerde kansere yol açan DNA hasarının belirlenmesinin yanında aynı zamanda bir nesilden diğerine aktarılabilen DNA'daki değişiklikleri de araştırmaktadır. Kimyasal ve fiziksel ajanların neden olduğu hücresel değişiklikler, bu değişikliklerin altında yatan moleküler mekanizmalar ve bu tür bilgilerin risk değerlendirmelerine katkı sağlamaktadır (Gupta, 2020).

2.3.1. Kanser'in 'Genotoksik' ve 'Genotoksik Olmayan' mekanizmaları

Kanser vakalarının yaklaşık %90–95'inin kimyasal, %5–10'unun fiziksel ve %2–5'inin ise biyolojik ajanlarla ilişkili olduğu görülmüştür. Karsinogenezin çok adımlı süreçlerine (inisiyasyon, promosyon ve progresyon) müdahale ederek bu evrelerden herhangi birini değiştirebilme kabiliyetinde olan karsinojenler, spesifik patojenik mekanizmalarına göre 'genotoksik' ve 'genotoksik olmayan' ajanlar olarak kategorize edilirler. Bunların %10-20'sini oluşturan genotoksik olmayan karsinojenler, apoptotik sinyallemede değişiklikler, hücre çoğalması, hücreler arası iletişim, endokrin sistem, epigenetik değişimler ve oksidatif hasarın uyarılması gibi süreçlere daha fazla müdahale ederek ve birden fazla yolağı eş zamanlı olarak değiştirerek genotoksik olmayan mekanizmalar aracılığı ile kanseri indüklemektedirler (Bartsch ve Malaveille, 1989; Liskova ve diğerleri, 2020; Nohmi, 2018; Wilde ve diğerleri, 2018).

Birçok kanserojenin hem epigenetik değişiklikleri (anormal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları) hem de genetik değişiklikleri (mutasyonlar) indükleyerek tümör gelişimini uyarabilmektedir (Şekil 2.2). Ancak bireysel genetik polimorfizmler ve epigenetik yapı (epigenetik polimorfizmler), çevresel strese olan hücresel yanıtta da önemli roller oynayabilir ve bu nedenle, bir bireyin kanser geliştirmeye yatkınlığının bir parçasını temsil edebilirler. Epigenetik terimi, DNA dizisinden bağımsız olabilen ve hücre bölünmeleri üzerinden mitotik olarak kalıtılabilen gen ifadesi ve kromatin organizasyonundaki tüm kararlı değişiklikleri ifade etmektedir. Genomik damgalanma, X kromozomu inaktivasyonu, DNA metilomunun genel olarak yeniden yapılandırılması, kromatin kompaksiyon (sıkıştırma) durumunda ve histon modifikasyon paternlerindeki değişiklikler gibi epigenetik fenomenler bir organizmanın ömrü boyunca korunan soy-spesifik epigenoma katkıda bulunmaktadır (Herceg ve diğerleri, 2013). Literatürde, "genotoksik olmayan" ve "epigenetik" terimleri bazen birbirinin yerine kullanılmaktadır (Klaunig, Kamendulis ve Xu, 2000). Bununla birlikte, genotoksik olmayan tüm kanserojen maddeler, epigenetik durumları (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları veya kodlamayan RNA'lar) değiştirerek etki göstermez. Yani bazı epigenetik ajanlar aynı zamanda genotoksik olmalarına rağmen, genotoksik olmayan karsinojenlerin tümü epigenetik mekanizmalar aracılığı ile hareket etmez. İlginç olarak, epigenetik değişiklikler, çevresel kimyasallara maruziyetin bir sonucu olabildikleri için genotoksik aberasyonlardan

bağımsız olarak ya da bu aberasyonlarla beraber meydana gelebilmektedir (Herceg ve diğerleri, 2013; Liskova ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.2. Kanser gelişimi ve ilerleme sürecinde genetik ve epigenetik değişimler (Herceg ve diğerleri, 2013)

Çoğu durumda karsinojenler doğrudan veya ksenobiyotik metabolizmadan sonra DNA hasarına neden olur ve 'genotoksik' bir şekilde hareket ederler. Genotoksik karsinojenlerin birçoğu (nitrosaminler, ultraviyole, iyonize radyasyon ve alkilleyici ajanlar gibi) metabolik aktivasyon veya herhangi bir moleküler modifikasyon gerektirmeden kovalent bağ oluşturarak DNA ile doğrudan etkileşime girebilen ve sonuçta DNA-karsinojen kompleksleri oluşturabilen elektrofillerdir. Bu kompleksler DNA'nın iki sarmalı arasında çapraz bağların oluşması, yakın bazlar arasında kimyasal bağların oluşumu, DNA bazlarının çıkarılması (hidrasyon) ve DNA zincirinin bölünmesini içeren çeşitli DNA hasar tiplerine neden olarak DNA'da depolanan bilgiyi değiştirmekte veya DNA eklentilerinin (DNA-adduct) oluşumuna neden olmaktadır. Bu tip mutasyonlar genellikle DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilebilmektedir ancak onarım mekanizmasından önce replikasyon gerçekleşmişse mutasyonlar kalıcı hale gelebilmekte ve sonunda tümör gelişimine neden olabilmektedir (Jacobs ve diğerleri, 2020; Lee ve diğerleri, 2013).

Bir kısım karsinojen, pro-karsinojen formunda bulunmakla birlikte metabolizasyon sürecine ihtiyaç duymaktadır. Örneğin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), heterosiklik aromatik aminler (HAA'lar), N-nitrozaminler ve mikotoksinler gibi reaktif olmayan ana bileşikler biyoaktivasyonları sonucu kanserojen metabolitler veya genotoksik etkiler oluşturabilen reaktif ara maddelere dönüşürler. Bu transformasyon genellikle faz I ve/veya faz II reaksiyonları aracılığıyla gerçekleşir. Faz I reaksiyonları temel olarak sitokrom P450 (CYP) karma işlevli oksidaz izoformlarının dahil olduğu oksidasyon, indirgeme veya hidrolizi içermektedir. Bu enzimler (CYP'ler) kanserojenleri bağımsız olarak veya sülfotransferazlar ve N-asetiltransferaz gibi faz II enzimleriyle birlikte aktive etme kabiliyetine sahiptirler. Kanserijenlerin çeşitli metabolik süreçler yoluyla aktivasyonu DNA eklentileri (adduct) oluşturma kabiliyetine sahip olan elektrofilik reaktif ara maddelerin oluşumuna neden olurlar. Reaktif metabolitler daha sonra DNA'ya bağlanarak böylece mutasyonların oluşumuna ve karsinojenik yanıtların başlamasına katkıda bulunmaktadır (Barnes ve diğerleri, 2018; Guengerich, 2000; Hartwig ve diğerleri, 2020; Rendic ve Guengerich, 2012).

Sonuç olarak, genotoksik karsinojenler mutasyonların indüksiyonu yoluyla kanserojenite gösterebilen bileşiklerdir. Aslında bilinen karsinojenlerin birçoğunun genotoksik olduğu düşünülmektedir. DNA etkileşim özellikleri nedeniyle, bu ajanlarla ilişkili güvenli bir doz veya maruziyet eşiği bulunmamaktadır. Genotoksik kanserojenlerin çok düşük dozlarda bile insanlar için kanser riski oluşturdukları düşünülmektedir. Buna karşılık, hormonal etkiler, sitotoksikite, hücre proliferasyonu veya epigenetik değişiklikler gibi mutasyonlar dışındaki mekanizmalar yoluyla kanseri indükleyen genotoksik olmayan karsinojenlerin güvenli bir maruz kalma eşiğine veya dozuna sahip olduğuna inanılmaktadır (Nohmi, 2018). Daha da önemlisi, metabolik aktivasyon bağımsız (doğrudan hareket eden) karsinojenler, elektrofilik gruplara bağlı olarak DNA veya hücresel bileşenlerle doğrudan etkileşime girerken, metabolik aktivasyon bağımlı (dolaylı hareket eden) karsinojenlerin, kanserojenik veya genotoksik etkiler uygulayan reaktif ara ürünler haline gelmeleri için elektrofilik formlara aktivasyonları gerekmektedir. Nihayetinde kanserojen ajanların genetik materyalde ve diğer hücresel bileşenlerde oluşturdukları zararlı etkilerine ekzojen veya metabolik olarak üretilen elektrofiller ve reaktif oksijen türleri (ROT) aracılık etmektedir (Barnes ve diğerleri, 2018; Li, Jia ve Trush, 2016; Rendic ve Guengerich, 2012; Talalay ve Fahey, 2001).

2.3.2. Karsinojen aracılı oksidatif stres

Normal fizyolojik koşullarda, aerobik organizmalarda oksijen ve nitrojen metabolizmanın bir sonucu olarak devamlı reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROT/RNT) gibi çeşitli zararlı oksidan bileşikler üretilmektedir (Aslankoç ve diğerleri, 2019; Newshean, Aziz, Kryston, Ferguson ve Georgakilas, 2012; Ritchie ve Ko, 2021). Reaktif oksijen türleri, süperoksit anyonu ($\bullet\text{O}_2^-$) ve hidroksil radikali ($\text{OH}\bullet$) gibi radikallerin yanı sıra hidrojen peroksit gibi (H_2O_2) radikal olmayan molekülleri içerirken, reaktif nitrojen türleri nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$) gibi radikalleri ihtiva eder. Öte yandan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik yapıdaki ve serbest radikal süpürücüler (E vitamini, ferritinler, farklı tioller ve diğerleri) gibi enzimatik yapıda olmayan hücre içi antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki denge hücresel homeostazı sürdürmeye yardımcı olmaktadır. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması yani endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması hücresel oksidatif stresin oluşumuna neden olmaktadır (Çelik ve Ayran, 2020; Kakehashi ve diğerleri, 2013).

Serbest radikaller her ne kadar zararlı bileşikler olsalar da aslında birçok biyolojik süreçte önemli ve pozitif yönde rol oynamaktadırlar. Fizyolojik koşullar altında, düşük konsantrasyonlarda ROT, homeostazın sürdürülmesinin yanı sıra çok çeşitli hücresel fonksiyonları içeren süreçlerin düzenlenmesinde faydalı olmaktadır (Bhattacharyya, Chattopadhyay, Mitra ve Crowe, 2014; Finkel ve Holbrook, 2000; Sharifi-Rad ve diğerleri, 2020). Araştırmacılar, serbest radikallerin redoks sinyalizasyonu olarak bilinen bazı hücresel sinyalleşme süreçlerinde de rol oynadığına inanmaktadır (Finkel ve Holbrook, 2000; Sharifi-Rad ve diğerleri, 2020). Hücresel aktivitenin düzenleyicileri olan ROT'lar esasen ikincil haberciler olarak hareket ederler ve hücresel bileşenlerin fizyolojik oksidasyonuna katılırlar (Sies, 2014). Örneğin, H_2O_2 hem hücre içi hem de hücre dışı sinyalizasyon molekülü ve inflamasyon/immün cevaplarda önemli bir rolü bulunan güçlü bir bakterisidaldir (Clifford ve Repine, 1982; Drevet ve Aitken, 2020; Reth, 2002). Dahası ROT ve RNT fagositoz ile enfeksiyonlara karşı savunma, sitotoksik lenfositler ve makrofajlar kullanılarak kanser hücrelerinin öldürülmesi, sitokrom P450 yolağı aracılığıyla ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, mitokondrial ATP sentezi, düşük konsantrasyonlarda hücresel büyüme ve mitojenik yanıtların oluşumu gibi olumlu etkilere sahiptirler (Karabulut ve Gülay, 2016).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) endojen kaynakları inflamatuvar hücreler, mitokondri ve peroksizomlardır. İnflamatuvar hücreler ve mitokondriyal solunum zincir reaksiyonu sırasında süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) gibi ROT'lar oluşabilmektedir. Bununla birlikte, H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ çoğunu üreten organeller peroksizomlardır (Jelic ve diğerleri, 2021; Sullivan ve Chandel, 2014). Diğer yandan, organizmalar iyonize radyasyon ve bazı çevresel kirleticiler, kimyasal maddeler, alkol, gıda, tütün, kemoterapötik ajanlar (mitomisin C, doksorubisin vb.) ve bazı enfeksiyonlar gibi ROT üretimine katkıda bulunan ekzojen kaynaklara maruz kalmaktadırlar (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum ve Kalayci, 2012; Jelic ve diğerleri, 2021; Kakehashi ve diğerleri, 2013; Newsheen ve diğerleri, 2012). Bu maruziyet hücrel ROT miktarını artırarak lipid, protein ve DNA hasarlarına neden olmaktadır (Finkel ve Holbrook, 2000; Sharifi-Rad ve diğerleri, 2020).

Oksidatif DNA hasarı önemli bir mutasyon kaynağıdır. Reaktif oksijen türleri genel olarak DNA'da hem tek hem de çift zincir kırıkları, DNA çapraz bağları ve baz modifikasyonlarını indükleyebilmektedir. Çeşitli olaylar ve yollarla ortaya çıkabilen ROT/RNT konsantrasyonları kritik bir seviyeye ulaştığında, inflamatuvar hücreler ve büyüme faktörleri bakımından zengin bir ortamda hücrel hasarın devamlı olarak indüklenmesi karsinogenez potansiyeline sahip olan sürekli hücre proliferasyonuna yol açmaktadır. Genotoksik ve genotoksik olmayan ajanlara maruziyetin bir sonucu olan ve endojen veya ekzojen olayların aracılık ettiği ROT/RNT, genetik mutasyonlara ve hücre büyümesinde değişimlere neden olabilmektedir. Reaktif oksijen radikallerindeki artış ile kanser oluşumu arasında bir bağlantı kurulmuştur. DNA'ya hasar verebilme potansiyelleri nedeniyle ROT/RNT prensip olarak genotoksiktirler. Özellikle peroksitler ve süperoksit anyonlarının ($\bullet O_2^-$) hücrel sistemlerde sitotoksik ve genotoksik etkilere neden oldukları bildirilmiştir (Gülçin, Bursal, Şehitoğlu, Bilsel ve Gören, 2010; Yurt ve Çelik, 2011). Üstelik kimyasal karsinojenlerin serbest radikallerin üretimini artırarak hücrel antioksidan sistemleri ve/veya DNA onarım sistemlerini geçersiz kıldığı gösterilmiştir. Bu yüzden insan vücudunda oluşan ROT ve RNT'ye karşı koymada endojen antioksidan savunma sistemleri her zaman yeterli olmamaktadır. Böyle bir durumda DNA, lipidler ve proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar kanser ve genetik hastalıkların yanı sıra birçok kronik hastalıkların gelişimine de katkıda bulunabilmektedir (Halliwell, 1996). Bununla birlikte ROT, genellikle baz oksidasyonu aracılığıyla DNA'ya hasar vererek genotoksik strese aracılık etmekte ve pro-onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi kanserojenik

mekanizmaların inisiyasyon ve progresyon aşamalarına dahil olabilmektedir (Jelic ve diğ erleri, 2021; Kakehashi ve diğ erleri, 2013; Klaunig, Kamendulis ve Hocevar, 2010).

2.3.3. Antioksidan savunma sistemleri

Serbest radikaller d    k konsantrasyonlarda yaşam için gerekli olduğundan, bu radikaller tarafından ind  klenen hasarları en aza indirmek ve açığı serbest radikal üretimine karşı koruma sağlamak için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu savunma mekanizmalarında ‘antioksidan’ denilen maddeler hayati bir rol oynamaktadır. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve bunların neden olduğu hasarı arayan, nötralize eden veya onaran maddelerdir. Sağlıklı organizmalarda, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koruma, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hassas dengeyi sürdürerek elde edilmektedir. Bu nedenle aerobik organizmalarda devamlı olarak serbest radikal üretimi benzer bir antioksidan tüketimi oranıyla e itlenmelidir (Clark, Cowden ve Hunt 1985; Sharifi-Rad ve diğ erleri, 2020). Genel olarak antioksidan maddelerin etki mekanizmaları aşağıdaki gibi ifade edilebilir ( elik, ve Ayran, 2020):

1. Serbest radikalleri bağlamak ve kararlı hale getirmek suretiyle toplayıcı ve giderici etki gösterirler.
2. Serbest radikalleri açığa çıkaran kimyasal reaksiyonları durdurarak zincir kırıcı etki gösterirler.
3. Reaksiyon hızını düşürerek baskılayıcı etki gösterirler.
4. Lipit, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oluşan oksidatif hasarı tamir ederek ve hasarları rejenere ederek onarıcı etki gösterirler.
5. Hücresel kinaz kayıplarına engel olarak oksidasyon reaksiyonlarının önüne geçerler.
6. Enzimatik (SOD gibi) ve enzimatik olmayan antioksidan maddelerin sentezini artırarak etkileri sergilemektedirler.

Doğal antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklardan t retililebilmekle birlikte ROT'un neden olduğu hasarı önleyebilmekte ve tamir edebilmektedirler. Bu bileşiklerin bir kısmı beslenme aracılığıyla (enzimatik olmayan) vücuda alınırken, bir kısmı hücresel seviyede (enzimatik olan) sentezlenmektedir ( izelge 2.1). Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx), Katalaz (KAT) birincil basamak enzimatik antioksidanlar olup ROT'un

iyi huylu ürünlere dönüşümünü katalize ederler (Aslankoç ve diğerleri, 2019; Ritchie ve Ko, 2021; Scandalios, 2005).

SOD, GPx ve KAT, süperoksit ve diğer peroksitleri şelatlayarak hareket etmektedir. Hücrelerdeki ROT aktivitesini ve birikimini temizlemenin yanında redoks dengesini koruyan antioksidan savunma sistemleri olarak hareket ederler. Serbet radikallere karşı ilk savunma hattından biri olan SOD, süperoksit anyon radikallerinin ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) dismutasyonunu katalizlemektedir (Abreu ve Cabelli, 2010). Oluşan oksidan H_2O_2 , daha sonra peroksizomlardan sentezlenen KAT tarafından su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüştürülür. GSH, glutatyon döngüsüne ait elzem bir antioksidan molekül olup GPx, glutatyon-S-transferaz (GST) gibi enzimler tarafından indirgeyici bir bileşik olarak kullanılmaktadır. GPx, lipid hidroperoksitlerini (ROOH) onların alkollerine ve H_2O_2 'yi de suya indirgemektedir. GST ise elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda GSH'yi kullanarak elektrofillerin önemli hücrel makromoleküllerle (protein veya lipid) etkileşime girmesine mâni olmaktadır (Begas, Liedgens, Moseler, Meyer ve Deponte, 2017; O. Elmas ve S. Elmas, 2020; Mannervik, 1987).

Çizelge 2.1. Doğal antioksidan maddeler (Çelik ve Ayran, 2020)

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
ENZİMATİK	ENZİMATİK OLMAYAN	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutatyon	Melatonin
Katalaz (KAT)	Albumin	Ürik asit
Glutatyon peroksidaz (GPx)	Biluribin	Selenyum
Glutatyon redüktaz (GR)	Koenzim Q 10	Tioller (lipoik asit)
EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR		
A vitamini (β -karoten)		
E vitamini (α -Tokoferol)		
C vitamini (Askorbik asit)		
Fitokimyasallar (Glikozitler, terpenoidler, ve polifenoller vb.)		

Enzimatik olmayan antioksidanların büyük bir kısmı vücutta sentezlenemez ve genellikle dışarıdan beslenme yoluyla temin edilirler. Bu bileşikler ise E ve C vitaminleri, koenzim Q, ve glutatyonun yanı sıra birçok meyve, sebze, tahıllarda bulunan çeşitli fitokimyasalları (allelkimyasallar) içeren maddelerdir. Genellikle serbest radikalleri süpürücü etkileri ile ROT saldırısına karşı önemli bir biyolojik savunma görevi görürler (Rahal ve diğerleri, 2014; Ritchie ve Ko, 2021). Antioksidatif etkiye sahip olan ve doğal olarak oluşan birçok bileşiğin hücresel bileşenleri oksidatif hasardan koruduğu ve hastalıkları önlediği bilinmektedir. Bu yüzden besinsel antioksidanların kanser başta olmak üzere çok sayıda kronik hastalığa karşı korunma ve tedavide önemli olabileceği ortaya konmuştur (Halliwell, 1996; Vendemiale, Grattagliano ve Altomare, 1999).

2.4. Antigenotoksisite

Hızla gelişen bilim ve teknoloji modern hayatta genotoksik riski tamamen ortadan kaldırmayı imkansız hale getirmiştir. Genotoksik ajanların kanser gibi birçok hastalığın başlangıç ve gelişim aşamalarında rol oynadığı göz önüne alınacak olunursa mutajenik ve kanserojenik etkileri önlemede yeni biyoaktif doğal bileşiklerin önemi bugün daha da artmıştır. Fiziksel ve kimyasal mutajenlerin, mutajenik etkilerini azaltan böyle kimyasallara ‘anti-mutajenler’ denir. Ancak tüm mutajenlerin genotoksik olduğu, tüm genotoksik maddelerin ise mutajenik olmadığı göze alınacak olursa, genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarını azaltan bileşikler ‘antigenotoksik ajanlar’ olarak adlandırılmaktadır (De Flora ve Ferguson, 2005; Ferguson, Bronzetti ve De Flora, 2005; Izquierdo-Vega ve diğerleri, 2017).

Genel olarak, anti-mutajenler etki mekanizmalarına göre yani doğrudan mutajen ile etkileşime girip girmemelerine bağlı olarak desmutajenler ve biyo-antimutajenler olmak üzere iki geniş kategoride sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre desmutajenik bileşikler (önleyiciler) hücre dışında fonksiyon gösterirler ve genotoksik ajanların eliminasyonunu teşvik etmenin yanı sıra mutajenlere geri dönüşümsüz olarak (doğrudan) bağlanırlar. Böylece mutajenik ajanları DNA’ya ulaşmadan önce enzimatik ya da kimyasal etkileşim yoluyla kısmen ya da tamamen inaktif hale getirirler. Öte yandan, biyo-antimutajenik bileşikler ise desmutajenlerin aksine mutajen ile reaksiyona girmezler, hücre içinde hareket ederek mutajenik etkileri geri döndürürler ve mutasyonların kalıcı hale gelmesini önleyerek hareket ederler. Başka bir deyişle bu bileşikler, genler mutajenler

tarafından hasara uğradıktan sonra mutasyon sürecini baskılayabilirler. Bu bileşikler DNA tamiri ve replikasyon sürecinde rol oynarlar, ayrıca mutasyon sıklığında düşüşe neden olurlar (De Flora ve Ferguson, 2005; Ferguson ve diğerleri, 2005; Hoffmann, Shorter, Quaranta ve McMaster, 1999; Kada, Inoutee ve Maniki, 1982: 1013,1025; Okuno, Marumoto ve Miyazawa, 2019; Słoczyńska ve diğerleri, 2014).

Antigenotoksik ajanların etki mekanizmaları karmaşıktır ve etki ettikleri bölgeye veya spesifik olarak etki tiplerine göre kategorize edilebilirler. Normalde, toksik maddelerin genotoksik etkilerinin fizyolojik detoksifikasyon süreçlerinin modüle edilmesiyle en aza indirilebileceği beklenir. Çoğu antigenotoksik etkili maddenin antioksidan etki, deoksifikasyon kabiliyeti, sindirim sisteminde kanserojenlerin bağlanması/seyretilmesi, epigenetik değişimler veya hücrel modülasyon ve sinyalizasyon yolları dahil olmak üzere birbiriyle örtüşen ve tamamlayıcı mekanizmalar aracılığıyla işlev gördüğü belirtilmektedir (Shankar, Kumar ve Srivastava, 2013).

Yapılan araştırmalar sonucunda insanda genotoksik streste artışı kanser riskini artırdığı, genotoksik streste meydana gelecek azalmanın ise kanser riskindeki azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Chahar ve diğerleri, 2020; Hagmar ve diğerleri, 1998; Siddique, Ara, Beg, Gupta ve Afzal, 2010). İnsanları DNA hasarı ve bu hasarın doğuracağı sonuçlara karşı koruyabilecek bileşikleri tanımlamak amacıyla son yıllarda sayısız araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda dünya çapında yenilebilir bitkilerin (meyveler, sebzeler) yanı sıra tıbbi bitkiler ve diğer toksik olmayan bitkilerden elde edilen saf bileşikler veya özütler aracılığıyla en etkili fito-antimutajeni keşfetmek için sürekli ve yoğun bir çaba bulunmaktadır. Bu bileşikler özellikle mükemmel düzeyde antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktivite sergilemekle birlikte DNA hasarına engel olmakta ve dolayısıyla kanserin başlatılmasını inhibe edebilmektedir (Liu ve diğerleri, 2018). Ayrıca bu fitobileşiklerin birçoğu antimutajenik ve antikarsinojenik aktiviteye sahip olmakla birlikte mükemmel immünomodülatör, hepatoprotektif, antihiperlipidemik, antihiperlipidemik, kardiyoprotektif, antiinflamatuvar ve antiromatizmal etkileri gibi başka yararlı etkiler de sergilemişlerdir (Słoczyńska ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, bu tür fitobileşiklere maruz kalmak insan sağlığı için faydalı olabilmektedir. Ek olarak, çoğu doğal fitobileşiğin fizyolojik işlevler ve detoksifikasyon sürecine dahil olan biyotransformasyon reaksiyonları üzerinde modülatör bir role sahip olduğu ve böylece çevresel toksik bileşiklerin teşvik ettiği sitotoksik, genotoksik ve metabolik etkilere karşı koruma sağladığı ortaya konmuştur (Saha ve Das,

2003; Yurt ve Çelik, 2011). Kanserojenizin başlatılması (inisiyasyon) ve gelişiminde (promosyon) rol oynayan iyi bilinen risk faktörlerinden kaçınmak, malign transformasyonlardan korunmak için en olası ve açık yaklaşımdır. Ayrıca, hem organizmayı mutajen ve kanserojenlere karşı daha dirençli hale getirmek hem de kronik hastalıkların ilerlemesini önlemek amacıyla yeni ve tamamlayıcı olan kemopreventif stratejiler geliştirmek rağbet gören bir yaklaşım haline gelmiştir (Izquierdo-Vega ve diğerleri, 2017).

2.5. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Değerlendirmelerinde Kullanılan Testler

Farmasötikler, endüstriyel kimyasallar, gıda katkı maddeleri, kozmetik bileşenleri ve ayrıca tıbbi bitkiler ve bunların yağları veya biyoaktif bileşenlerinin dahil olduğu doğal ürünler gibi tüm yeni ve halen var olan ajanların kullanımına ilişkin olarak insan sağlığı için bir risk oluşturmadıklarından emin olmak amacıyla test edilmeleri gerekmektedir (Sponchiado ve diğerleri, 2016; Vilar, Ferreira, Ferri, Guillo ve Chen-Chen, 2008). Bu maddeler genotoksisite değerlendirmelerini içeren her toksikolojik son noktada (endpoint) test edilmektedirler. Genotoksisite testlerinin iki amacı vardır: i) tehlike değerlendirmesi ve ii) Küresel Uyumlaştırma Sistemine (GHS) göre sınıflandırma ve etiketleme (Steiblen, Benthem ve Johnson, 2020).

Farklı mekanizmalar aracılığı ile doğrudan veya dolaylı olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikleri saptamak için tasarlanan genotoksisite testleri, test edilen bileşiğin neden olduğu DNA hasarını takiben gen mutasyonlarının oluşumu ve kromozomal değişiklikleri ölçmekte ve bu bileşiklerin kanserojen potansiyellerini tahmin etmek için kullanılmaktadır (Kirkland ve diğerleri, 2007; Sponchiado ve diğerleri, 2016). Bu testlerde saptanan pozitif sonuçlar, sadece zincir kırıkları, mutasyonlar ve DNA eklentilerine (adducts) neden olan doğrudan DNA etkileşimlerini tanımlamamaktadır. Aynı zamanda bu pozitif sonuçlar oksidatif stres, topoizomeraz inhibisyonu, nükleotid havuz dengesizliği veya kromozom segregasyonunun bozulması gibi dolaylı mekanizmalardan da kaynaklanıyor olabilmektedir (David, 2020; Thybaud, Le Fevre ve Boitier, 2007). Öte yandan, genotoksik etkilerin araştırılmasında kullanılan testler aynı zamanda genotoksisiteye karşı antagonistik bir etkiye sahip olan yani antigenotoksik, antimutajenik ve antikanser aktiviteleri bulunan bitkisel özütleri veya fitobileşikleri tanımlayabilmektedir (Di Stasi ve diğerleri, 2002; Siddique, Beg ve Afzal, 2008; Ünal, Taner, Yüzbaşıoğlu ve Yılmaz 2013; Yüzbaşıoğlu,

Zengin ve Ünal 2014; Słoczyńska ve diğerleri, 2014; Soltani, Moghadam, Nadalizadeh, Emami ve Javadi, 2021; Sponchiado ve diğerleri, 2016; Tuentner ve diğerleri, 2020).

Genotoksisite testleri üç genotoksik son noktaya (endpoint) sahiptir. Bunlar gen mutasyonları (mutajenisite), yapısal kromozomal anormallikleri (klastojenisite) ve sayısal kromozom anormallikleridir (anöploidi). Test edilen maddelerin genotoksik etkilerinin tam olarak değerlendirilebilmesi için kullanılan testlerin tüm son noktaları içermesi gerekmektedir. Malesef, tüm son noktaları içeren bir genotoksisite testi bulunmamaktadır, bu nedenle tüm son noktaları kapsayıcı bir genotoksisite değerlendirmesi için test kombinasyonları gerekmektedir (Steiblen ve diğerleri, 2020).

Genotoksisite değerlendirmeleri için hem *in vitro* hem de *in vivo* testler mevcuttur. 1982'den beri yaygın olarak kullanılan testlerin yürütülmesine yönelik öneriler, testlerin ana adımlarını açıklayan Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) test kılavuzlarında verilmektedir. Ancak, birçok test daha eskidir ve OECD test kılavuzları programına başlanmadan önce uzun bir süre geliştirilmiştir. 2014 yılında Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), *Saccharomyces* ve *Drosophila* testlerinin yanı sıra *in vitro* Programlanmamış DNA Sentezi (UDS) testleri gibi bir kaç test OECD yönergelerinden kaldırılmıştır. Bu testler nadiren kullanıldığı gözlemine ve aynı son nokta için daha iyi performans gösteren daha yeni testlerin mevcudiyetine dayanılarak yönergelerden silinmiştir (Cartus ve Schrenk, 2017; David, 2020; Guo, Seo, Li ve Mei, 2020; Steiblen ve diğerleri, 2020). Bir bileşiğin olası genotoksik ve/veya antigenotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılan bazı *in vitro* ve *in vivo* testler Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Genotoksik ve antijenotoksik ajanların tanımlanmasında kullanılan bazı testler
(Cartus ve Schrenk, 2017; OECD, 2021)

	Test	Model organizmalar	OECD klavuz kodları/referanslar
<i>In vitro</i> test metodları			
Mutajenite (ters mutasyon)	Ames testi, Ames fluktasyon testi	<i>Salmonella thyphimurium</i> , <i>Escheria coli</i>	OECD TG 471, Ames, Durston, Yamasaki ve Lee, 1973
Mutajenite (ileri mutasyon)	Hprt testi	Memeli hücre hatları	OECD TG 476
Mutajenite (ileri mutasyon/kromozomal hasar)	Timidin kinaz-/fare lenfoma testi	TK6 insan lenfoblastoid hücre hattı; L51178Y fare lenfoma hücre hattı	OECD TG 490
Kromozomal hasar	Kromozomal anormallik testi <i>in vitro</i>	Memeli hücre hatları	OECD TG 473
Kromozomal hasar	Mikronükleus testi <i>in vitro</i>	İnsan ve memeli primer lenfositler ve hücre hatları	OECD TG 487
DNA zincir kırıkları	Comet testi	Hücreler ve hücre hatları	Singh, McCoy, Tice ve Schneider, 1988
<i>In vivo</i> test metodları			
DNA zincir kırıkları	Comet testi	Memeli dokuları	OECD TG 489
DNA tamirinin indüksiyonu	Programlanmamış DNA sentezi <i>in vivo</i>	Memeli karaciğer hücreleri	OECD TG 486
Mutajenite (gen mutasyonu)	Transgenik rodent somatik ve germ hücresi gen mutasyon testleri	Transgenik rat ve fareler	OECD TG 488
Kromozomal hasar	Mikronükleus test <i>in vivo</i>	Memeli eritrositler/ kan hücreleri	OECD TG 474
Kromozomal hasar	Kromozom anormallikleri testi <i>in vivo</i>	Memeli kemik iliği ve memeli spermatogonial hücreler	OECD TG 475; OECD TG 483

Genotoksisite testlerinin bazı temel prensipleri vardır. Maksimum bilgi düzeyi minimum sayıda test ile elde edilmelidir. Bu yüzden testlerin çok yeterli ve verimli olması gerekmektedir. Bunun yanında genotoksisite testlerinin kapsamı potansiyel insan maruziyetinin kapsamı ile ilişkili olmalıdır. Son olarak, hayvanların sayısı veya kullanımı azaltılmalıdır. Bu da *in vitro* testlerin özellikle tercih edildiği anlamına gelmektedir (Steiblen ve diğerleri, 2020). Ancak, *in vitro* testlerden elde edilen biyolojik etkiler test edilen bileşiklerin gerçek toksisitelerini açıklamak için sınırlamalara sahiptir. Çünkü bu testler genellikle doğrudan *in vivo* maruziyet ile karşılaştırılabilir değildir (Liebsch ve diğerleri, 2000). *In vitro* ve *in vivo* durumlar arasındaki en belirgin farklardan biri Faz I metabolik süreçlerin yokluğudur. Metabolik süreçler test edilen bileşiklerin toksisitelerini saptamada önemli bir faktördür. Çünkü bu bileşikler Faz I sitokrom P450 monooksijenaz (CYP) enzimleri ve Faz II konjugasyon enzimleri (Glukuronosiltransferazlar, sülfotransferazlar ve glutatyon-S- transferaz) tarafından aktive edilebilirler veya detoksifiye edilebilirler (Lepri ve diğerleri, 2017; Shao ve diğerleri, 2020; Yoon, Campbell, Andersen ve Clewell, 2012; Yu, 2020). Bu nedenle *in vitro* sistemler, ana bileşiği metabolitlerine dönüştürebilen metabolik enzimlere sahip olmadıkça, yalnızca ana bileşiklerin toksikolojik potansiyelini belirleyebilmektedirler (Chitrangi, Nair ve Khanna, 2017; Shao ve diğerleri, 2020).

Metabolik aktivasyon, genetik toksisite değerlendirmelerinde çok önemli bir husustur. *Salmonella typhimurium* ve diğer mikroorganizmaların metabolik eksiklikleri nedeniyle, *in vitro* yöntemlerde metabolizma yokluğunun üstesinden gelebilmek için memeli aktivasyon sistemlerinden olan ve karaciğer dokusundan elde edilen homojenatlar kullanılarak farklı populasyonlardan enzimleri izole etmek amacıyla çeşitli fraksiyon protokolleri geliştirilmiştir. Genellikle S9 olarak adlandırılan post-mitokondriyal veya 9000 x g doku homojenat süpernatantları gibi memeli metabolik enzim preparatları, *in vivo* ksenobiyotik aktivasyonu ve detoksifikasyonu simüle etmek amacıyla *in vitro* kültürlerle eklenebilmektedir. Böylece *in vitro* biyo-testlerde memeli metabolizmasını uygulamak ve test edilen ana bileşiğe ait metabolitlerin etkilerinin saptanması mümkün olmaktadır (Cox, Fellows, Hashizume ve White, 2016; Ku ve diğerleri, 2007; Shao ve diğerleri, 2020; Wienkers and Heath, 2005).

Karaciğerden elde edilen S9 fraksiyonlar memeli hücrelerinin kullanıldığı *in vitro* genetik toksisite testlerinde de kullanılabilir. *In vitro* memeli hücresi genetik toksisite testlerinde genellikle metabolik olarak yetersiz olan ölümsüzleştirilmiş ve/veya transforme

edilmiş hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yukarıda bahsedilen prokaryotlar gibi, bu hücre hatları da bir eksojen metabolik enzim preparatı (S9 mikrozomal aktivatör) yokluğunda birçok pro-mutajeni aktive etme yeteneğine sahip değildir (Cox ve diğerleri, 2016). Bu nedenle, *in vitro* modellerde metabolizasyonu gerçekleştirebilmek için fareler, sıçanlar, balıklar, köpekler, maymunlar ve hatta insanlardan elde edilen çeşitli karaciğer türevli ürünler kullanılmaktadır (Shao ve diğerleri, 2020; Yoshihara ve diğerleri, 2004). Aslında S9 çeşitli dokulardan hazırlanabilmekle birlikte sıklıkla karaciğer tercih edilmektedir. Çünkü bu organ sitokrom P450 (CYP) tarafından katalizlenen reaksiyonlar aracılığıyla ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile yakından ilişkilidir (Guengerich, 1997).

Kimyasal ajanların potansiyel mutajenik ve genotoksik aktivitelerine yönelik taranmasında, testlerin hem S9 karışım yokluğunda hem de varlığında gerçekleştirilmesi *in vitro* protokollerin standart bir özelliği haline gelmiştir (Burlinson, 2012: 144). Günümüzde en sık tercih edilen *in vitro* genotoksisite testleri kromozomal anormallik (KA) testi, kardeş kromatid değişim (KKD) testi, mikronükleus (MN) ve comet testleridir (Doak, Manshian, Jenkins ve Singh, 2012; Izquierdo-Vega ve diğerleri, 2017; Steiblen ve diğerleri, 2020; Yüzbaşıoğlu, Çelik, Yılmaz, Ünal ve Aksoy, 2006). Bu testlerden bazıları indikatör testler (KKD ve comet testi) olup mutasyonlarla ilgili olarak doğrudan bir ilişki göstermezler. Bununla birlikte bu testlerin pozitif sonuç vermesi genotoksik etkiyi ortaya koymaktadır. KA ve MN testleri ise doğrudan mutajenite testleri olarak bilinmektedir (Topaktaş, 2014: 365, 376). Özellikle insan lenfositlerinin sıklıkla kullanıldığı bu testler için önerilen protokoller Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development- OECD) yönergelerinde mevcuttur (OECD, 2021). Memeli hücrelerinde *in vitro* kardeş kromatid değişimi testi OECD yönergelerinden çıkarılmış olmasına rağmen halen genotoksisite/antigenotoksisite değerlendirmelerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bu testler bitkisel özütlerin ve fitobileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılmasında da en sık tercih edilen yöntemler arasındadır.

2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik testi, ilaçlar, kozmetik, gıda katkı maddeleri ve fitobileşikler gibi geniş uygulama alanlarına sahip olan farklı türdeki ajanların güvenlik tahmini için hayati bir öneme sahiptir. Genotoksisite araştırmaları için Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından kabul edilen bu testte *in vitro* koşullarda (OECD-473) insan ve

kemirgenlerden köken alan hücre hatları veya primer hücre kültürleri (insan periferik kan lenfositleri ve Çin hamster fibroblast kökenli hücreler) kullanılmaktadır. Yanı sıra *in vivo* koşullarda koşullarda memeli kemik iliği (OECD-475) ve memeli spermatogonial (OECD-483) hücrelere uygulanabilmektedir (Cartus ve Schrenk, 2017; OECD, 2021).

Kromozomal anormallikler, kromozomlarda belirli segmentlerin kaybı, kazanımı veya bu segmentlerin yeniden düzenlenmesi yoluyla genetik materyalde meydana gelen değişimlerdir. Genellikle hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan bu anormallikler yapısal kromozom anormallikleri ve sayısal kromozom anormallikleri olarak iki ana kategoride değerlendirilmektedir. Yapısal kromozom anormallikleri kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, translokasyon, inversiyon ve izokromozomlar olarak gözlenirken, sayısal anormallikler öploid (poliploid gibi) ve anöploid (monozomi ve trizomi gibi) şeklinde ortaya çıkmaktadır. Kromozomal anormallikler DNA düzeyinde ortaya çıkan önemli hasarlar nedeniyle oluşmaktadır. Her hücre bölünmesi sırasında özellikle oksidan bileşikler tarafından DNA'da tek zincir kırıkları oluşmakta ve bu kırıkların yaklaşık olarak %1'lik bir kısmı çift zincir kırıklarına dönüştürülmektedir. DNA çift zincir kırıkları onarılmadığında veya yanlış onarıldığında hücre için ciddi bir tehdit oluşturur. Çünkü bu hasarlar kromozomal değişimlere ve hatta hücre ölümüne yol açarak genomik kararsızlığa sebep olabilmektedir. Kromozomal anormallik oluşumu, DNA çift zincir kırıkları sırasında oluşan ana değişimlerden biri olup moleküler mekanizması ve kromozomal hasara dönüşüm mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır (Jain, Singh, Dubey, Maurya ve Pandey, 2018a: 69, 92). Kromozomal anormalliklerin infertilite, farklı evrelerde gebelik kaybına ve yenidoğanlarda gelişimsel bozukluklara anlamlı bir katkısı bulunmaktadır. Bununla birlikte, birçok kanser türünde hem yapısal hem de sayısal kromozom anormalliklerin yaygın olduğu ve bu kromozomal kararsızlığın kanserlerin başlıca ayırt edici özelliklerinden biri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca özellikle insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik artışının genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın bir göstergesi olmasının yanı sıra artmış kanser riski ile doğrusal bir ilişki gösterdiği saptanmıştır (Avuloğlu-Yılmaz ve diğerleri, 2020; Bonassi ve diğerleri, 2008; Dhillon, Deo, Bonassi ve Fenech, 2021; Hagmar ve diğerleri, 1998; Jain ve diğerleri, 2018a; 69, 92).

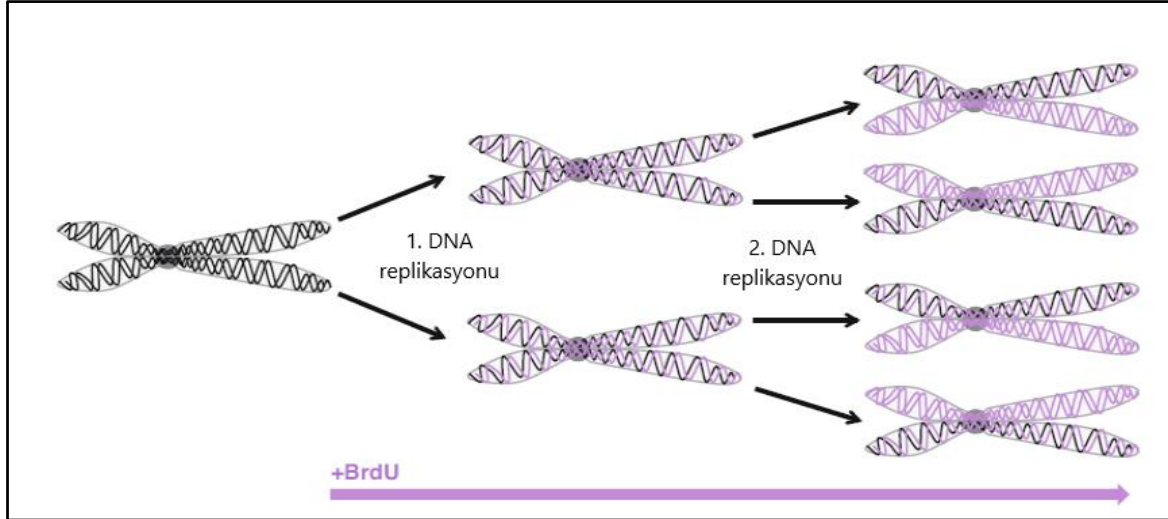
Genotoksik ajanlar, mutasyonları indükleyerek dolaylı olarak çift zincir kırıklarına veya nihayetinde kromozomal anormalliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu mutasyonlar

ya DNA zincir kırıkları, baz hasarı, bazların hidrolizi gibi doğrudan ya da DNA topoizomerazların inhibisyonu, ROT oluşumu gibi dolaylı mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır (Jain ve diğerleri, 2018b; 53, 54). Bunların yanı sıra birçok çalışmada antigenotoksik aktivitesi bulunan doğal bileşiklerin genellikle antioksidan mekanizmalar aracılığıyla kromozomları ve DNA'yı koruyarak genotoksik karsinogenlerin neden olduğu kromozom anormalliklerin frekansını azalttığı gösterilmiştir (Luca ve diğerleri, 2016; Sassi ve diğerleri, 2021; Sponchiado ve diğerleri, 2016; Roy, Chakrabarty, Sinha, Bhattacharya ve Siddiqi, 2003).

2.5.2. Kardeş kromatid değişim (KKD) testi

Kimyasal ajanların potansiyel 'kromozomal mutajenisitesini' belirlemek amacıyla 1970'lerden bu yana kullanılan kardeş kromatid değişim testi, 2 Nisan 2014 tarihinde test tarafından tespit edilen etkiye ait hareket mekanizmalarının anlaşılmasındaki eksikliklerden dolayı OECD test klavuzundan (OECD 479) çıkarılmıştır (OECD, 2015; Steiblen ve diğerleri, 2020; Stults, Killen ve Pierce, 2014; 440). Buna rağmen, hala fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirildiği araştırmalarda yaygın olarak kullanılan testlerden biridir (Avuloğlu-Yılmaz ve diğerleri, 2020; Laham, Khabour, Alzoubi ve Sadiq, 2019; Purushothaman, Sufiya, Meenatchi, Sundaram ve Saravanan, 2020; Yüzbaşıoğlu, Engüzel-Alperen ve Ünal, 2018).

KKD testi, DNA hasarının kantitatif ve kalitatif değerlendirmesi için iyi bir araç olup özellikle genotoksik ajanların, iki kardeş kromatid arasında meydana gelen DNA değişimlerini geliştirme yeteneklerini saptamada kullanılan bir tekniktir (Velickova ve Milev, 2020). Metafaz kromozomlarında bu olayları görsel olarak tespit etmek için, kromatidlerin farklı şekilde boyanması gerekmektedir. DNA replikasyonunun yarı korunumlu mekanizmasından yararlanılarak gerçekleştirilen bu teknikte, iki hücre döngüsü boyunca BrdU ile kültüre edilmiş olan hücrelerden elde edilen metafaz plaklarındaki kromozomlar UV ışığına maruz bırakılarak Giemsa ile boyanır. Bu aşamadan sonra Giemsa boyasına karşı farklı afiniteler üreten BrdU bazlı DNA fotodegradasyonu sayesinde kardeş kromatidlerde gözlenen boyanma farklılıkları KKD'lerin sitogenetik düzeyde saptanmasına izin verir (Şekil 2.3) (Perry ve Evans, 1975; Tumini ve Aguilera, 2021: 385; Wietmarschen ve Lansdorp, 2016).



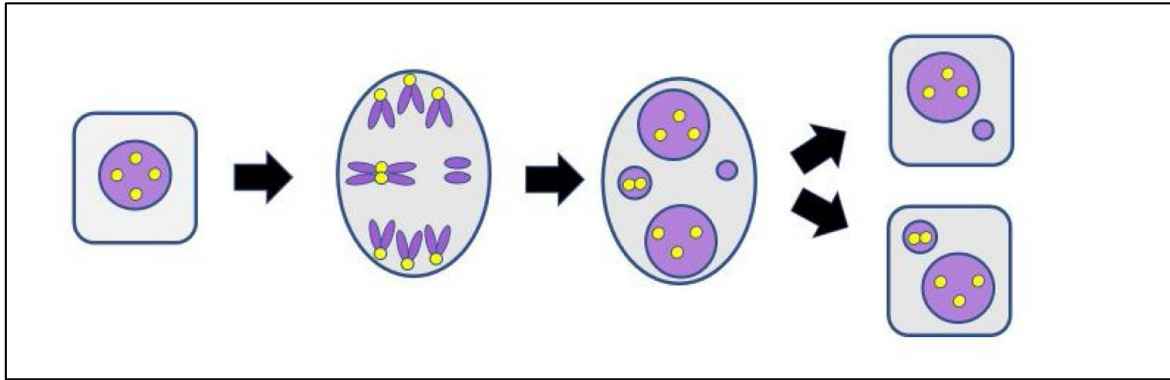
Şekil 2.3. BrDU'nun katılımı ile kardeş kromatidlerde gelişen süreç (Tumini ve Aguilera, 2021: 385)

Replikasyon mekanizmasını etkileyebilen ve DNA'da hasar oluşturabilen birçok genotoksik bileşiğe maruziyet sonucu ve hatalı DNA onarım mekanizmasına sahip olan bazı hastalıklarda (Bloom sendromu, Fankoni anemisi ve Kseroderma pigmentosum vb.) KKD frekansı önemli ölçüde artmaktadır (Salawu ve diğerleri, 2018; Velickova ve Milev, 2020). Sadece genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasar düzeyinin ölçülmesinde değil aynı zamanda olası antigenotoksik etkilerin anlaşılmasında da kullanılan KKD testinde, özellikle antioksidan kapasitesi bulunan doğal antimutajenik bileşiklerin KKD frekansını anlamlı oranda azalttıkları bildirilmiştir (Kumar ve diğerleri, 2020; Sassi ve diğerleri, 2021; Ünal, Taner, Yüzbaşıoğlu ve Yılmaz, 2013).

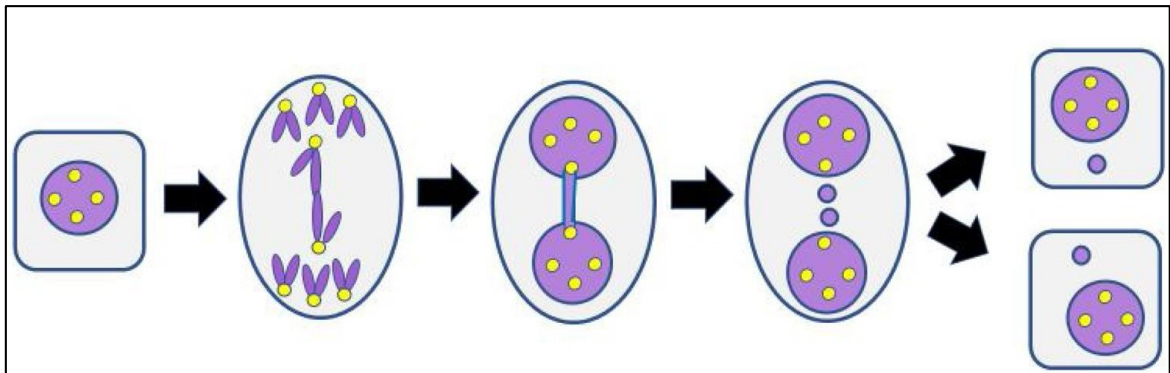
2.5.3. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus testi çeşitli maddelerin ve ajanların genotoksik potansiyellerini belirlemek için uluslararası düzeyde kabul görmekte olup *in vitro* (OECD 487) ve *in vivo* (OECD 474) yöntemleri içeren genotoksisite değerlendirmeleri için Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) tarafından önerilen bir test yöntemidir (OECD, 2021). Yöntemin temelini oluşturan binükleatların elde edilebilmesi için sitokinezin durdurulması gerekmektedir. Bu amaçla aktin filamentlerinin polimerizasyonu ve kontraktıl mikrofilamentlerinin oluşumu inhibe eden sitokalsin B (Cyt B) kullanılmaktadır. Bu sayede bölünen hücrelerde sitokinez engellenerek iki çekirdekli (binükleat) hücrelerin oluşumu teşvik edilir. Bu nedenle bu metoda “Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Testi” de denilmektedir (Sommer, Buraczewska ve Kruszewski, 2020; Topaktaş, 2014: 365, 376).

Mikronükleus frekansının belirlenmesi insanlarda DNA hasarı ve kromozomal kararsızlığın en çok incelenen biyobelirteçleri arasındadır. Mikronükleuslar, mitoz sırasında yavru çekirdeklerde bulunmayan kromozom fragmentleri veya tam bir kromozomdan köken almaktadırlar. Mikronükleus oluşumunun ana sebebi kromozom fragmentleri veya tüm kromozomlarda fonksiyonel sentromer kaybı ya da mitotik sistemin bir veya daha fazla proteininde oluşan kusurlar nedeniyle kromozomların düzgün bir şekilde ayrılmasında başarısız olunmasıdır (Şekil 2.4 ve 2.5). MN'de hapsolmuş olan kromozomların yüksek oranda fragmentasyona uğrayabildiğini ve büyük ölçüde yeniden düzenlenebildiğini gösteren yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Buna göre MN oluşumunun yalnızca indüklenmiş DNA hasarının bir biyobelirteci değil aynı zamanda hipermutasyonu harekete geçiren bir mekanizma olma olasılığı da bulunmaktadır (Fenech ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.4. Geri kalmış tüm bir kromozomun ve bir asentrik kromozom fragmentinin neden olduğu mikronükleus oluşumu (Fenech ve diğerleri, 2020)



Şekil 2.5. Sentromerlerinden hücrenin zıt kutuplarına çekilen bir disentrik kromozomun neden olduğu nükleoplazmik köprü ve bu köprünün birden fazla noktada kırılması sonucu ortaya çıkan fragmentlerden meydana gelen mikronükleus oluşumu (Fenech ve diğerleri, 2020)

Mikronükleus testleri olumsuz çevre, yaşam tarzı ve mesleki faktörlerin genotoksik etkilerini ve DNA hasarına genetik yatkınlığı araştırmanın yanısıra hızlanmış yaşlanma riskinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda mikronükleus frekansındaki artış ile kanser riski arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle gelişimsel bozukluklar ve kanser gibi genomik kararsızlığın etkilediği hastalıkların saptanmasında da mikronükleus ve diğer nükleer anormalliklerin frekansı ölçülmektedir (Bonassi ve diğerleri, 2008; Fenech ve diğerleri, 2020; Zaguia ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, son yıllarda antioksidan bileşiklerin genotoksik ajanlara karşı antogonistik etkilenin değerlendirildiği çalışmalarda, test edilen bileşiğin genotoksinlerin indüklediği mikronükleus ve diğer nükleer anormalliklerin frekansı üzerindeki azaltıcı etkilerinin ölçülerek antigenotoksik potansiyellerinin incelendiği araştırmalar da gerçekleştirilmektedir (Kocaman ve Asfuroğlu, 2021; López-Romero ve diğerleri, 2018).

2.5.4. Comet testi

İlk olarak 1984 yılında Ostling and Johanson tarafından nötral şartlar altında tek hücre seviyesinde DNA hasarını tespit etmek amacıyla bir mikrojel elektroforez tekniği geliştirilmiştir (Ostling ve Johanson, 1984). Bugün comet veya tek hücreli jel elektroforezi (SCGE), olarak bilinen bu teknik, daha sonra Singh ve diğerleri (1988) tarafından daha da geliştirilerek alkali şartlara (pH >13) modifiye edilmiş ve testin özgünlüğü ve tekrarlanabilirliğini önemli ölçüde artırılmıştır. Nötral comet testi çoğunlukla DNA çift zincir kırıklarının tespit edilmesine izin verirken, alkali comet testi DNA tek ve çift zincir kırıkları, alkali labil bölgeler, DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağları, eksik eksizyon tamir bölgeleri ile ilişkili DNA tek zincir kırıkları dahil olmak üzere daha küçük miktarlardaki DNA hasarlarına duyarlıdır (Cordelli, Bignami ve Pacchierotti, 2021; Lu, Liu ve Yang, 2017; Tice ve diğerleri, 2000). Genel olarak, testin prensibi bir elektrik alanda DNA fragmentlerinin nükleoid gövdenin (comet başı) dışına çıkması ve agaroz jelde bir DNA lekesi (comet kuyruğu) oluşturmastır. DNA hasarının boyutu boyanan ve tek hücreli elektroforez tarafından oluşturulan "kuyruklu yıldızlar (comet)" analiz edilerek belirlenebilmektedir (Lu ve diğerleri, 2017).

In vivo ve *in vitro* şartlarda gerçekleştirilebilen alkali comet testi prensip olarak tek hücrelerin/çekirdeklerin elde edilebildiği herhangi bir dokuya uygulanabilmektedir. Laboratuvarla kolaylıkla uygulanabilmesi, hızlı ve ekonomik olması bakımından tercih

sebebidir. Çok yönlü bir test olması nedeniyle, genotoksisite araştırmaları, insan biyoizlem çalışmaları, ekogenotoksikoloji ve temel araştırmalar dahil bir çok alanda kullanılmaktadır (Azqueta ve Collins, 2013; Cordelli ve diğerleri, 2021). DNA hasarı ve tamirini ölçmek amacıyla besinsel çalışmalar ve kanser araştırmalarında da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Gyori, Venkatachalam, Thiagarajan, Hsu ve Clement, 2014). *In vivo* comet testi Uluslararası Beşeri Kullanıma Yönelik Farmasötiklerin Teknik Gerekliliklerini Uyumlaştırma Konseyi (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use/ICH) ve aynı zamanda gıda ve hayvan yemlerindeki bileşiklerin genotoksisite değerlendirmeleri için Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority/EFSA) tarafından önerilmektedir (EFSA, 2011; Enciso ve diğerleri, 2018; ICH, 2011). Bununla birlikte, bu test ilk kez 2014 yılında OECD tarafından onaylanarak (OECD 489) yönergelere dahil edilmiş ve son versiyonu 29 Temmuz 2016'da kabul edilmiştir (Singh, 2016). Testin *in vitro* versiyonu ise, yeni kozmetiklerin, nanomalzemelerin ve ilaçların genotoksisite taramasında yaygın olarak kullanılmakla birlikte Avrupa Komisyonu'nun Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances-REACH) programı kapsamında kullanım için uygun bir test olarak önerilmektedir (Enciso ve diğerleri, 2018).

2.6. Tamamlayıcı, Alternatif ve Bütünleyici (İntegratif) Tıp

Konvansiyonel tıbbın yanı sıra tamamlayıcı ve alternatif tıbbın (TAT) tedavi seçenekleri ve son zamanlarda da bütünleyici (integratif veya entegratif) tıp onkoloji alanında fazlasıyla yer almaya başlamıştır (Münstedt ve Männle, 2020). Tamamlayıcı ve alternatif tıp (TAT), Ulusal Tamamlayıcı ve Bütünleyici Sağlık Merkezi (National Centre for Complementary and Integrative Health/NCCIH) tarafından “konvansiyonel veya allopatik tıbbın bir parçası olarak kabul edilmeyen çeşitli tıbbi ve sağlık bakım sistemleri, uygulamaları ve ürünleri” olarak tanımlanmaktadır (Albabbain, Alwhaibi, Alburaikan ve Asiri, 2018; Saghatchian ve diğerleri, 2014; White, 2020:500). Temel olarak “tamamlayıcı tıp” ve “alternatif tıp” terimleri birbirinin yerine kullanılmaktadır, ancak iki terim farklı kavramları ifade eder: “Tamamlayıcı” tedaviler konvansiyonel tıp ile birlikte kullanılan konvansiyonel olmayan uygulamalar olup, “alternatif” tedaviler konvansiyonel tıbbın yerine kullanılan yöntemlerdir. İster tamamlayıcı ister alternatif olsun NCCIH bu uygulamaları üç ana

kategoriye ayırmaktadır (Keene, Heslop, Sabesan ve Glass, 2019; NCCIH, 2021, Ng ve Kishimoto, 2021):

- 1- Besinsel yaklaşımlar, diyet takviyeleri, şifalı otlar, vitaminler, mineraller, probiyotikler ve mikrobiyal bazlı tedavileri içeren doğal ürünlerdir.
- 2- Psikolojik ve fiziksel yaklaşımlar, yoga, akupunktur, masaj terapisi, omurga manipülasyonu, sanat terapisi, müzik terapisi, dans gibi zihin ve beden uygulamalarını içermektedir.
- 3- Diğer tamamlayıcı sağlık yaklaşımları, geleneksel şifacı yöntemleri, Ayurveda tıbbı, geleneksel Çin tıbbı, homeopati ve naturopati gibi metodları içermektedir.

Bütünleyici (integratif) tıp, kişiyi yaşam tarzları tüm yönleriyle dahil olmak üzere bir bütün olarak (beden, zihin ve ruh) ele alarak, mevcut en iyi kanıtları kullanan tıp uygulamaları ve yaklaşımları olarak ifade edilebilir. Ayrıca bu yaklaşım hem konvansiyonel hem de tamamlayıcı/alternatif yaklaşımları kullanarak terapötik ilişkiyi vurgular (Kligler ve diğerleri, 2004; White, 2020:500). Başka bir deyişle bütünleyici sağlık bakımı, genellikle konvansiyonel ve tamamlayıcı yaklaşımları koordineli bir şekilde bir araya getirmektedir (NCCIH, 2021).

Son yıllarda Tamamlayıcı veya Alternatif Tıp yöntemlerinin halk arasındaki popülaritesi giderek artmaktadır. Özellikle kanser hastaları arasında son derece yaygın hale gelen bu yaklaşım hem hastalığı tedavi edeceği düşüncesi ile hem de klasik tedavilerin (kemoterapi, radyoterapi) neden olduğu yan etkilerle mücadele etmek amacıyla sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır. Örneğin, Amerika Birleşik Devletlerinde kanser hastalarının %80'den fazlası ve Avrupa'daki kanser hastalarının ise %50'den fazlasının bu alternatif yöntemleri konvansiyonel tıp ile beraber veya konvansiyonel tıbbın yerine kullandıkları bildirilmiştir (Blaheta, Nelson, Haferkamp ve Juengel, 2016; Huebner ve diğerleri, 2014; Saghatchian ve diğerleri, 2014).

2.7. Kemoprevensiyon ve Önemi

Kanser oluşumunun her aşamasında karsinogenez ile mücadele etmeyi amaçlayan tüm önlemler, 'kemoprevensiyon' terimi altında toplanmıştır (Janda, Taukin, Kałduńska ve Jakubczyk, 2019). İlk kez 1976 yılında Michael Sporn tarafından kullanılan

kemoprevensiyon terimi hem kanserojen ve mutajenlere karşı hem de kanserlere karşı mücadelede oldukça tercih edilir hale gelmiştir. Basitçe ‘Kemoprevensiyon’ invaziv kanserlerin ortaya çıkmasına neden olan neoplastik süreçlerin gelişimini veya ilerlemesini tersine çevirebilen, baskılayabilen veya önleyebilen doğal, sentetik ya da biyolojik bileşiklerin kullanımı olarak tanımlanmıştır (Sporn, 1976; Surh, 2003; Kotecha, Takami ve Espinoza, 2016; Suvarna ve diğerleri, 2020). Karsinogenezin çok aşamalı süreçleri temel alınarak üç ana kemoprevensiyon süreci tanımlanmıştır;

- Birincil (anti-inisiyasyon) kemoprevensiyon
- İkincil (anti-promosyon ve anti-progresyon) kemoprevensiyon
- Üçüncül kemoprevensiyon

Birincil kemoprevensiyon kanserin başlangıç aşamasını engelleyen ajanların kullanımını ifade etmektedir. Bu nedenle ilaç metabolize edici enzimlerden Faz I inhibisyonu ve Faz II indüksiyonu, serbest radikallerin/nihai karsinojenlerin süpürülmesi, DNA tamirinin başlatılması önemli anti-inisiyasyon kemopreventif hareket mekanizmalarıdır (Janda ve diğerleri, 2019; Kuo, Chen ve Chiang 2012; Maru, Hudlikar, Kumar, Gandhi ve Mahimkar 2016; Żakowicz-Miętkiewicz, 2021). İkincil kemoprevensiyon prekanseröz koşulları saptayarak tümör büyümesini durdurmayı ve tanımlanmış premalign lezyonların tedavisine yardımcı olmayı amaçlamaktadır (Janda ve diğerleri, 2019; Żakowicz-Miętkiewicz, 2021). Hücre döngüsünün durdurulmasıyla klonal gelişmenin inhibisyonu, sinyal transdüksiyonu, inflamasyon, anjiyojenez modülasyonu ve apoptoz indüksiyonu, temel anti-promosyon kemopreventif hareket mekanizmalarını temsil etmektedir (Kuo ve diğerleri, 2012; Maru ve diğerleri, 2016). Üçüncül kemoprevensiyonda ise kanserin tekrar nüksetmesini engellemek hedeflenir. Ayrıca terapötik etkinin sürdürülmesinde ve kemoterapinin desteklenmesinde rol oynamaktadır (Janda ve diğerleri, 2019; Żakowicz-Miętkiewicz, 2021).

Kemopreventif ajanlar Wattenberg (1985) tarafından ‘Blok edici ajanlar’ ve ‘Baskılayıcı ajanlar’ olmak üzere iki ana kategoride sınıflandırılmıştır. Blok edici ajanlar (inisiyasyon inhibitörleri, birincil kemoprevensiyon), detoksifikasyon enzimlerini indükleyerek veya karsinojen oluşumunu bloke ederek hareket ederler. Yani karsinogenezin başlangıç (inisiyasyon) aşamasını engellerler. Baskılayıcı ajanlar (ikincil kemoprevensiyon) ise, hücre bölünmesini yavaşlatarak, apoptozisi indükleyerek ve hücrelerin neoplastik farklılaşmasını

inhibe ederek kanser gelişimine (promosyon) ve ilerlemesine (progresyon) karşı koyarlar (Wattenberg, 1985; Surh, 2003).

Çevresel kemopreventif bileşikler arasında insanların sürekli ve uzun süre maruz kalmaları, yüksek toleransları, düşük toksisiteleri ve sahip oldukları birçok biyolojik aktiviteleri dolayısıyla insan diyetinden türevlenen ajanlar kemoprevensiyon için ana hedefler haline gelmişlerdir (Maru ve diğerleri, 2016; Patel, Garg, Erande ve Maru, 2007; Surh, 2003). Son yıllarda meyvelerde, sebzelerde ve bitkilerde bulunan doğal fitobileşikler tümör oluşumuna ve gelişimine müdahale etme potansiyelleri nedeniyle özel ilgi görmektedir. Besinsel olmayan bitki ikincil metabolitleri olan bu fitobileşiklerin çoğu sahip oldukları farmakolojik özellikler nedeniyle kemoprevensiyon stratejileri geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Ruiz ve Hernández, 2016).

2.8. Bitki Metabolitleri

Bitkilerde birincil ve ikincil olmak üzere başlıca iki tür metabolit üretilmektedir. Birincil metabolitler, büyüme ve gelişme için gerekli olup her bitkide bulunmaktadır. İkincil metabolitler ise bitki birincil metabolitlerinden türetilmekle birlikte çeşitli fizyolojik, hücresel ve biyokimyasal işlevlere sahiptirler. Ayrıca bu doğal bileşikler tıbbi bitkilerin tedavi edici özelliklerinden sorumludurlar (Hidalgo ve diğerleri, 2018; Guerriero ve diğerleri, 2018; Sharanya, Sabu ve Haridas, 2020: 7). İkincil metabolitler, metabolizmanın düzenlenmesinde (fotosentez, fotorespirasyon ve ATP üretimi vb.), büyüme (organların gelişimi vb.) ve diğer birçok süreçlerde (simbiyoz gelişimi, hücre sinyalizasyonu ve tozlaşma vb.) önemli roller oynamaktadır (Bourgaud, Gravot, Milesi ve Gontier, 2001; Chen ve diğerleri, 2020). Türlerine, dokuya, organa ve hücreye özgüdürler. Patojen ve herbivorlara karşı, belirli stres şartlarında ve fertilizasyon veya tohum dağıtımı için böcek ve hayvanları çekmek gibi şartlara özgü olarak üretilmektedirler (Hidalgo ve diğerleri, 2018; Guerriero ve diğerleri, 2018; Sharanya ve diğerleri, 2020: 7).

2.8.1. Allelokimyasallar

İkincil metabolitlerin en önemli alt gruplarından biri 'Allelokimyasal' olarak isimlendirilmektedir. Bu biyokimyasallar donör bitkilerin rekabet etmesine ve alıcı organizmaların (alıcı bitkiler) gelişimini etkilemeye yardımcı olmaktadır. Allelokimyasallar,

esas olarak donör bitkilerin kök, tohum, çiçek ve yapraklarından sentezlenmektedir (Latif, Chiapusio ve Weston, 2017; Schandry ve Becker, 2020). Allelokimyasal bileşikler diğer organizmaların büyümesini, gelişimini, fizyolojisini, davranışını ve yaşam döngülerini etkilemek amacıyla çevreye salınırlar. Bu fenomen yaygın olarak 'allelopati' olarak bilinmektedir (Latif ve diğerleri, 2017).

Allelokimyasal etkiler alıcı organizma için uyarıcı veya zararlı olabilmektedir. Bu nedenle allelokimyasallar hedef organizma topluluğunda faydalı etkiler oluşturabileceği gibi diğer organizmaların gelişmesine ve hayatta kalmasına müdahale ederek zararlı da olabilmektedir (Ashraf, Sultana, Yaqoob ve Iqbal, 2017; Farooq, Abbas, Tanveer ve Jabran, 2020). Hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı koruma geliştirmenin yanı sıra, allelokimyasal metabolitler ateş düşürücü, anti-kanser, antioksidan, anti-diyabetik, immünosupresif, anti-fungal, anti-inflamatuar, antimalarial, anti-bakteriyel, insektisidal, nematisidal ve anti-viral etkili ajanların önemli bir kaynağıdır (Akram ve diğerleri, 2014; Borges ve diğerleri, 2016).

2.8.2. Bitki Toksinleri (Fitotoksinler)

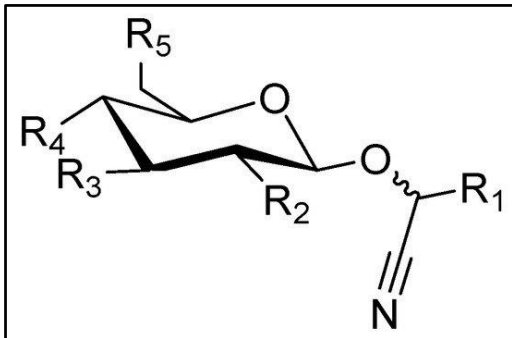
Allelokimyasallara benzer şekilde fitotoksinler de bitkilerde kimyasal olarak sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Bu fitobileşikler, ayrıca bitki zehirleri, fitokimyasallar ve bitki allelokimyasalları olarak da adlandırılmaktadırlar. Bitkiler, bu toksinleri biyotik (örn. haşereler, böcekler, patojenler ve parazitler) ve çevresel (sıcaklık, pH, nem, tuz oranı, kuraklık gibi) streslere karşı savunma ajanları olarak sentezlemektedirler. Ek olarak, fitotoksinler bitkinin büyümesini ve hayatta kalmasını desteklemekte, aynı zamanda büyümeyi artıran ajanlar ve savunma proteinleri olarak görev yapmaktadırlar (Bucheli, 2014). Kimyasal olarak küçük organik moleküllerden büyük peptidler ve proteinlere kadar çok çeşitli yapısal özellikler sergileyen bu bileşikler, alkaloidler, siyanojenik glikozitler, terpenler, poliketitler, glukozinolatlar, peptidler, kumarinler, flavonoidler ve fenolik bileşikler gibi farklı ailelere dahil edilebilmektedirler (Chen ve diğerleri, 2020; Wink, 2003).

Fitotoksinlerin bir kısmı çeşitli bitki türlerinin yenilebilir kısımlarında yer almakla birlikte insanlar tarafından sıklıkla tüketilebilmektedir. Litaratüre göre meyve, sebze ve diğer bitki bileşenlerinde tanımlanan birçok fitotoksin bulunmaktadır. Bu doğal bileşikler genellikle belirli maruziyet düzeylerinde güvenli kabul edilmektedir. İnsanlar tarafından gıda olarak tüketilebilen fitotoksinlerin kanser, hipertansiyon ve diyabet gibi ciddi hastalıklara karşı

terapötik etkilere sahip olabildiği bilinmektedir. Ancak bu toksinler potansiyel karsinojenite ve tümör teşvik edici aktivitelerinin yanında ölümcül etkilere de sahip olabilmektedir. Buna rağmen bitki toksinleri, ilaç tasarımları ve hastalıkların teşhisi için model oluşturma rolünü üstlenebilmektedir (Bucheli, 2014; Kasali ve diğerleri, 2021: 32; Peres ve diğerleri, 2013). Kimyasal yapılarına bağlı olarak fitotoksinler, ribozom inaktive edici proteinler (RIP'ler), protein olmayan amino asit toksinler, terpenler, alkaloidler ve siyanojenik glikozitler olarak sınıflandırılabilir (Chen ve diğerleri, 2020).

2.9. Siyanojenik Glikozitler

Siyanojenik glikozitler veya α -hidroksinitril glikozitler, nitril ve şeker içeren glikolise bir bitki sekonder bileşik grubudur. Aynı zamanda fitoantispinler (phytoanticipins) adı verilen ve mikroorganizma hücumundan önce bitkide var olan veya enfeksiyon sonrası üretilen bir bitki antibiyotığıdır (Borges ve diğerleri, 2016; VanEtten, Mansfield, Bailey ve Farmer, 1994; Wang, Sandroock ve VanEtten, 1999). Siyanojenik glikozitler, bir aglikon ve bir şeker parçası olmak üzere iki ana kısımdan oluşur (Şekil 2.6). R1, aglikon kısmını temsil etmekte olup R2, R3, R4 ve R5, bir glikosidik bağ ile ya monosakkarit (glikoz) ya da disakkarit (gentiobioz) şekerlerin bağlandığı olası ornatik pozisyonları temsil eder. Aglikon kısmı, bir alifatik, siklik, aromatik veya heterosiklik kısma bağlı bir nitril grubundan oluşur. Siyanojenik glikozitlerin aglikonları, aşağıdaki amino asitlerden birinden başlayarak biyosentezlenir: fenilalanin, tirozin, valin, izolösin, lösin, 2-(2'-siklopentenil)-glisin ve 2-(2'-hidroksi-3'siklopentenil)- glisin (Cressey ve Reeve, 2019; Yulvianti ve Zidorn, 2021).



Şekil 2.6. Siyanojenik glikozitlerin temel yapısı (Yulvianti ve Zidorn, 2021)

Siyanojenik glikozitlerin doğada siyanojenik monosakkaritler olarak bulunmaktadırlar, ancak alternatif olarak (R)-amygdalin, (R)-vicianin ve linustatin gibi siyanojenik

disakkaritler de oldukça yaygındır (Kende, 1989; Ndubuisi ve Chidiebere, 2018). İnsanlar tarafından gıda olarak tüketilen bazı siyanojenik glikozitler ve bunların üretildiği bitkisel kaynaklar Çizelge 2.3’de listelenmiştir.

Çizelge 2.3. İnsanların gıdalarında bulunan önemli siyanojenik glikozitler ve bitkisel kaynakları (Cressey ve Reeve, 2019)

Glikozitler	Bulunduğu Besinler
Amygdalin	Bademler, çiğ fındık, elma, kayısı, kiraz, şeftali vb. meyve çekirdekleri
Prunasin	Bademler, elma, kayısı, kiraz, şeftali vb. sert ve yumuşak çekirdekli meyveler
Dhurrin	Sorgumlar
Linustatin	Manyok (Cassava), keten tohumu
Linamarin	Manyok, lima fasulyesi, keten tohumu, ıspanak
Lotoustralin	Manyok, lima fasulyesi, keten tohumu
Sombunigin	Baklagiller ve mürver meyvesi
Taksifilin	Bambu filizi

3000 ila 12,000 bitki türünün siyanojenik glikozit ürettiği tahmin edilmekle birlikte *Compositae*, *Araceae*, *Passifloraceae* ve *Rosaceae* familyalarına ait birçok bitkide bulunmaktadır (Ndubuisi ve Chidiebere, 2018; Mosayyebi ve diğerleri, 2020; Poulton, 1990). Siyanojenik glikozitlerin acı tatları ve bitki dokusunun parçalanması sonucunda toksik hidrojen siyanür salınımı nedeniyle herbivorlara karşı savunmada bitkilerde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (Iriti ve Faoro, 2009). Bitkilerin yenilebilir kısmı, ağızda ısıtılarak yumuşatıldıktan sonra katabolik intraselüler enzim β -glukosidazın salınmasını takiben hidrolize olan siyanojenik glikozitler, hidrojen siyanür (HCN), glikoz, keton veya benzaldehitlere ayrılmaktadır (Bolarinwa, Oke, Olaniyan ve Ajala; 2016: 181; Chaouali ve diğerleri, 2013).

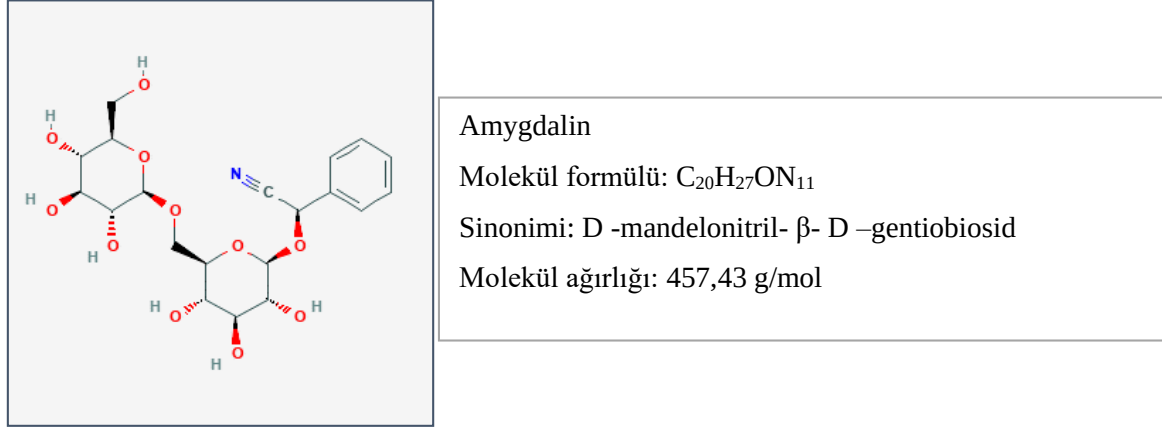
Çoğunlukla bitkilerin yenilebilir kısımlarında bulunan yaklaşık 25 siyanojenik glikozit tanımlanmıştır (Çizelge 2.3). Kayısı çekirdeği, şeftali çekirdeği, manyok, badem, bambu filizi, sorgum, keten tohumu dünya çapında insanlar tarafından gıda veya bitkisel ilaç olarak tüketilmekte olan ana siyanojenik bitkilerdir (Kolesár, Halenár, Kolesárová ve Massányi,

2015; Nyirenda, 2020). Bu bitkilerin tüketiminin doza bağılı olarak hem akut hem de subakut sağlık sorunlarına neden olduğu bildirilmiştir. Siyanojenik glikozitlerin potansiyel toksisitesi, akut siyanür zehirlenmesine neden olan hidrojen siyanürün üretilmesini sağlayan enzimatik bozunmadan kaynaklanmaktadır. Akut siyanür toksisitesinin insanlarda vücut ağırlığı baz alındığında 0,5 ve 3,5 mg/kg arasındaki dozlarda ortaya çıkabildiği bildirilmiştir (Bolarinwa, Orfila ve Morgan, 2014; Speijers, 1993). Akut siyanür zehirlenmesinin klinik semptomları arasında hızlı solunum, kan basıncında düşüş, hızlı nabız, baş ağrısı, baş dönmesi, kusma, ishal, zihinsel karışıklık, sersemlik, oksijen eksikliği nedeniyle ciltte mavi renk değişikliği, seğirme ve konvülsiyonlar yer almaktadır (Cressey ve Reeve, 2019; Speijers, 1993). Yüksek dozlarda maruz kalınması sonucunda solunum yetmezliği ve kardiyovasküler çöküş ölümcül olabilmektedir (Akintonwa, Tunwashe ve Onifade, 1994; Burns, Bradbury, Cavagnaro ve Gleadow, 2012).

2.9.1. Amygdalin

Bir siyanojenik diglikozit olan Amygdalin (D-mandelonitril- β -gentiobiosid; sinonim: D-mandelonitril- β -D-glukozido-6- β -D-glukozit), kayısı (*Prunus armeniaca*), şeftali (*Prunus persica*), acı badem (*Prunus amygdalus amara*), elma (*Malus pumila*), kiraz (*Prunus avium*), erik (*Prunus domestica*) gibi *Rosaceae* bitki tohumlarında bulunan ve dağılımı bakımından kozmopolit bir bileşiktir (He ve diğerleri, 2020; Milazzo, Lejeune ve Ernst, 2007; Santos-Pimenta, Schilthuizen, Verpoorte ve Choi, 2014). Örneğin, kayısı çekirdeğinde yaklaşık olarak %3,6 ve %5,2 arasındaki bir oranda bulunabilmektedir; genellikle tatlı kayısı çekirdeklerinde bulunmazken acı kayısı çekirdeklerindeki konsantrasyonu (5,5 g/100 g) çok yüksek olabilmektedir (Femenia, Rossello, Mulet ve Canellas, 1995; Tanaka, Nitta ve Nagatsu, 2014). Acı badem çekirdeğinde yaklaşık olarak 50 g/kg (%3–5) (Lee ve diğerleri, 2013), şeftali çekirdeğinde ise %2,7-%3,1 oranında bulunmaktadır (Tanaka ve diğerleri, 2014). Buna karşın, elmalardan (*Malus domestica*) elde edilen tohumların Amygdalin içeriği 1-4 g/kg arasında değişmektedir (Bolarinwa, Orfila ve Morgan, 2015). Ek olarak, Amygdalin pirinç, olgunlaşmamış şeker kamışı, sorgum, bazı fındık türleri ve yam (tatlı patates) benzeri bitkilerde de Linamarin gibi diğer siyanojenik glikozitlerle birlikte kombinasyon halinde bulunmaktadır (Oke, 1979; Osuntokun, 1980; Saidu, 2004). Amygdalin kimyasal olarak iki glikoz molekülüne bağlı anti-neoplastik bir bileşik olan bir hidrosiyanik asit ve analjezik etkisi bulunan bir benzaldehit molekülü içermektedir (Şekil

2.7) (Isozaki, Matano, Yamamoto, Kosaka ve Tani, 2001; Kolesar ve diğerleri, 2018; Omelka ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.7. Amygdalin'in kimyasal yapısı ve özellikleri (PubChem, 2021a)

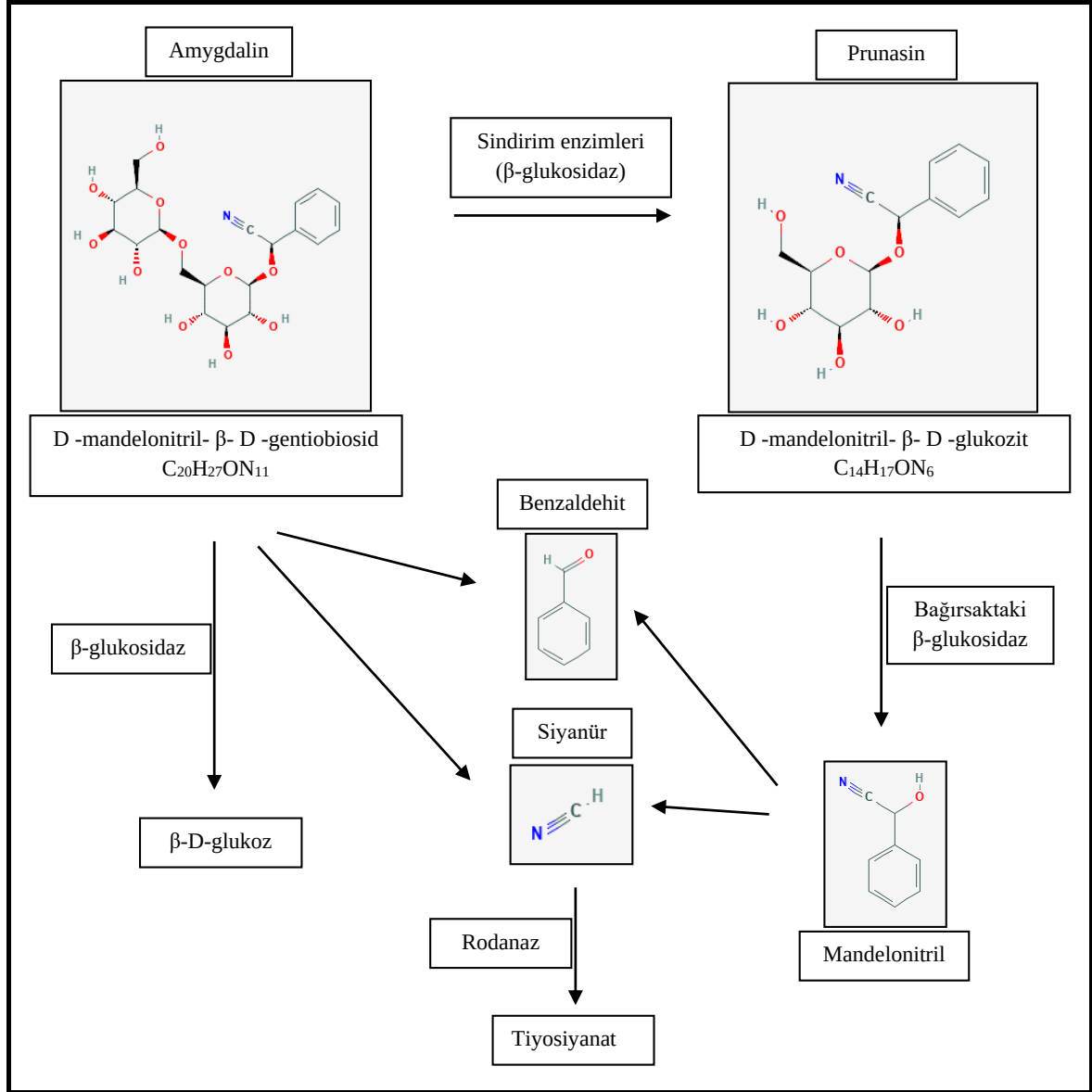
2.9.2. Amygdalin'in metabolizması

Strugala, Rauws ve Elbers (1986), Amygdalin'in farmakokinetiği ile ilgili yaptıkları çalışmada oral olarak uygulanan Amygdalin'in iki farklı metabolik yola girebileceğini ileri sürmüşlerdir. İlk yolak bağırsağın proksimal kısmında terminal glükoz rezidüsünün enzimatik $\beta(1-6)$ -glukosidaz aktivitesi sayesinde ayrılarak Amygdalin'in, prunasine metabolize olması karaciğer öncesi veya 'ilk geçiş' metabolizmasıdır. İkincisi ise bağırsak mikrobiotasına ait olan β -glukosidaz tarafından glukoz, siyanür ve benzaldehide doğrudan metabolize olmayı içermektedir (Şekil 2.8) (Oduwale ve Abdelnaser, 2020).

Freese, Brady ve Gal (1980), insan dokularındaki β -glukosidaz enziminin esas olarak memeli dokusunun nötr pH sitozolünde bulunması, bakteriyel β -glukosidazın ise asidik lizozomlarda lokalize olması nedeniyle 'ilk geçiş' etkisinden sorumlu olan memeli dokularındaki β -glukosidazın, son hidrolizden sorumlu olan bakteriyel β -glukosidazdan farklı olabileceğini öne sürmüştür. Araştırmacılar, antibiyotik uygulamasını takiben bağırsak biotasına gerçekleşen azalmanın, Amygdalin'in prunasine hidrolitik bölünmesini etkilenmediğini ancak, Amygdalin'in benzaldehit ve siyanüre total hidrolizinin baskılandığını göstererek bu ön görüşü doğrulamışlardır. Bu sonuca dayanarak bağırsak bakterilerinden elde edilen β -glukosidazın, Amygdalin'in benzaldehit ve siyanüre hidrolizini büyük ölçüde etkilediği için Amygdalin metabolizmasında baskın bir rol oynadığı bildirilmiştir (Blaheta ve diğerleri, 2016; Strugala ve diğerleri, 1986). İntravenöz olarak

uygulanan Amygdalin, siyanür veya benzaldehit üretimine neden olmadığı, ancak oral uygulamanın önemli kan siyanür düzeylerine yol açtığı göz önüne alınacak olunursa bakterilerin hidrolitik rolü doğrulanmaktadır (Moertel ve diğerleri, 1981; Newton, Schmidt, Lewis, Lawrence ve Conn, 1981).

Gastrointestinal kanalda kalan prunasin β -glukosidaz tarafından mandelonitrile ayrışabilir. Mandelonitril kararsızdır ve son ürün olarak benzaldehit ve siyanüre dönüşmektedir. Amygdalin uygulanmasından yaklaşık 1,5–2 saat sonra kandaki maksimum düzeyine ulaşan siyanür, eliminasyon hızı dakikada yaklaşık 17 $\mu\text{g/kg}$ olacak şekilde rodanaz (sinonim: tiyosülfat sülfür transferaz) ve 3-merkaptopiruvat sülfür transferaz tarafından katalize edilen sülfürasyon ile tiyosiyanata (SCN^-) hızlıca detoksifiye edilir (H. Z. Hill, Backer ve G. J. Hill, 1980; Zagrobelny ve diğerleri, 2004). Tiyosiyanat ağırlıklı olarak idrar ile vücuttan dışarı atılırken, küçük bir kısmı format (HCOO^-) ve karbondioksit (CO_2) olarak çıkarılmaktadır (Blaheta ve diğerleri, 2016; Singh, Rao ve Bhattacharya, 2013). Siyanür oldukça toksiktir, mitokondriyal sitokrom oksidaz a3'ün Fe^{+3} 'üne bağlanır, böylece elektron taşıma zincirini ve oksidatif metabolizmayı bloke eder. Oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu sonunda hücrel ATP tükenerek laktik asidoz ile aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçişe neden olmaktadır (Deng ve diğerleri, 2021; Mani ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.8. Amygdalin metabolizasyon yolağı (Blaheta ve diğerleri, 2016; PubChem, 2021b)

2.9.3. Amygdalin'in toksik etkileri

Sıçanlarda oral olarak uygulanan Amygdalin'in ortalama letal dozu (LD_{50}) 880 mg/kg'dır (Adewusi and Oke, 1985). Yine sıçanlarda intravenöz enjeksiyon ve intragastrik uygulamalarda elde edilen LD_{50} konsantrasyonları sırasıyla 25 g/kg ve 0,6 g/kg olup intraperitoneal enjeksiyon sonucu LD_{50} dozu 8 g/kg olarak belirlenmiştir. Farelerde intravenöz enjeksiyon ve intragastrik uygulama sonrası saptanan LD_{50} konsantrasyonları ise sırasıyla 25 g/kg ve 887 mg/kg'dır (He ve diğerleri, 2020). Bunların yanı sıra, fare, tavşan ve köpek için Amygdalin'in maksimum tolerans konsantrasyonları intravenöz veya

intramüsküler enjeksiyon sonrası 3 g/kg olup bu değer intragastrik uygulamada 0,075 g/kg olarak bulunmuştur (Mu, 2002; Rauws and Olling, 1982; Zhang and Jin, 1986).

Akut toksisite araştırmalarına göre Amygdalin'in oral olarak uygulanmasının, intravenöz enjeksiyona göre yaklaşık 40 kat daha fazla toksisiteye neden olacağını göstermiştir. Buna göre Shragg, Albertson ve Fisher (1982) 500 mg/kg'lık Amygdalinin intravenöz enjeksiyonu sonrasında deney hayvanlarında ölüme neden olmadığını, ancak aynı konsantrasyonun intragastrik uygulamasını takiben 48 saat içinde hayvanların %80'inin öldüğünü göstermişlerdir (He ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü klinik denemelerinden birinde, kanser tedavisi gören 6 hastaya 7 günlük bir süre boyunca günde 3 kez 0,5 g Amygdalin verilmesi sonucu kan siyanür düzeylerinde artış gözlenmiştir. Yine ilave olarak 6 kanser hastasına 21 gün boyunca günde 4,5 g/m² dozda (günde yaklaşık 120 mg/kg vücut ağırlığı) Amygdalin intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Sonuçta kandaki siyanür konsantrasyonu "esasen tespit edilemez" olarak tanımlanmış olup, toksik yan etkiler kaydedilmemiştir (FAO/WHO, 2012; Moertel ve diğerleri, 1981). Tüm bunların aksine insanlarda 4 g/gün Amygdalin oral olarak 15 gün veya intravenöz olarak 1 ay süreyle uygulandığında sistemik toksisiteye neden olabildiği bulunmuştur (Carter, McLafferty ve Goldman, 1980). Ancak günlük olarak uygulanan oral doz aralığı 0,6–1 g olacak şekilde ayarlandığında veya Amygdalin kullanımı sonlandırıldığında toksik etkilerden kaçınılabileceği bildirilmiştir (Song and Xu, 2014).

Amygdalin normalde toksik olmayan bir bileşiktir ancak oral olarak alınan dozlarda çeşitli enzimlerin hareketi altında önce prunasine, son olarak da hidrojen siyanüre (HCN) ayrışmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı ve Çevre Koruma Ajansı tarafından 50-60 kg ağırlığındaki bir yetişkin için günlük oral HCN dozu sırasıyla 0,6-0,72 mg, 0,18-0,22 mg ve 6-7,2 mg olarak tanımlanmıştır (He ve diğerleri, 2020). 1 gram Amygdalin'den 59 mg HCN serbest bırakılabilmektedir (Wahab, Breitbach, Armstrong, Strattan ve Berthod, 2015). Bu açıdan bakıldığında Amygdalin'in oral uygulamasını takiben siyanür zehirlenmesine neden olan ciddi yan etkilerin gelişme olasılığı oldukça yüksektir. Birçok çalışmada yüksek miktarlarda tüketilen acı bademlerin ve kayısı çekirdeklerinin hem çocuk hem de yetişkinlerde siyanür zehirlenmelerine neden olabildiği belirtilmiştir (Akyıldız, Kurtoğlu, Kondolot ve Tunç, 2010; Mouaffak ve diğerleri, 2013). Toksikoloji Komitesi'ne göre siyanürün insanlar için letal dozu yaklaşık 0,5-3,5 mg/kg olarak ifade edilmiştir (Speijers, 1993). Bu bağlamda 50 adet acı badem tüketiminin yetişkinler ve 5-10

adet acı badem tüketiminin küçük çocuklar için ölümcül olduğu bildirilmiştir (Chaouali ve diğerleri, 2013; He ve diğerleri, 2020). Öte yandan Amygdalin'in diğer bileşiklerle etkileşiminden kaynaklanan toksisitesi olduğu saptanmıştır. Amygdalin'in C vitamini ile beraber tüketildiğinde hastalarda siyanür toksisitesinin arttığı gözlenmiştir. Gerçektende C vitamininin Rodanaz enzim aktivitesini azaltarak, HCN detoksifikasyonunu engellediği ve siyanür detoksifikasyonunu kolaylaştıran, kükürt içeren amino asit sisteinin kandaki düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Basu, 1983; Bromley, Hughes, Leong ve Buckley, 2005; Mosayyebi ve diğerleri, 2020).

Yapılan çalışmalar Amygdalin'in oral uygulanması ile kandaki Amygdalin konsantrasyonunun düştüğünü, siyanür konsantrasyonunun ise arttığını göstermektedir. Ayrıca plazmada sadece Amygdalin'in metaboliti olan prunasine rastlandığı bildirilmiştir (Blaheta ve diğerleri, 2016). İntravenöz enjeksiyon sonrasında ise Amygdalin'in kanda konsantrasyonu yükseldiği bulunmuş ve neredeyse hiç siyanür saptanmamıştır. Amygdalin prototipi prunasin plazmada tespit edilebilmiştir. Ek olarak İntravenöz infüzyondan sonra, Amygdalin ağırlıklı olarak orijinal formunda idrarla atılırken, en yüksek atılım oranına infüzyondan 2 saat sonra ulaşıldığı belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2014; He ve diğerleri, 2020). Bütün bu araştırmalar, Amygdalin'in intravenöz infüzyonunun gastrointestinal sistemdeki enzimatik bozunmayı atlayabildiğini ve Amygdalin'in yıkımı ile ilişkili siyanür toksisitesi oluşturmadığını, ancak oral uygulamanın önemli oranda kan siyanür düzeylerine neden olabileceğini göstermektedir (Mani ve diğerleri, 2019).

2.9.4. Amygdalin'in anti-kanser tarihi

Anti-kanser tedavisinin savunucuları, Amygdalin'in tümöre özgü aberasyonlardan dolayı tümör hücrelerinde seçici siyanür zehirlenmesine neden olduğunu savunmaktadır. Detoksifiye edici enzim rodanaz kaybına bağlı olarak zenginleşen β -glukozidazın etkilerine dayanan bu kanıtlanmamış teoriye göre, Amygdalin'i son ürün olan hidrosiyanik asite hidrolize eden β -glikosidaz enzimleri tümör hücrelerinde, normal hücrelerdekine kıyasla 1000-3000 kat daha yüksek aktivite göstermektedir. Enzim aktivitesindeki bu farklılık neoplastik aktiviteye sahip tümör hücrelerinde aşırı miktarlarda serbest hidrosiyanik asit biriktirmesine izin verir. Hidrosiyanik asidin daha ileri detoksifikasyonu sonucu tiyosiyanat oluşur. Bu reaksiyonda görev alan mitokondriyal enzim rodanaz ise normal dokularda daha aktifken kanser hücrelerinde neredeyse önemsiz bir aktiviteye sahiptir. Bu nedenle, bol

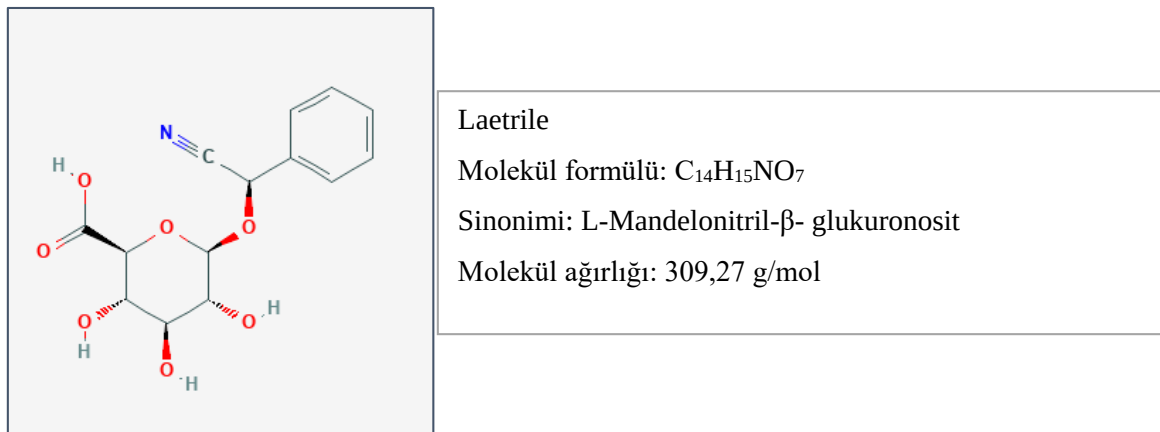
miktarda siyanür salınımı sağlayan β -glukosidaz aktivitesi ile birlikte siyanür detoksifiye edici rodanaz enzim aktivitesi eksikliğinin kombinasyonu aracılığıyla Amygdalin'in normal hücreler üzerinde önemli bir zararlı etkisi olmaksızın kanser hücrelerinin öldürülmesi için seçici bir avantaj sağlayabileceği öne sürülmektedir. Bu ilginç hücre öldürme yaklaşımından yararlanılarak, insan tümörlerine karşı bir anti-kanser ajan olarak Amygdalin kullanımı için birçok girişimde bulunulmuştur (Abboud, Al Awaida, Alkhateeb ve Abu-Ayyad, 2019; Liczbiński ve Bukowska, 2018).

İlk olarak iki Fransız kimyacı Robiquet and Boutron-Charlard tarafından 1830'larda izole edilen (Dorr ve Paxinos, 1978) Amygdalin'in, bir kanser hastası üzerinde ilk kez denenmesi Rusya'da 1845 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu denemeye ait raporlar etkisiz ve toksik olduğu sonuçları içermekle beraber pozitif sonuçlara da yer vermektedir. 1920 yılında ABD'de de kanser hastalarına benzer bir tedavi girişimi uygulanmıştır. Ancak Amygdalin oldukça toksik cevaplara neden olmuş ve kanseri tedavi etmek için kullanımı terkedilmiştir (Chandler, Anderson ve Phillipson, 1984; Milazzo ve Horneber, 2015; Abboud ve diğerleri, 2019). Daha sonra 1950'lerde Ernst T. Krebs (Dr. Krebs'in oğlu) tarafından yarı sentetik, daha az toksik ve enjekte edilebilir bir formu geliştirilmiştir (Liczbiński ve Bukowska, 2018).

Amygdalin'in yarı sentetik türevi olan ABD patentli Laetrile'nin (L-mandelonitril- β -glukuronid) kimyasal bileşiminin, Meksikalı üreticiler tarafından ezilmiş kayısı çekirdeklerinden üretilen Laetrile/Amygdalin'den (D-mandelonitril- β -gentiobiosid) farklı olduğu bildirilmiştir (Dorr ve Paxinos, 1978; Milazzo ve Horneber, 2015). Ancak, Ulusal Kanser Enstitüsü, Meksika'da Cyto Pharma tarafından üretilen oral ve enjekte edilebilir Amygdalin'in saflığına ilişkin gerçekleştirdikleri analizlerde her iki ürünün de ABD farmasötik ürün standartlarını karşılamadığını göstermişlerdir (Davignon, Trissel ve Kleinman, 1978; Song ve Xu, 2014). Bu nedenle Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay alınamamıştır. Buna rağmen, 1978 yılına kadar 70.000 Amerikalı kanser hastasının Amygdalin'i (Laetrile) tamamlayıcı ve alternatif bir tedavi olarak kullandığı ve 1970'lerde en çok tercih edilen anti-kanser yaklaşımlarından biri haline geldiği bildirilmektedir (Dorr ve Paxinos, 1978; He ve diğerleri, 2020; Milazzo ve diğerleri, 2007; Moss, 2005). Bunun üzerine etkinliğini araştırmaya karar veren Ulusal Kanser Enstitüsü, 22 hastadan 6'sında iyi terapötik etki gözlemlendiği, ancak bu kanıtların Amygdalin'in anti-kanser etkilerini desteklemek için yetersiz olduğunu bildirmiştir (Ellison, Byar ve Newell, 1978). Daha sonra

FDA 1979 yılında, Amygdalin'ın ilaç olarak kullanılamayacağını ve toksisitesinin kanıtlandığını açıklamıştır (Bitting, 1978; He ve diğerleri, 2020; Shishkovsky, 1980). Amygdalin ve metabolik tedavi alan 178 kanser hastası ile yapılan incelemelerde, tedavi, kanser stabilizasyonu, kanser ile ilişkili semptomların iyileştirilmesi veya yaşam süresinin uzatılması açısından önemli bir fayda gözlenmediği ileri sürülmüştür. Sonuçlar Amygdalin'ın antikanser aktivitesi gösterme konusunda başarısız olduğunu ve bunun yerine siyanür zehirlenmesine ait yan etkilerin ortaya çıktığını açıklamaktadır (Moertel ve diğerleri, 1982). Böylece, Laetrile'in yüksek dozlarda karaciğer hasarı, sinir hasarı, ateş ve koma gibi yan etkilere sebep olduğu ve etkili bir anti-kanser tedavisi göstermede başarısız olduğu bildirilmiştir. Bu verilere dayanılarak ve toksisite geliştirme potansiyeli sebebiyle FDA kararıyla Laetrile'in Amerika ve Avrupa'da anti-kanser ajanı olarak kullanımından vazgeçilmiş ve yasaklanmıştır (Curran, 1980; Song ve Xu, 2014). İngiltere'de ise siyanogenetik maddeler "yalnızca reçeteye satılan ilaçlar" olarak kabul edilmekte ve ancak tıbbi gözetim altında reçete edilebilmektedirler. Buna karşın, laetrile özellikle Meksika'da antikanser terapisi olarak üretilmeye ve uygulanmaya devam edilmektedir (Moss, 2005; Milazzo ve diğerleri, 2007, Milazzo ve Horneber, 2015).

Amygdalin'ın sinonimi olarak sıklıkla 'Laetrile' ve 'Vitamin B-17' terimleri de kullanılmaktadır. Ancak Amygdalin'ın bir vitamin olmadığı ve laetrieden de kimyasal olarak farklı bir bileşik olduğu ifade edilmektedir (Fenselau ve diğerleri, 1977). Laetrile ise laevorotatör ve mandelonitrilin akronimi olup Amygdalin yapısının bir bölümünü paylaşan yarı sentetik bir moleküldür ve mandelonitrile bağlı sadece bir glikoz molekülünden oluşmaktadır (Şekil 2.9) (Blaheta ve diğerleri, 2016; Liczbiński ve Bukowska, 2018).



Şekil 2.9. Laetrile'nin kimyasal yapısı ve özellikleri (PubChem, 2021c)

Geleneksel olarak, tıbbi materyallerdeki kimyasal bileşiklerin ekstraksiyon yöntemi su ile kaynatılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak kayısı çekirdeklerinden Amygdalin eldesi için kullanılan yaygın tekniklerde bir kısım Amygdalin'in, epimeri olan neoamygdalin'e dönüştüğü saptanmıştır (Lv, Ding ve Zheng, 2005). Bu nedenle ezilmiş kayısı çekirdeklerinden elde edilen doğal ürünlerde Amygdalin veya neoamygdalin olduğu bildirilmiştir. Doğal Amygdalin, aktif form olarak kabul edilen dekstrorotator (R) konfigürasyon (R-amygdalin) göstermektedir. İnaktif (S) izomeri olan neoamygdalin (L-mandelonitrile- β -gentiobiosid) ise doğada oluşmamaktadır (Blaheta ve diğerleri, 2016; Takayama ve Kawai, 1984; Young, Pyo, Hoon ve Hee, 2003). D-amygdalin'in kaynar suda neoamygdaline epimerize olduğu bulunmuştur. Bir teoriye göre, kanser tedavisindeki etkinliği üzerinde literatürde önemli bir çelişkisi bulunan (Koeffler, Lowe ve Golde, 1980; Moertel ve diğerleri, 1982; Newmark ve diğerleri, 1981) Amygdalin'in, sudaki etkisiz epimeri olan neoamygdaline değişimi nedeniyle tartışmalı sonuçlara sebep olduğu düşünülmektedir (Takayama ve Kawai, 1984; Young ve diğerleri, 2003). Bu nedenle araştırmacılar, neoamygdalinin antitümör aktivitesi olmadığı için D-amygdalinin suda epimerizasyon yoluyla neoamygdaline dönüşmesini önlemek amacıyla yöntemler geliştirilerek maksimum ekstraksiyon verimini elde etmişlerdir (Koo ve diğerleri, 2005; Kwon, Lee ve Hong, 2010; Yan, Tong, Li ve Lou, 2006; Young ve diğerleri, 2005).

2.9.5 Amygdalin'in anti-kanser etkileri

Amygdalin İtalya, Japonya, Çin ve Amerika gibi 20 ülkede geleneksel yöntemlerle kanser tedavisi için üretilmiş ve kullanılmıştır (Qadir ve Fatima, 2017). FDA tarafından yasaklanmış olmasına rağmen, Amygdalin'in alternatif tıpta kanserin önlenmesi, ateşin hafifletilmesi ve öksürük giderici olarak kullanıldığını bildirilmiştir. Ayrıca migren, hipertoni, kronik iltihaplanma, astım, bronşit, amfizem, cüzzam, diyabet, kolorektal kanser ve vitiligo'nun önlenmesi ve tedavisi için uygulandığı da bilinmektedir (Halenár, Medved'ová, Maruniaková, Packová ve Kolesárová, 2014; A. Todorova, Pesheva, Iliev, Bardarov ve T. Todorova, 2017; Yan ve diğerleri, 2006).

Amygdalin'in, anti-fibroz (Chen, Hu, Mou, Wang ve Xie, 2021; Guo, Wu, Sheng, Yang ve Tan, 2013; Zhang ve diğerleri, 2018), anti-inflamasyon, analjezik etki (Hwang ve diğerleri, 2008), yardımcı antikanser etkisi (Song ve Xu, 2014), immünoregülasyon (Baroni ve diğerleri, 2005), anti-ateroskleroz (Jiagang ve diğerleri, 2011; Zhao ve Yang, 2012), anti-

ülser (Cai, Li ve Zhong, 2003; Song ve Xu, 2014) ve anti-diyabet etkilerini (Heikkila ve Cabbat, 1980; Mirmiranpour ve diğerleri, 2012) içeren farmakolojik etkileri yıllar boyunca iyi bir şekilde belgelenmiştir. Ek olarak, sperm hiyalüronidaz aktivitesini ve sperm hareketliliğini inhibe edebildiği (Tanyıldızı ve Bozkurt, 2004), yumurtlamayı teşvik edebildiği (Halenar, Medvedova, Maruniakova ve Kolesarova, 2015), endometriyozisi hafifletebildiği (Doğru ve diğerleri, 2017) ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için imkân sunabileceği açıklanmıştır (Cheng, Yang, Zhao, Tse ve Rong, 2015).

Son yıllarda ‘alternatif kanser tedavileri’ arasında en sık tercih edilen tedavilerden biri haline gelen Amygdalin’in, antikanser etki mekanizması ile ilgili birçok veri bulunmasına rağmen bu veriler tartışmalıdır. Yapılan literatür taramasında Amygdalin’nin antikanser aktivitesinin incelendiği pek çok çalışmaya ulaşılmıştır. Bu çalışmalarda Amygdalin’in anti-kanser aktivitesine sahip olduğunu gösteren oldukça fazla çalışma bulunmakla birlikte özellikle 70-85’li yıllara ait çalışmalarda tümör büyümesini engellemede başarısız olduğunu bildirenler de bulunmaktadır. Örneğin, iki farklı fare modeli çalışmasında Amygdalin’in anti-tümör aktivitesi tek başına ve aktive edici bir ajan olan beta-glukozidaz enzimi ile birlikte, transplantasyon yapılan kemirgen tümörlerine (Ridgway osteojenik sarkom, Lewis akciğer karsinoması, P388 lösemi, L1210 lenfoid lösemi, B16 melanoma ve Walker 256 karsinosarkomu) karşı değerlendirilmiştir. Amygdalin’in tek başına tümör sistemlerinin herhangi birine karşı önemli antitümör aktivite göstermediği bulunmuştur. Benzer şekilde Amygdalin ve beta-glukozidaz kombinasyonunun da bu üç tümör sistemine karşı antitümör etkinlik göstermediği saptanmıştır. Ayrıca beta-glukosidaz ile Amygdalin’in eşzamanlı kombinasyon halinde verildiği tüm çalışmalarda letal toksisite gözlenmiştir. Araştırmacılar, Amygdalin’in test edilen tüm konsantrasyonlarının sıçanlarda ve farelerde solid osteojenik sarkom, melanoma, karsinosarkom, akciğer tümörleri ve lösemiye etkilemediğini belirtmişlerdir. Ancak Amygdalin ile tedavi edilen bazı hayvan gruplarının yaşam sürelerinde hafif bir artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Laster ve Schabel 1975; Wodinsky ve Swiniarski, 1975).

G. J Hill, Shine, H. Z. Hill ve Miller (1976) parenteral Amygdalin’in anti-kanser aktivitesini incelemişler ve 50 ile 5000 mg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda intraperitoneal olarak implante edilen B16 melanomalı C57BL/6 fareleri ve BW5147 lenfatik lösemili AKR farelerinde kanser gelişimi üzerine bir etkisi olmadığını saptamışlardır. Ayrıca en yüksek konsantrasyonlarda (4000-5000 mg/kg) toksisiteye bağlı ölümlere neden olduğu

bildirilmiştir. Araştırmacılar parenteral (i.p) Amygdalin'in çalışılan fare tümörleri için etkisiz bir anti-kanser ajanı olduğu yorumunu yapmışlardır.

Stock, Tarnowski, Schmid, Hutchison, ve Teller (1978) 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene tarafından indüklenen rat meme karsinomu ve farklı tümör hücrelerinin sarkom 180, plazma hücresi tümörü LPC-1, lösemi L1210, Mekka lenfosarkomu, Ridgway osteojenik sarkom, sarkom T241, meme karsinomu E0771, Konik karaciğer tümörü, Ehrlich karsinoması ve Walker karsinosarkomu 256 transplantasyonu yapılan hayvan modellerine 6 gün boyunca Amygdalin (500 ve 1000 mg/kg/gün, intraperitoneal) uygulamışlardır. Amygdalin'in tümör inhibisyonuna neden olmadığını gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise ticari olarak Laetrile adını alan Amygdalin'in anti-tümör aktivitesi BDF1 farelerinde P388 lenfositik lösemi ve P815 mast-hücre lösemi kullanılarak araştırılmıştır. Birinci ve beşinci günlerden sonra 200 mg/kg ila 2,000 mg/kg arasında değişen konsantrasyonlar kullanılmıştır. En yüksek Amygdalin konsantrasyonlarında bile P388 veya P815 tümörü taşıyan farelerin ömrünün uzamadığı açıklanmıştır (Chitnis, Adwankar ve Amonkar, 1985).

Son yıllarda Amygdalin'in anti-tümör etkisi üzerine giderek artan bir ilgi bulunmaktadır. Birçok çalışma prostat kanseri, akciğer kanseri, mesane kanseri, kolon kanseri ve rektum kanseri üzerindeki terapötik etkilerini ortaya koymuştur. Ancak metabolik yolda son ürün olarak zehirli benzaldehit ve hidrosiyamik aside ayrılan prunasin ve mandelonitril ürettiği için tartışmalı bir anti-tümör tedavisi olarak kabul edilmektedir (He ve diğerleri, 2020, Liczbiński ve Bukowska, 2018; Shi ve diğerleri, 2019; Song ve Xu, 2014).

2.9.6. Amygdalin'in genotoksik ve antigenotoksik etkileri

Amygdalin'in insan lenfosit kültüründe potansiyel genotoksik ve antigenotoksik etkilerini inceleyen herhangi bir araştırmaya ulaşamamıştır. Bu tez çalışmasında Amygdalin'in insan lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkileri ilk kez araştırılmıştır. Yanı sıra Amygdalin'in ait olduğu fitotoksin grubu siyanojenik glikozitler ile ilgili olarak da herhangi bir genotoksisite veya antigenotoksisite çalışmasına rastlanılmamıştır. 2012 yılında JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi), siyanojenik glikozitlerin genotoksisitesine dair hiçbir bilgi bulunmadığı sonucuna varmıştır (FAO/WHO, 2012). Aynı şekilde CONTAM Paneli (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), izole siyanojenik glikozitlerin genotoksisitesi ile

ilgili herhangi bir çalışma tanımlamamıştır (CONTAM Paneli, 2019). Ancak genotoksisite/mutajenisite testlerinin kullanıldığı ve çeşitli model organizmalar ile gerçekleştirilen Amygdalin veya Amygdalin içeriği oldukça fazla olduğu düşünülen kayısı ve şeftali çekirdeği özütlerinin etkinliğini üzerine gerçekleştirilen farklı araştırmalar bulunmaktadır.

Amygdalin'in mutajenik/antimutajenik ve rekombinojenik etkilerinin *Saccharomyces cerevisiae* test sistemi (diploid D7ts1 suşları) kullanılarak incelendiği bir araştırma da Amygdalin'in farklı konsantrasyonları (25, 50 ve 100 µg/mL) değerlendirilmiş olup bu konsantrasyonların sitotoksik ve mutajenik bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca Amygdalin'in bir alkilleyici ajan olan metil metansülfonata (MMS, 16 mM) karşı ön muamelesinde, MMS tarafından indüklenen ters mutasyon frekansını azaltarak tüm konsantrasyonlarda anti-mutajenik etki gösterdiği bulunmuştur. Özellikle 100 µg/mL'lik Amygdalin'in ön muamelesi hücre canlılığının iki katına çıkmasına ve MMS tarafından indüklenen ters mutasyon frekansının azalmasına neden olmuştur. Buna dayanılarak Amygdalin konsantrasyonlarının hem hatalı hem de hatasız rekombinasyon olaylarını aktive ederek alkilleyici ajanların neden olduğu mutasyonları önleyebildiği öne sürülmüştür. Aynı çalışmada Amygdalin'in kanserojenik heksavalent kroma (CrVI, 5mM) karşı yine ön-muamele protokolü ile anti-karsinojenik aktivitesi maya temelli *in vivo* bir test (Ty1 test, *S. cerevisiae* 551 suşları) ile araştırılmıştır. Amygdalin CrVI tarafından indüklenen transpozisyon oranını üç kat (25 ve 50 µg/mL) ve dört kat (100 µg/mL) oranında azaltarak anti-karsinojenik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle Amygdalin'in CrVI gibi güçlü bir oksidatif stres ajanının teşvik ettiği retrotranspozisyon olaylarını azaltabildiği tahmin edilmektedir. Ayrıca Amygdalin'in tümörigenezin başlangıç aşamaları ile ilişkili olan mitotik gen konversiyonunun indüklenmesi, ters mutasyonlar, mitotik kros-over ve Ty1 retrotranspozisyon gibi değişimlere neden olmadığı açıklanmıştır (Todorova ve diğerleri, 2017).

Vitamin B17'nin (Amygdalin) Ehrlich asit karsinomunun neden olduğu karaciğer ve renal toksisitesi üzerine iyileştirici etkilerinin incelendiği iki farklı çalışmada 100 mg/kg Vitamin B17 intramusküler olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada yalnızca Vitamin B 17 uygulanan grubun yanı sıra, vitamin B17 uygulandıktan 2 hafta sonra Ehrlich asit karsinom hücrelerinin intraperitoneal olarak transfer edildiği (ön muamele) bir grup ve aynı gün karsinom hücreleri ile vitamin B17'nin 2 hafta süre ile uygulandığı (eş zamanlı muamele) başka bir grup

bulunmaktadır. Uygulama süreleri tamamlandıktan sonra karaciğer ve böbrekler DNA hasarı açısından comet testi ile değerlendirilmiştir. Vitamin B17'nin tek başına DNA hasarını önemli oranda etkilemediği, ancak ön ve eş zamanlı uygulamalarda Vitamin B17'nin Ehrlich asit karsinomun neden olduğu artmış DNA hasarını anlamlı oranda azalttığı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre vitamin B17'nin Ehrlich asit karsinom tarafından indüklenen karaciğer ve böbrek hasarına karşı potansiyel bir koruyucu olduğu bildirilmiştir (Mutar ve diğerleri, 2020; Tousson ve diğerleri, 2020).

Başka bir çalışmada ise vitamin B17'nin farelerde Ehrlich solid tümör üzerine etkileri comet testi ile değerlendirilmiştir. Yalnızca vitamin B17 (175 mg/kg, oral olarak, 2 hafta) uygulanan grubun yanı sıra, farelere subkutan olarak Ehrlich asit karsinom hücreleri transferi yoluyla solid tümör oluşumunu takiben 2 hafta süre ile vitamin B17 uygulanan bir başka grup da çalışmada yer almaktadır. Vitamin B 17'nin tek başına önemli düzeye DNA hasarı oluşturmadığı, ancak tümörlü dokularda vitamin B 17'nin DNA hasarını anlamlı oranda azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda Amygdalin'in (vitamin B17) Ehrlich solid tümör tedavisi üzerinde faydalı olabileceği açıklanmıştır (El-Masry, Al-Shaalan, Tousson, Buabeid ve Al-Ghadeer, 2020).

Amygdalin'in DNA hasarı üzerine etkilerinin comet testi ile incelendiği bir çalışmada, kirlilik oranı oldukça yüksek olan Augusta limanından (Syracuse, İtalya) toplanan *C. julis*'den alınan kan örnekleri, Amygdalin (100 µM, 200 µM) ile muamele edilmiştir. Hiçbir uygulama yapılmayan kan örneklerinde yüksek düzeyde DNA hasarı belirlenirken, Amygdalin'in bu hasarı önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur. Amygdalin'in DNA onarım kapasitesini uyararak DNA'yı koruma özelliğini tetiklediği yorumu yapılmıştır (Di Mauro, Ferrito, Scifo, Renis ve Tomasello, 2017).

Curlej, Halenar, Kolesarova, Curlejova ve Chrenek (2016)'in Amygdalin'in anöploidi üzerine olası etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, bir grup hayvana (tavşan) izole Amygdalin intramusküler olarak (P1: 0,6 mg/kg; P2: 3 mg/kg) uygulanırken, diğer gruplar ticari diyet ve kayısı çekirdeği (P3: 60 mg/kg, P4: 300 mg/kg) karışımıyla 1 ay süre beslenmiştir. Sonuç olarak, Amygdalin'in tavşan kan hücrelerinde anöploidi oluşumu üzerine önemli bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir.

Yamamoto, Osaki, Kato ve Miyazaki (1992), kayısı tohumu (*Armeniaca semen-Prunus armeniaca* L.), şeftali tohumu (*Persicae semen -P. persica* Bat.), kiraz (*P. avium* L.), erik (*P. salicina* Lindle) ve badem (*P. dulcis* Mill) tohumlarının hekzan özütlerinin anti-mutajenik etkilerini Ames/Salmonella/mikrosom testi kullanılarak incelemişlerdir. Kayısı ve şeftali tohumu hekzan özütlerinin benzo[a]piren (B[a]P) mutajenitesini önleyebildiği, ancak kiraz, erik ve badem tohumlarının aynı etkiyi göstermediği bildirilmiştir. Ayrıca kayısı ve şeftali tohum özütlerinin 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b] indol (Trp-P-1) ve 2-2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) akrilamid (AF-2) kimyasallarının neden olduğu mutajenik etkileri de önleyebildiği saptanmıştır.

Şeftali çekirdeği (*Prunus persica* L.) metanol özütlerinin siklofosfamidin (SF) yan etkilerini azaltmadaki etkisini inceleyen bir çalışmada fareler beş farklı gruba ayrılmıştır. Negatif kontrol (hiç bir uygulama yapılmayan) grubu, pozitif kontrol (75 mg/kg SF, intraperitoneal uygulama) grubu, şeftali çekirdeği özütünün (500 mg/kg) uygulandığı bir grup ayrıca SF (75 mg/kg, i.p) muamelesinden sonra şeftali çekirdeği özütlerinin (500 ve 250 mg/kg) uygulandığı gruplar oluşturulmuştur. Şeftali çekirdeği özütleri ardarda 5 gün süre ile oral olarak uygulanmıştır. İlk üç grupta son uygulamadan 24 saat sonra toplanan kemik iliği örnekleri, 4. ve 5. gruplardan 1, 2, 7 ve 14 gün sonra elde edilmiştir. Özütlerin SF'ye karşı etkinliğini saptamak amacıyla mikronükleus ve kromozomal anormallik testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre, SF'nin tek başına mikronükleus ve kromozomal anormallik frekanslarını önemli ölçüde artırarak genotoksik olduğu bulunmuştur. Şeftali özütü tek başına kontrol grubuna kıyasla yüksek oranda kromozomal sapma ve önemli toksisite göstermiştir. Bunun nedeninin şeftali özütlerinin içerdiği Amygdalin'in metabolizması sonucu açığa çıkan siyanür olabileceği öne sürülmüştür. Şeftali özütlerinin ise SF'nin neden olduğu hasarı büyük ölçüde azalttığı saptanmıştır. Şeftali metanolik özütlerin SF'nin neden olduğu genetik hasarı hafifleterek koruyucu bir etki gösterdiği ifade edilmiştir (Salah, Aboul-Ela ve Swelim, 2019).

Acı kayısı çekirdeği (*Semen Armeniacae amarum*, SAA) Çin tıbbında balgam söktürücü ve anti-astmatik aktivitelerinden dolayı uzun süredir akut alt solunum yolu enfeksiyonu ve astımı kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. SAA sulu özütlerin (3,906; 7.812; 15,625; 31,25; 62,5; 125 ve 1000 mg/ mL) mutajenitesinin standart ve iki farklı modifiye Ames testi kullanılarak incelendiği bir çalışmada *S. typhimurium* TA100 ve TA98 suşları kullanılmıştır. Standart Ames testi sonuçları SAA'nın mutajenik etkisi ile ilgili olarak pozitif sonuçlar

ortaya koymuştur. Ancak modifiye edilmiş petri birleştirme ve modifiye edilmiş sũspansiyon Ames testlerinde SAA mutajenitesine ilişkin olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir. Standart Ames testinin SAA'nın mutajenitesini değerlendirmek için uygun olmadığı aşıklanmıştır. Elde edilen pozitif sonucun SAA işeriğinde bulunan histidin işeriğinden kaynaklanmış olabileceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte modifiye edilmiş iki Ames testi sonuçları SAA'daki histinin etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Bu iki modifiye edilmiş Ames testinde yanlış pozitif sonuç dışlanmıştır. Bu alışma ile SAA'nın *in vitro* test sisteminde mutajenik etkili olmadığı belirlenmiştir. Ancak bu sonucun daha fazla deneysel veri ile desteklenmesi gerektiği yorumu yapılmıştır (Jin ve diğerleri, 2009).

Amygdalin metabolitleri ile ilgili olarak ise yalnızca siyanũr genotoksisitesi ile ilgili çalışmalara ulaşılabilmıştir.

De Flora (1981) *Salmonella typhimurium*'da ters mutasyonlar için potasyum siyanũrũn (KSN) negatif etkili olduğunu bildirmiştir. Ancak Kushi ve diğerleri (1983) yine *S. typhimurium*'da hidrojen siyanũrũn (HCN) dũřũk oranda mutajenik olduğunu aşıklamışlardır. Bir başka çalışmada ise *in vitro* sıçan timositlerinde siyanũrũn neden olduğu DNA hasarı araştırılmış ve KSN'ye (1.25–10 mM) maruz bırakılan timositlerde hem doza hem de zamana bağlı (1-24 saat) olarak siyanir sitotoksisitesinin eşlik ettiği DNA hasarı belirlenmiştir (Bhattacharya ve Rao, 1997).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

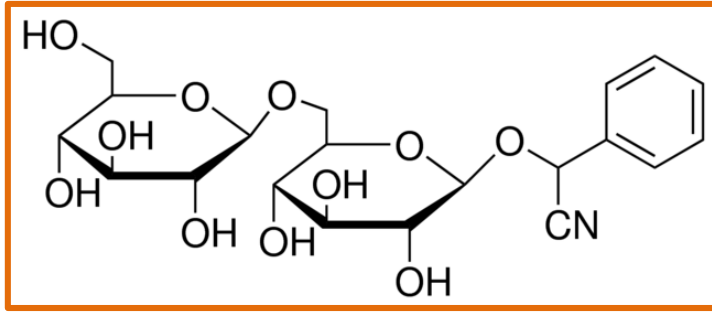
Bu çalışmada Amygdalin'in genotoksik ve antigenotoksik potansiyelini *in vitro* insan periferik lenfositlerinde metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda ve varlığında farklı test sistemleri kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve izole insan lenfositleri kullanılarak comet testleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Amygdalin'in antigenotoksik aktivitesi Mitomisin-C (MMC) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2) adlı genotoksinlere karşı üç farklı antigenotoksisite uygulama protokolü (ön, eş ve geç zamanlı muamele) kullanılarak incelenmiştir. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında ise kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri uygulanmış olup, Siklofosfamid (SF) adlı genotoksik ajana karşı eş zamanlı muamele protokolü kullanılarak antigenotoksisite değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırma Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 27.03.2017-87 tarih ve sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı olmayan ve bir genotoksik bir ajana maruz kalma öyküsü bulunmayan 18-27 yaş arası gönüllülerden temin edilmiştir. Metabolik aktivatör yokluğunda gerçekleştirilen çalışmalarda üç farklı gönüllü (iki kadın bir erkek) kullanılırken, metabolik aktivatör kullanılarak yapılan çalışmalarda iki farklı donör (bir kadın ve bir erkek) kullanılmıştır.

3.1.1. Test materyalleri

Amygdalin

Bu çalışmada kullanılan Amygdalin'in kayısı çekirdeğinden elde edilmiş formu Sigma-Aldrich firmasından A6005 (from apricot kernels, $\geq$ %99) ürün kodu ile satın alınmıştır. Yapısal formülü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Amygdalin'ın yapısal formülü (Sigma-Aldrich, 2021a)

Diğer adları: D-Mandelonitrile 6-O-β-D-glucosido-β-D-glucoside, D-Mandelonitrile-β-gentiobioside, Laetrile, Vitamin B17

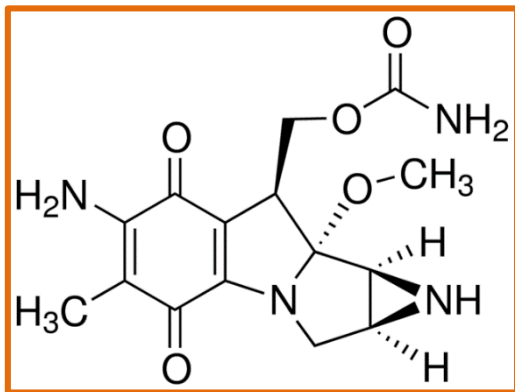
Formül: $C_{20}H_{27}NO_{11}$

Moleküler ağırlığı: 457,43 g/mol

CAS No: 29883-15-6

Mitomisin-C (MMC)

Bu çalışmada metabolik aktivatör (S9 karışım) içermeyen test sistemlerinde genotoksik bir ajan olarak kullanılan mitomisin-C (MMC) *Streptomyces caespitosus*'tan izole edilen bir çeşit antineoplastik, antibiyotik ve oftalmik ajandır. Bir alkilleyici ajan olarak hareket eden MMC, çoğunlukla guanin ve sitozin çiftleri üzerinde DNA çapraz bağlarına neden olarak DNA ve RNA sentezini inhibe eder ve nükleer liziz oluşumu ile DNA'yı parçalara ayırır. Maksimum etkisini geç G1 ve erken S evrelerindeki hücrelere karşı gösterir (Lockwood, Brocchini ve Khaw, 2013; Mirshahi, Lashay, Bahar ve Abrishami, 2018). Yapısal formülü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Mitomisin-C'nin yapısal formülü (Sigma-Aldrich, 2021b)

Diğer adları: 6-amino-4,7-diokso-8-metoksi-5-metil-1,1,2,8,8,8-hekzahidroazirin [2,3] pirolo [1,2] indol-8-metilkarbamat

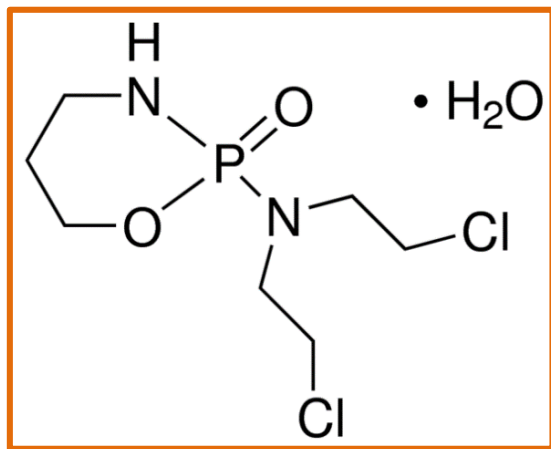
Formül: $C_{15}H_{18}N_4O_5$

Moleküler ağırlığı: 334,33 g/mol

CAS No: 50-07-7

Siklofosamid monohidrat (SF)

Bu çalışmada metabolik aktivatörün (S9 karışım) kullanıldığı testlerde siklofosamid monohidrat genotoksik bir ajan olarak seçilmiştir. Siklofosamid, yumurtalık, meme ve hematolojik kanserler gibi çeşitli malignitelerin kemoterapisinde ve otoimmün bozuklukların tedavisinde kullanılan nitrojen mustard tipi (hardal gazı) alkilleyici bir ön ilaçtır (Erkurt, Kuku, Kaya ve Aydoğdu, 2009; Lande ve diğerleri, 2017). Siklofosamid 4-hidroksisiklofosamid (4-OHC) üretmek üzere hepatik sitokrom P450 enzimleri (hepatik mikrozomal oksidazlar) tarafından aktive edilir. Dolayısıyla 4-OHC, aldofosamid ile siklofosamidin iki ana sitotoksik metaboliti olan fosforamid mustard (FM) ve akroleine dönüştürür. FM terapötik öneme sahip olan alkilleyici ajan olarak düşünülmektedir. FM, DNA'ya kovalent olarak bağlanarak DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlarına ve DNA çift zincir kırıklarına neden olmak suretiyle hızlı bir şekilde bölünen hücreleri öldürür (Helleday, Petermann, Lundin, Hodgson ve Sharma, 2008; Lande ve diğerleri, 2017). Siklofosamid, hücre siklusuna özgü olmayan (siklus non-spesifik) bir ilaçtır (Erkurt ve diğerleri, 2009). Yapısal formülü Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Siklofosamid'in yapısal formülü (Sigma-Aldrich, 2021c)

Diğer adları: 2-[Bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine 2-oxide, Cytosan

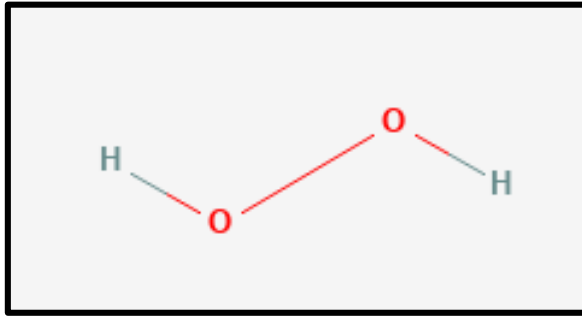
Formül: $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$

Moleküler ağırlığı: 279.10 g/mol

CAS no: 6055-19-2

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Bu çalışmada comet testinde DNA’da hasar oluşturmak amacıyla bir oksidan olan hidrojen peroksit (H_2O_2 , 100 μM) kullanılmıştır. Oksidatif stresin bir sonucu olarak meydana gelen bir reaktif oksijen türüdür. Organik ve inorganik yapıdaki bileşikleri oksitleme kabiliyetindedir. Eşleşmemiş elektron içermediği için bir serbest radikal değildir ancak fenton reaksiyonu aracılığı ile geçiş metallerinin indirgenmesi sonucu hidroksil ($OH^\cdot$) radikaline dönüşmektedir. Hidroksil radikali DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur (Halliwell, 2012; Özdamar, Furtana, Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 2016). Yapısal formülü Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4. Hidrojen peroksit’in yapısal formülü (Pubchem, 2021d)

Diğer adları: Hydroperoxide, Oxydol, Perhydrol

Formül: H_2O_2

Moleküler ağırlığı: 34,015 g/mol

CAS no: 7722-84-1

3.2. Metod

Bu araştırmada bir fitotoksin olan ve pek çok bitki tohumunda bulunan Amygdalin'in olası genotoksik ve antigenotoksik etkilerini incelemek amacıyla dört farklı genotoksisite testi uygulanmıştır. Bu testler Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Mikronükleus (MN) ve Comet testleri olup metabolik aktivatör yokluğunda (S9 karışım) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Kromozomal Anormallik (KA) ve Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testleri de yapılmıştır.

3.2.1. Etkinliği test edilecek olan konsantrasyonların tespiti

Çizelge 3.1'de Amygdalin'e ait LD₅₀ konsantrasyonlarını içeren çalışmalar listelenmiştir. Bu çalışmada sıçan (rat) oral LD₅₀ (880 mg/kg) konsantrasyonu baz alınarak metabolik aktivatör yokluğunda (S9 karışım) insan lenfosit kültürlerinde (24 ve 48 saat) ön denemeler yapılarak Amygdalin'in 0,43; 0,86; 1,72; 3,43; 6,86; 13,75; 27,50; 55,00; 110,00 ve 220,00 µg/mL'lik konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerde mitotik indeks oranları analiz edilerek 55,00; 110,00 ve 220,00 µg/mL'lik ve 27,50+MMC µg/mL'lik uygulama ve konsantrasyonlar için hücre sayısının yetersiz olduğu (özellikle 24 saatlik uygulamada) tespit edilmiştir. Ayrıca 0,43+MMC µg/mL'lik ve 0,86+MMC'lik uygulamaların mitotik indeks üzerine etkisinin benzer olduğu saptanmıştır. Bu nedenle uygulama konsantrasyonları 0,86; 1,72; 3,43; 6,86 ve 13,75 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Amygdalin'e ait LD₅₀ konsantrasyonları

Test materyali	LD ₅₀			
	Hayvan	Yöntem	Konsantrasyon	Kaynaklar
Amygdalin	Sıçan (Rat)	oral	880 mg/kg	Adewusi ve Oke (1985) Song ve Xu (2014)
	Fare	intravenöz	25 g/kg	Song ve Xu (2014)
	Fare	intraperitoneal	8 g/kg	

3.2.2. Metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda insan periferik lenfositleri ile yapılan çalışmalar

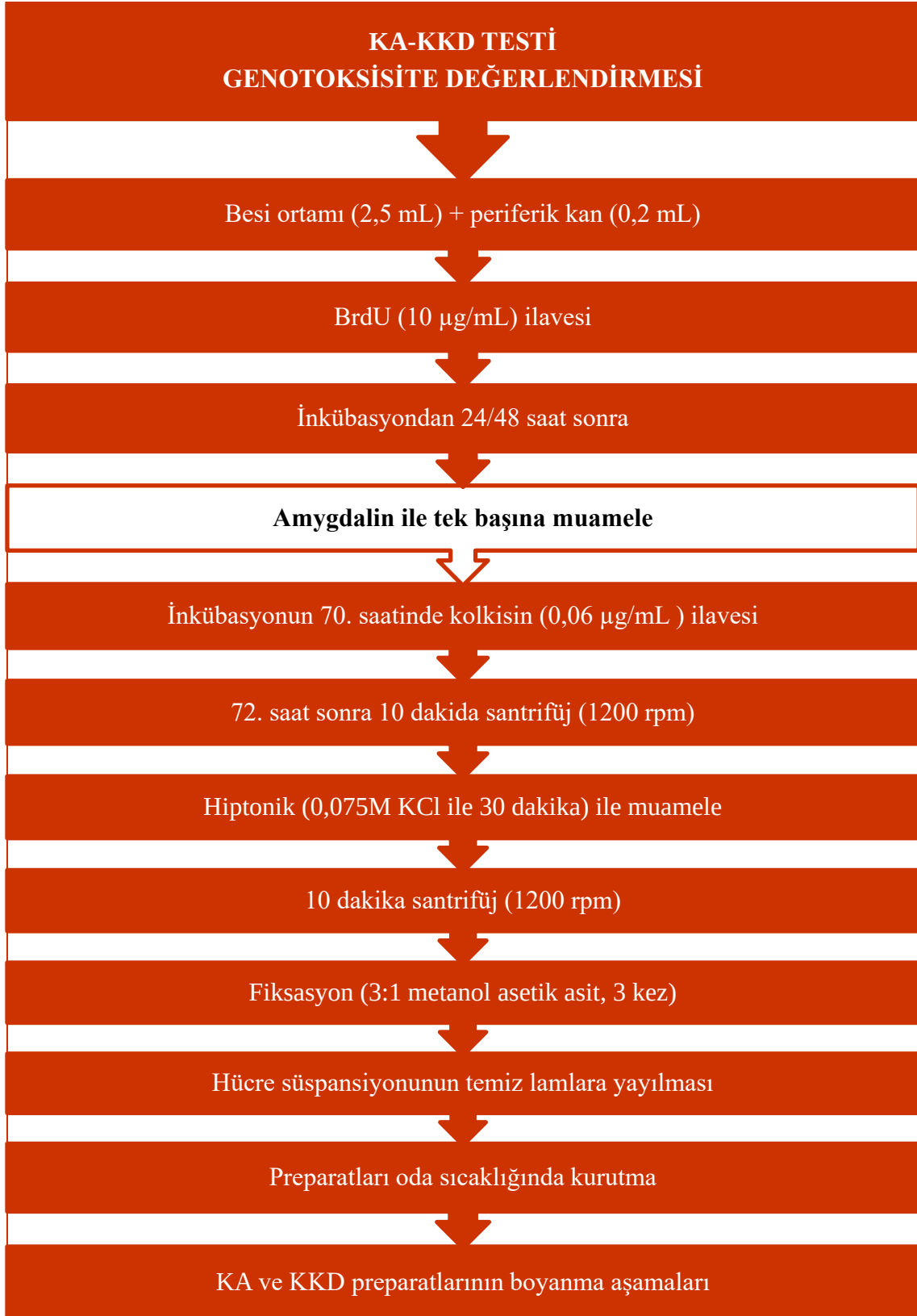
Kromozom anormallığı (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri

İnsan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) testi Evans'ın (1984:405,424) metoduna göre bazı değişikliklerle (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006) uygulanmıştır. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemi kullanılarak bazı modifikasyonlarla (Speit ve Haupter, 1985) gerçekleştirilmiştir. Buna göre ilk aşamada lenfositleri elde etmek amacıyla sağlıklı üç donörden alınan 0,2 mL periferik kan steril şartlarda 2,5 mL'lik kromozom ortamına (Chromosome Medium B) ilave edilmiştir. Akabinde tüplere öncesinde sartorius membran filtre ile steril hale getirilen ve bir timidin analogu olan BrdU (5-Bromo-2-deoksiüridin=Bromodeoksiüridin) çözeltisinden 10 µg/mL eklenerek, tüpler 72 saat süre ile 37°C'deki etüvde inkübe edilmiştir. Amygdalin'in literatürlerde belirtilen LD₅₀ dozlarına göre gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda tespit edilen ve toksik olmadığı gözlenen 0,86; 1,72; 3,43; 6,86 ve 13,75 µg/mL'lik konsantrasyonları kültür ortamına eklenmiştir. Genotoksisite değerlendirmesi için Amygdalin lenfosit kültürüne tek başına uygulanmıştır. Antigenotoksisite çalışmasında ise genotoksin olarak mitomisin-C (MMC- 0,2 µg/mL) kullanılmıştır. Bu değerlendirmede üç farklı uygulama protokolü kullanılmıştır:

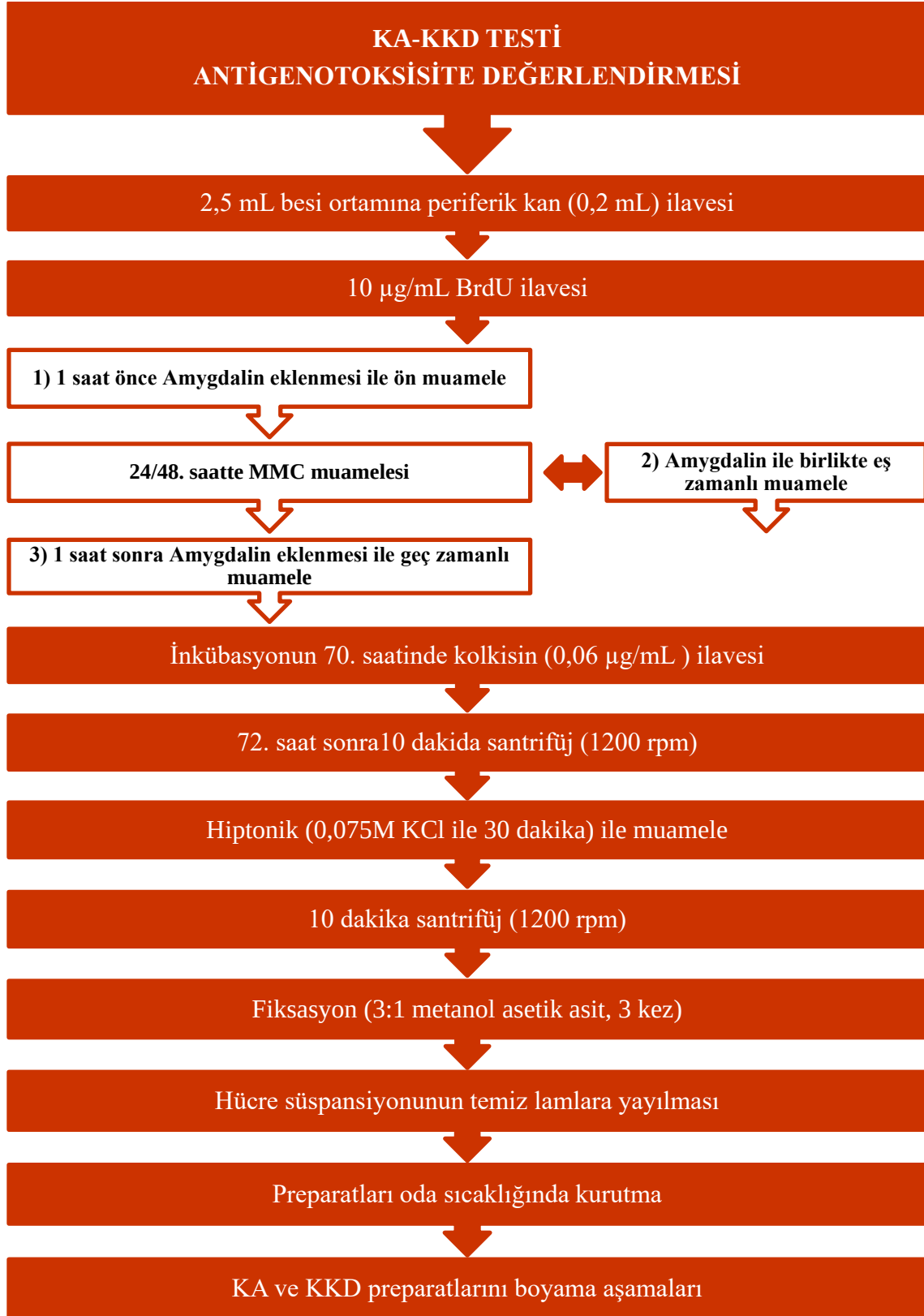
- 1) Mitomisin-C (MMC) muamelesinden 1 saat önce Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen ön muamele
- 2) Mitomisin-C (MMC) muamelesi ile eşzamanlı olarak Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen eş zamanlı muamele
- 3) Mitomisin-C (MMC) muamelesinden 1 saat sonra Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen geç zamanlı muamele

Her üç uygulama için 48 saatlik muamelelerde kültürün 24. saatinde, 24 saatlik muamelelerde ise kültürün 48. saatinde MMC ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür süresi bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde), hücreler kolkisin (0,06 µg/mL) ile muamele edilerek hücre döngüsünün metafaz evresinde tutuklanması sağlanmıştır. Deneylerde bir negatif (distile su) kontrol ve bir pozitif kontrol (0,2 µg/mL MMC) grubu bulundurulmuştur.

Kültür süresi tamamlandıktan sonra (72. saatte) tüpler etüvden çıkarılmış ve 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüpte kalan kısma KCl (0,075 M) çözeltisinden eklenerek 37°C’de 30 dakika hipotonizasyon işlemi uygulanmıştır. Süre bitimini takiben kültür tüpleri 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Ardından fiksasyon işlemi için tüplere soğuk 3:1 metanol:asetik asitten ilave edilerek 45 dakika süre ile soğuk inkübasyona bırakılmıştır. Fiksasyon işlemi 2 kez daha tekrar edildikten sonra, tüpün dibinde kalan kısım pipetajlanarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyon önceden temizlenmiş lamalar üzerine farklı alanlara gelecek şekilde yayılmış ve elde edilen preparatlar, 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Yukarıda bahsi geçen basamaklar akış diagramları kullanılarak şematize edilmiştir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Amygdalin'in genotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testi kültür ve preparasyon aşamaları



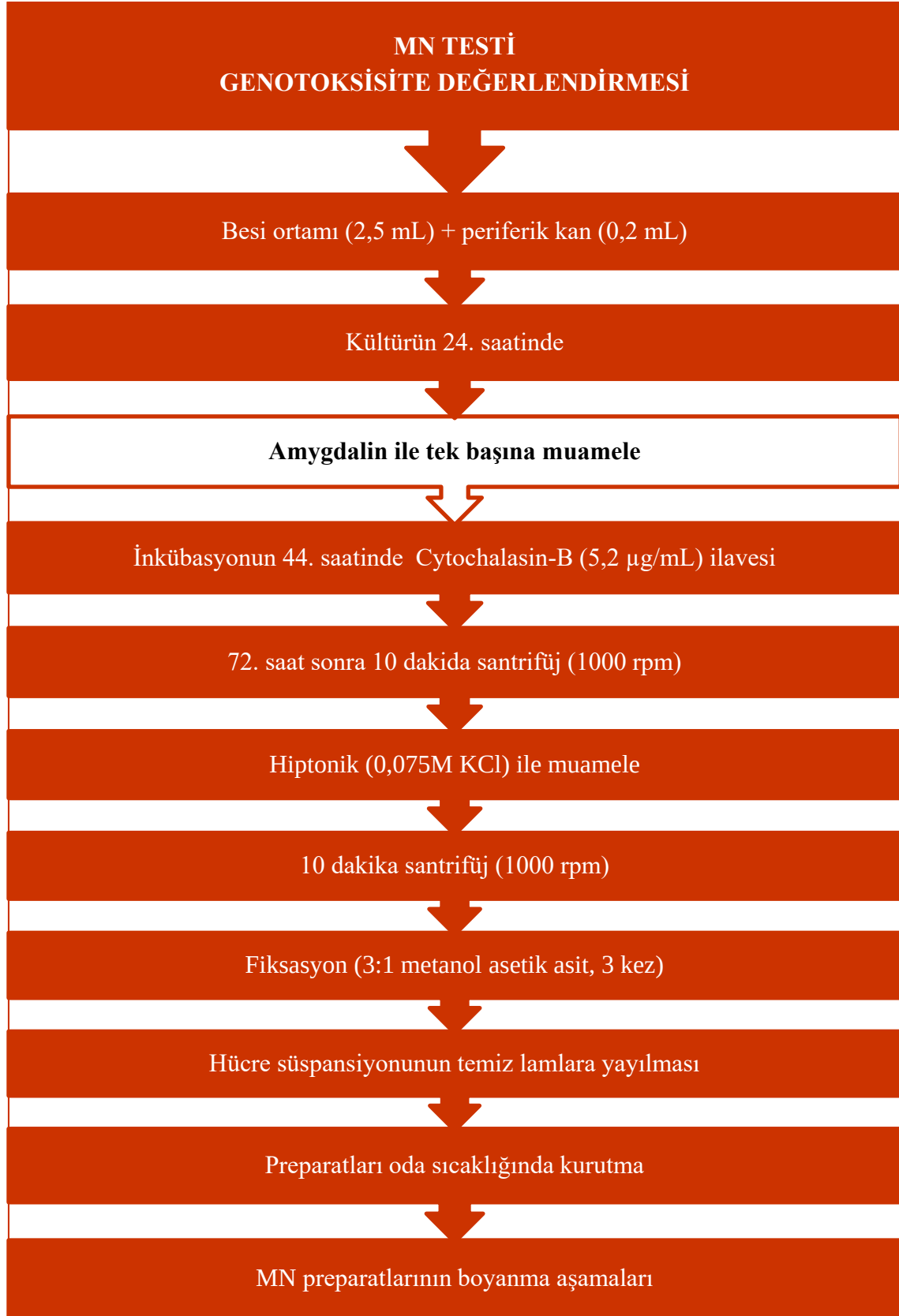
Şekil 3.6. Amygdalin'in antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testi kültür ve preparasyon aşamaları

Mikronükleus testi

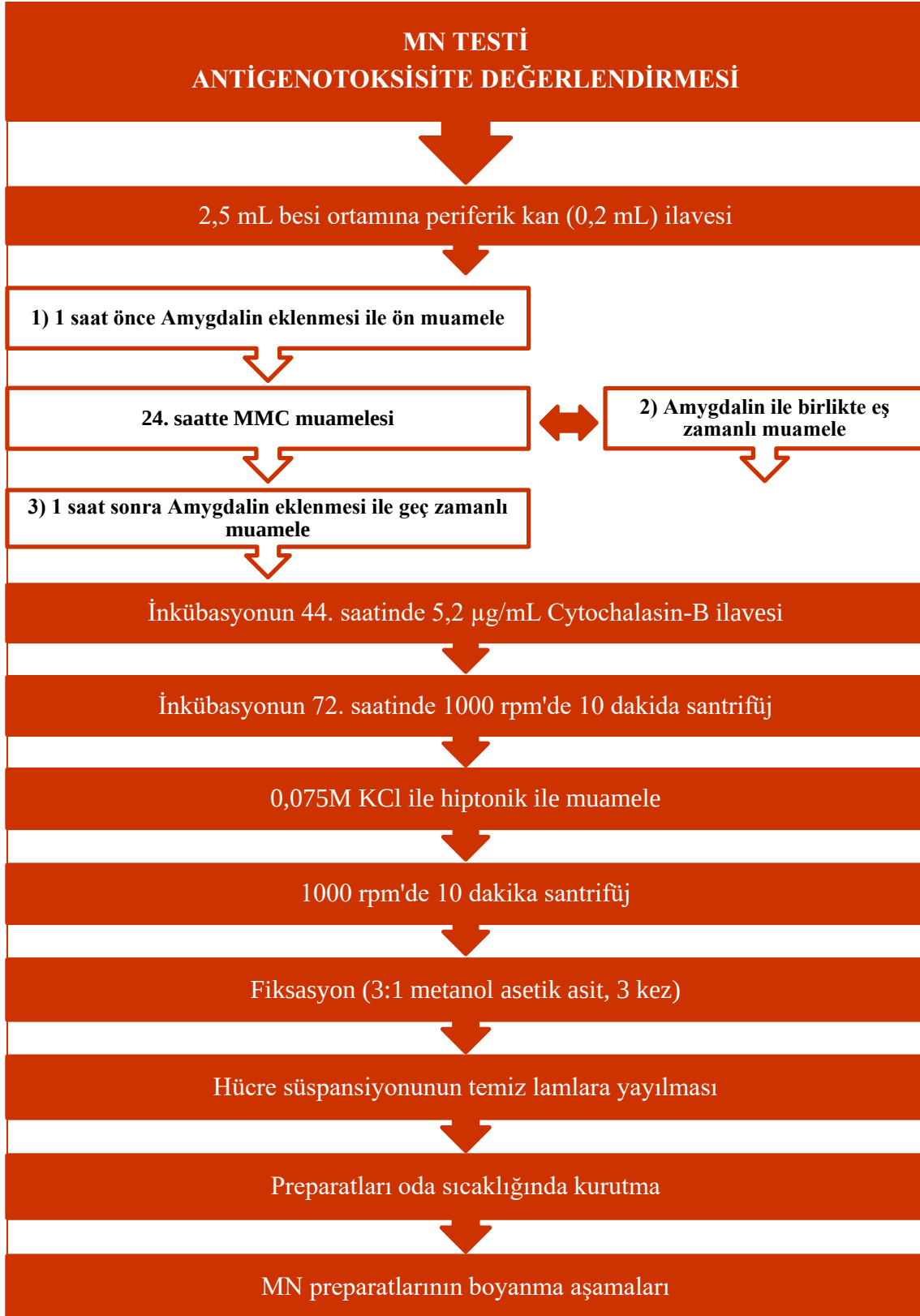
Mikronukleus testinin uygulanmasında Fenech ve diğerlerinin (2000) metodu bazı değişikliklerle (Palus ve diğerleri, 2003) kullanılmıştır. Buna göre 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0,2 mL'si, içerisinde 2,5 mL'lik kromozom medyumunu bulunan (Chromosome Medium B) tüplere ekilmiştir. Bu tüpler 37°C sıcaklıktaki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin 24. saatinde, genotosik etkilerini saptamak için hücreler Amygdalin'in beş farklı konsantrasyonu (0,86; 1,72; 3,43; 6,86 ve 13,75 µg/mL) ile tek başına muamele edilmiştir. Antigenotoksisite çalışması için ise, Amygdalin'in aynı konsantrasyonları değerlendirilmiş olup, üç farklı antigenotoksisite uygulama prosedürü gerçekleştirilmiştir:

- 1) Mitomisin-C (MMC) muamelesinden 1 saat önce Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen ön muamele
- 2) Mitomisin-C (MMC) muamelesi ile eş zamanlı olarak Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen eş zamanlı muamele
- 3) Mitomisin-C (MMC) muamelesinden 1 saat sonra Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen geç zamanlı muamele

Bu çalışmada ayrıca bir negatif ve yalnızca MMC (0,20 µg/mL) uygulanan bir pozitif kontrol kullanılmıştır. İnkübasyonun 44. saatinde sitokinezi bloke etmek amacıyla tüm tüplere sitokalsin-B (5,2 µg/mL) eklenmiştir. 72 saatlik kültür süresi tamamlandığında tüplere 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplerin dibinde kalan kısma hipotonik solüsyonundan (KCl-0,075 M) ilave edilmiştir. Ardından tüpler yine 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Takiben tüm tüplere 3:1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandıktan sonra son fiksatife oranı %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiş ve son kez santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant atılmış, geriye kalan hücre süspansiyonu pipetle homojenize edilmiş ve daha önceden temizlenmiş lamalar üzerine, farklı alanlara birer damla damlatılarak bu süspansiyonun yayılması sağlanmıştır. Yayma işlemi tamamlandığında preparatlar kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Yukarıda anlatılan tüm aşamalar Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de özetlenmiştir.



Şekil 3.7. Amygdalin'in genotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan mikronükleus testi kültür ve preparasyon aşamaları



Şekil 3.8. Amygdalin'in antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan mikronükleus testi kültür ve preparasyon aşamaları

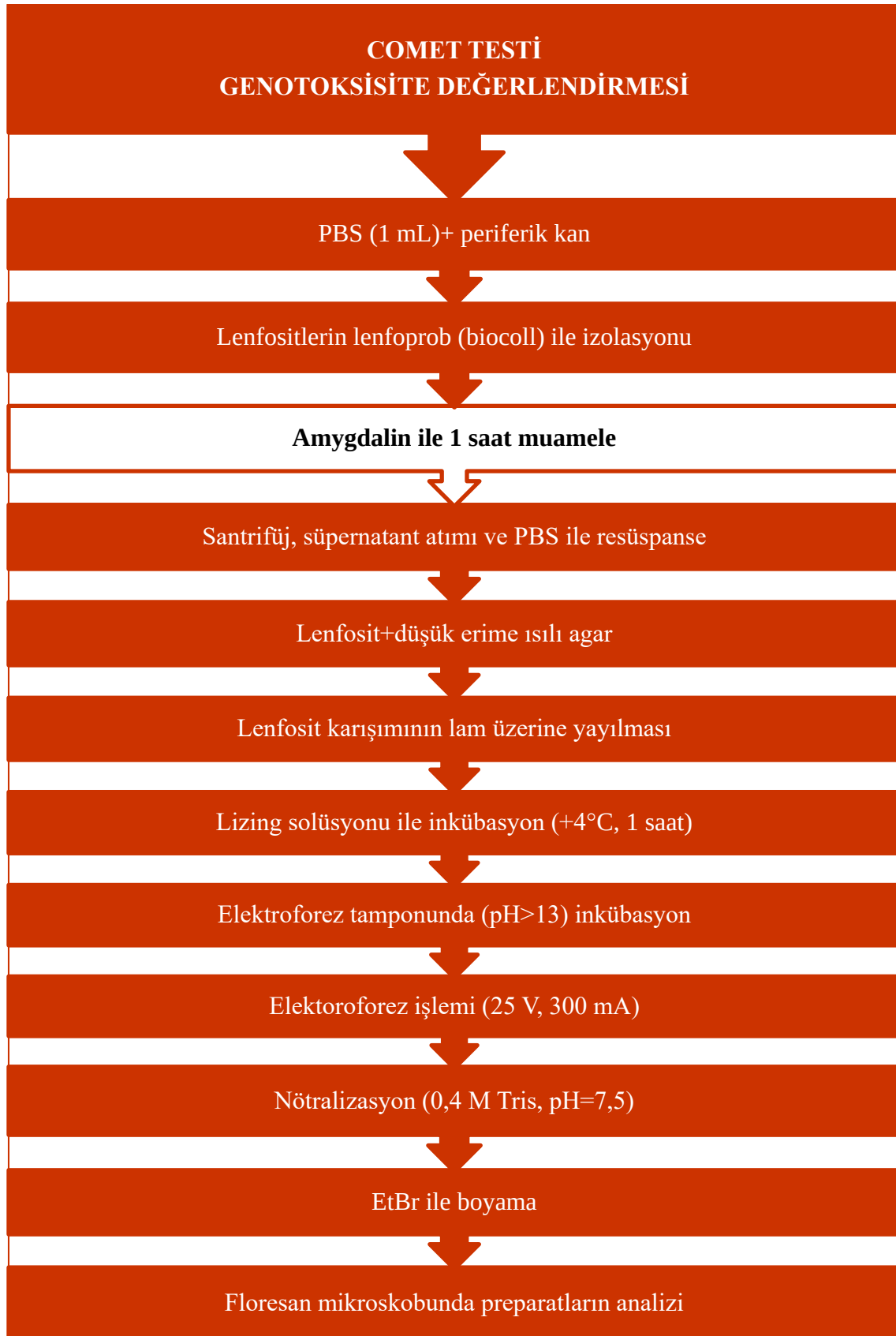
Comet testi

Bu çalışmada, Amygdalin'in tek başına insan periferik lenfositlerinde meydana getirdiği DNA hasarını ölçmek ve oksidan bir bileşik olan hidrojen peroksit (H_2O_2) tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı olası koruyucu ve iyileştirici etkilerini saptamak amaçlanmıştır. Bu amaçla Singh ve diğerlerinin (1988) uyguladığı metot bazı modifikasyonlar yapılarak takip edilmiştir.

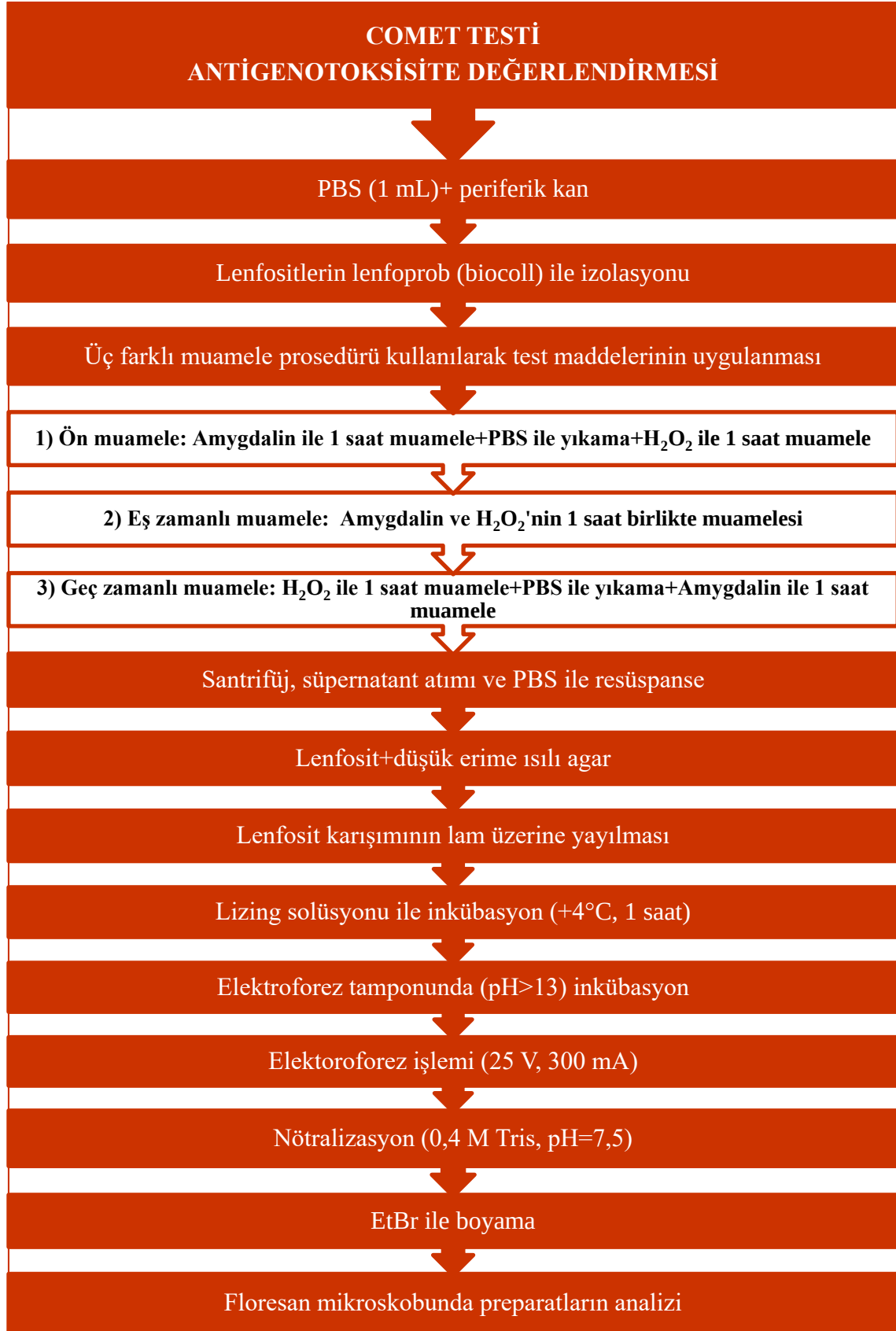
Sağlıklı üç donörden (iki kadın ve bir erkek) alınan periferik kanın 100'er μL 'si, PBS ile süspanse edilmiş ve lenfositler biocoll çözeltisi kullanılarak izole edilmiştir. İzole lenfositlerde Tripan blue testi kullanılarak canlılık oranı $\geq \%97$ olarak belirlenmiştir. Amygdalin'in tek başına DNA'da bir hasar oluşturup oluşturmadığını saptamak amacıyla izole lenfositler Amygdalin'in belirlenen ve toksik olmadığı gözlenen beş farklı konsantrasyonu (0,86; 1,72; 3,43; 6,86 ve 13,75 $\mu g/mL$) ile tek başına muamele edilmiştir. Olası iyileştirici ve koruyucu etkilerini saptamak amacıyla üç farklı antigenotoksisite prosedürü gerçekleştirilmiştir:

- 1) 1 saat'lik Amygdalin muamelesinden sonra lenfositlerin PBS ile yıkanmasının ardından 1 saat H_2O_2 eklenmesi ile gerçekleştirilen ön muamele
- 2) Amygdalin ve H_2O_2 'nin aynı anda eklenmesi ile gerçekleştirilen eş zamanlı muamele
- 3) 1 saatlik H_2O_2 muamelesinden sonra lenfositlerin PBS ile yıkanmasını takiben 1 saat Amygdalin eklenmesi ile gerçekleştirilen geç zamanlı muamele

Bu test sisteminde de pozitif kontrol (100 μM , H_2O_2) ve negatif kontrol (distile su) bulundurulmuştur. Muamele süresi tamamlandıktan sonra santrifüj işlemi uygulanarak süpernatant atılmış ve PBS ile resüspanse edilmiştir. Ardından lenfositler düşük erime ısıyla agarla karıştırılarak önceden agar kaplı lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra lamlar lizing solüsyonu ile buzdolobında en az 1 saat inkübe edilmiştir. Süre bitiminde lamlar elektroforez tamponunda ($pH > 13$) 20 dakika bekletilmiş ve 20 dakika süre ile elektroforez (25 V, 300 mA) işlemine tabi tutulmuştur. Takiben nötralizasyon (0,4 M Tris, $pH=7,5$) işlemi uygulanarak, EtBr ile boyanan preparatlar floresan mikroskopta analiz edilmiştir. Yukarıda bahsi geçen preparasyon aşamaları Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da sunulmuştur.



Şekil 3.9. Amygdalin'in genotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan comet testine ait aşamalar



Şekil 3.10. Amygdalin'in antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan comet testine ait aşamalar

3.2.3. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında insan periferik lenfositleri ile yapılan çalışmalar

Çalışmanın bu kısmında Amygdalin'e ait ikincil metabolitlerin genotoksik ve siklofosfamidin neden olduğu kromozomal hasara karşı antigenotoksik etkileri kromozomal anormallik (KA) ve kardeş kromatid değişim (KKD) testi ile incelenmiştir. Bu amaçla test sistemlerine karaciğer fraksiyonu (S9) ile hazırlanan metabolik aktivatör (S9 karışım) ilave edilmiştir. S9 fraksiyon, erkek rat (Sprague-Dawley) karaciğerinden elde edilen bir üründür. S9 karışımının hazırlanışı Maron ve Ames (1983) ile Registre ve Proudlock (2016: 207, 267)'a göre gerçekleştirilmiş olup KA ve KKD testleri Topaktaş ve Rencüzoğulları (2010: 151, 156)'nın yöntemleri temel alınarak bazı değişikliklerle uygulanmıştır.

S9 karışımının hazırlanması

-80 C°'de muhafaza edilen S9 fraksiyon kullanmadan hemen önce oda sıcaklığında çözülerek S9 karışım hazırlanmıştır. S9 karışımı, 1 mL mikrozomal fraksiyonun yanı sıra şu kofaktörleri içermektedir:

MgCl ₂ (0,4 M)-KCl (1,65 M) tuzları	0,20 mL
Sodyum fosfat tamponu (0,2 M Na ₂ HPO ₄ ve 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4)	5,00 mL
NADP (0,1 M)	0,40 mL
Glukoz-6-fosfat (1 M)	0,05 mL
Steril distile su	3,35 mL

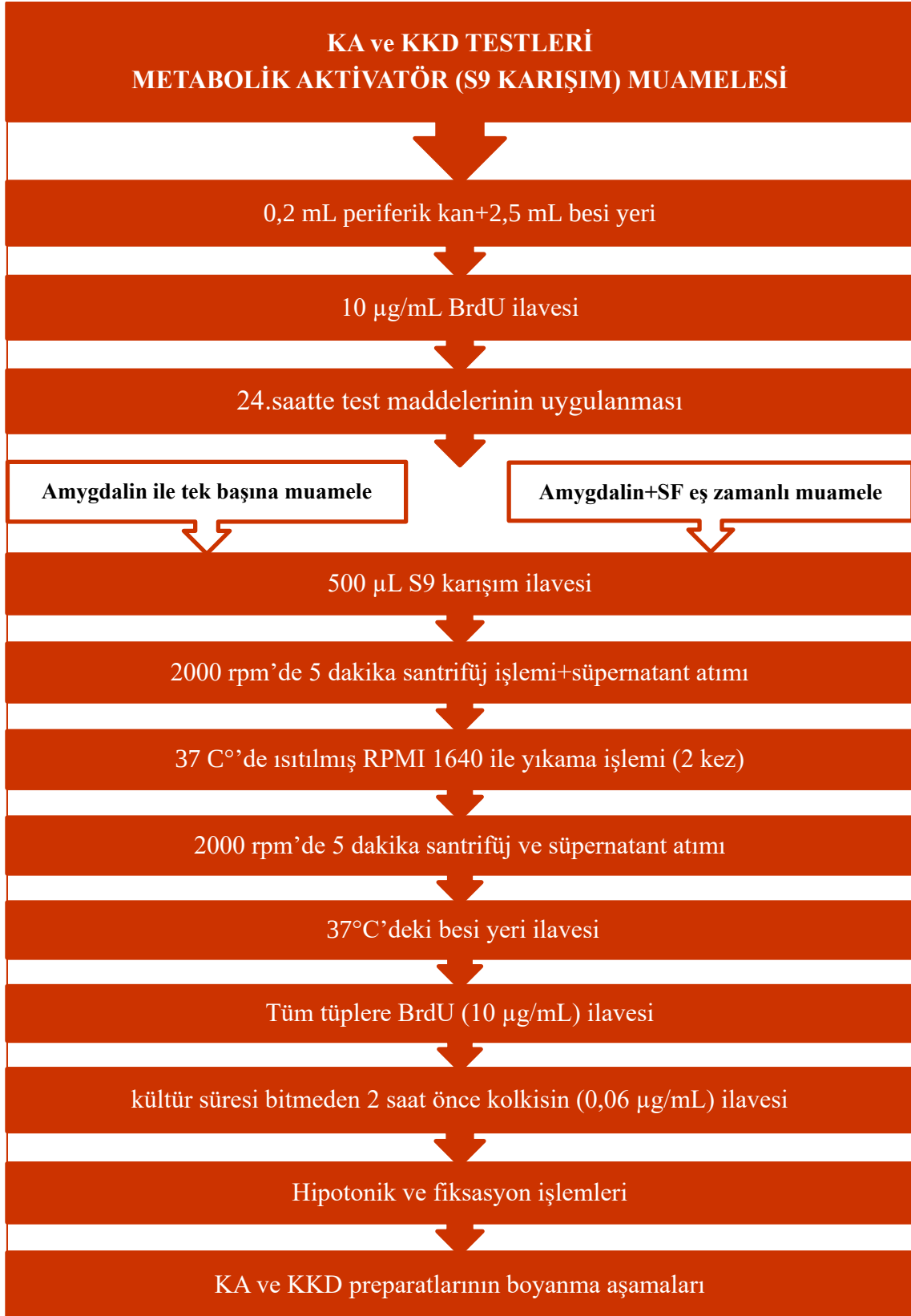
S9 fraksiyon (1 mL) dahil toplam 10 mL S9 karışımı elde edilmektedir.

Kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri

İnsan periferik lenfositlerinin kullanıldığı kromozomal anormallik (KA) testi Evans ve diğerlerinin (1984:405, 427) yöntemi baz alınarak bazı değişikliklerle (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006) uygulanmıştır. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yönteminde bazı modifikasyonlar (Speit ve Haupter, 1985) yapılarak gerçekleştirilmiştir. İki donörden (bir kadın ve bir erkek) elde edilen heparinize periferik

kan (0,2 mL), 2,5 mL kromozom ortamına (Chromosome medium B) ekilmiştir. Ardından her tüpe steril BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin) çözeltisinden 10 µg/mL ilave edilerek, tüpler 72 saat süre ile inkübatöre (37°C) alınmıştır.

Bu çalışmada Amygdalin'in metabolik aktivatör varlığında genotoksik ve antigenotoksik etkinliğini incelemek amacıyla iki deney grubu oluşturulmuştur. Kültürün 24. saatinde birinci gruba Amygdalin'in üç farklı konsantrasyonu (3,43; 6,86 ve 13,75 µg/mL) tek başına uygulanırken, ikinci gruba Amygdalin'in beş farklı (0,86; 1,72; 3,43; 6,86 ve 13,75 µg/mL) konsantrasyonu 12 µg/mL siklofosfamid (SF) ile beraber eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Bütün test maddeleri ile beraber ayrıca her tüpe 500 µL S9 karışımı eklenmiştir. Ardından tüpler inkübatöre (37°C) alınarak 3 saat süre ile test maddeleri ve S9 karışımı ile muamele işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde, S9 karışımını uzaklaştırmak amacıyla tüm tüpler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından tüm tüplere 37°C'de ısıtılmış RPMI 1640 eklenerek yıkama yapılmıştır. Bu işlem iki kez gerçekleştirilmiş olup son santrifüjden sonra tüm tüplere 37°C'deki kromozom ortamı (Chromosome medium B) ilave edilmiştir. Ardından her tüpe BrdU (10 µg/mL) eklenmiş ve 72 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasına izin verilmiştir. Ayrıca deney sistemlerine bir negatif (distile su), S9 karışımı içermeyen ancak siklofosfamid (12 µg/mL) uygulanan başka bir kontrol grubu ve yanı sıra bir de pozitif kontrol (12 µg/mL, SF) grubu ilave edilmiştir. Her iki deney sisteminde, kültürün 70. saatinde (kültür süresi bitmeden 2 saat önce) tüplerin tamamına kolkisin çözeltisi (0,06 µg/mL) eklenmiştir (Şekil 3.11). Çalışmanın bundan sonraki aşamaları (hücre kültüründen kromozom eldesi) diğer çalışmalarda gerçekleştirilen KA ve KKD testlerinde anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5 ve 3.6).



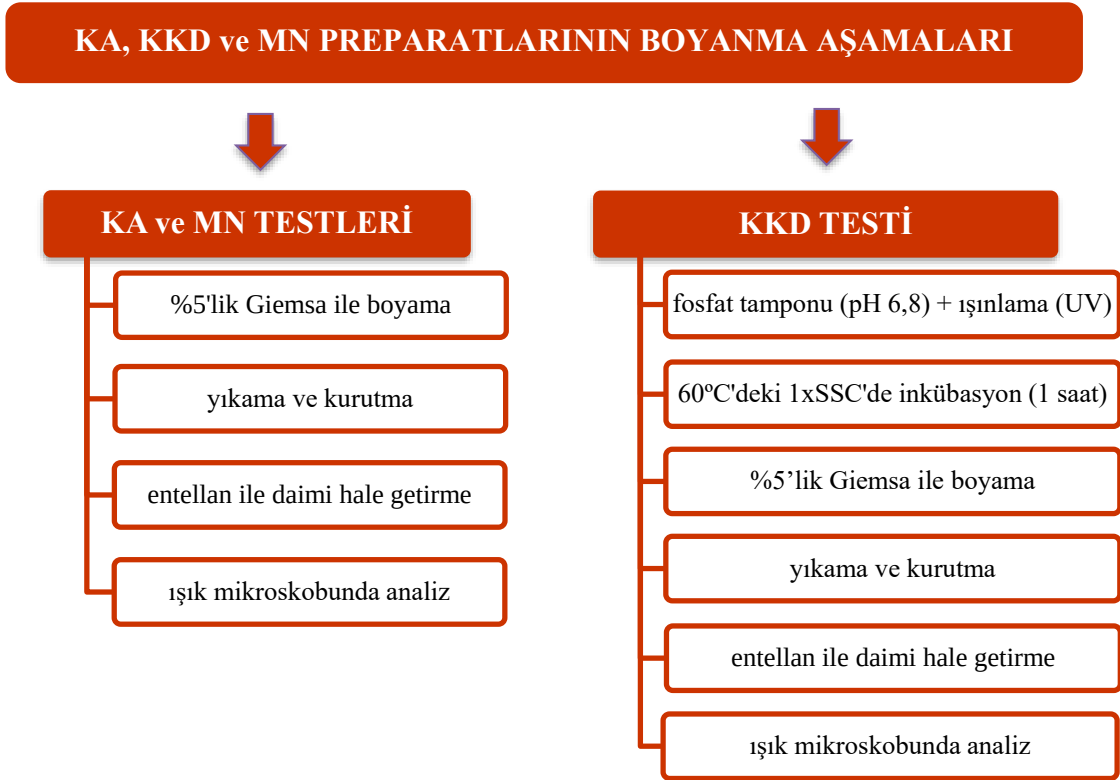
Şekil 3.11. Amygdalin'in metabolik aktivatör varlığında genotoksik ve antigenotoksik etkilerini saptamak amacıyla uygulanan kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişim testi kültür ve preparasyon aşamaları

3.2.4. Kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testlerine ait preparatların boyanması

Kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri için hazırlanmış olan preparatlardan aynı zamanda sırasıyla mitotik ve nükleer bölünme indeksleri de analiz edilmiştir. Elde edilen preparatlar %5'lik Giemsa (pH 6,8) boyası kullanılarak, kromozomal anormallik testi için 20-25 dakika, mikronükleus testi için ise 10-15 dakika süre ile homojen olarak boyanmıştır (Şekil 3.12).

Kardeş kromatid değişim testi için kromozom anormalliklerini incelemek amacıyla hazırlanmış olan preparatlardan bir kısmı kullanılmış ve boyama işlemi Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri yöntem esas alınarak bazı değişikliklerle uygulanmıştır (Speit ve Haupter, 1985). Buna göre preparatlar oda sıcaklığında bir gün kurutulduktan sonra, düz bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka olacak şekilde fosfat tamponu (pH 6,8) ile kapatılmıştır. Ardından karanlık ortamda 15 cm yükseklikten, 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile 10-15 dakikada süre aralığında ışınlanmıştır. Işınlama bitiminde 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 60°C sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde distile su ile yıkanan preparatlar, fosfat tamponu ile hazırlanan ve pH 6,8 olacak şekilde ayarlanan %5'lik Giemsa ile 20-25 dakika süreyle boyanmıştır (Şekil 3.12).

KA, KKD ve MN testlerine ait boyama işlemleri tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan preparatlar, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından Entellan ile daimi hale getirilerek ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testine ait preparatların boyanma aşamaları

3.2.5. Kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testlerine ait preparatların mikroskopik analizi

Kromozomal anormalliklerin ve mitotik indeksin (Mİ) saptanması

Kromozomal anormallikleri saptamak amacıyla tüm donörlere ait preparatlardan her bir uygulama için kromozomları iyi derecede dağılmış 100'er metafaz (S9 yokluğunda yapılan çalışmalarda her konsantrasyon için toplam 300, S9 varlığında yapılan çalışmalarda ise her konsantrasyon için toplam 200 metafaz) incelenmiştir. Ardından toplam hücre sayısındaki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı analiz edilmiştir. Kromozomal anormallik testi için hazırlanan preparatlardan ayrıca mitotik indeks (Mİ) de belirlenmiş olup, her donör ve konsantrasyon için 1000 hücre olmak üzere S9 yokluğunda yapılan çalışmalar için toplam 3000 hücre, S9 varlığında yapılan çalışmalarda ise toplam 2000 hücre değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir.

Kardeş kromatid değişimi (KKD) ve replikasyon indeksinin (Rİ) saptanması

Kardeş kromatid değişimini saptamak amacıyla her bir donöre ait preparatların her birinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 50'şer hücre (S9 yokluğunda yapılan çalışmalarda toplam 150 hücre, S9 varlığında yapılan çalışmalarda ise toplam 100) incelenmiştir. Kardeş kromatid değişimlerinin belirlenebilmesi için en az iki replikasyon döngüsü gereklidir. BrDU'lu nükleotid hücre DNA'sı replike olurken yeni sentezlenen polinükleotid iplik içine timin nükleotidinin yerine geçer. UV ışınlama sonrasında boyanan hücre kromozomlarında BrDU içeren bölgeler açık renkte boyanır. BrDU içermeyen bölgeler ise nisbeten daha koyu renkte görünürler. Kromozomlarda oluşan bu boyanma farklılığı sonucu, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak kardeş kromatid değişimi sayıları belirlenmiştir.

Replikasyon indeksi (Rİ) için ise yine her bir donör için preparatların her birinden 200 hücre (S9 yokluğunda yapılan çalışmalarda toplam 600 hücre, S9 varlığında yapılan çalışmalarda ise toplam 400 hücre) incelenmiştir. İnceleme esnasında hücreler arasında birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitoz evresindeki hücreler sayılarak veri takip çizelgeleri ile kayıt altına alınmıştır. Elde edilen verilere göre replikasyon indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Rİ = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{N}$$

M1: Birinci metafaz evresindeki hücre sayısı
M2: İkinci metafaz evresindeki hücre sayısı
M3: Üçüncü metafaz evresindeki hücre sayısı
N : İncelenen toplam hücre sayısı

Mikronükleus (MN) frekansı ve nükleer bölünme indeksinin (NBİ) saptanması

Mikronükleus frekansı belirlemek amacıyla, test edilen materyalin ilavesinden sonra bölünen hücreler olmaları sebebiyle, nükleer bölünme evresini tamamlamış fakat sitoplazma bölünmesini geçirememiş binükleat (çift çekirdekli) hücreler analiz edilmiştir. Sitoplazma bölünmesini engellemek için bir aktin polimeraz inhibitörü olan sitokalsin-B'nin kültürün 44. saatinde besi ortamına ilave edilmesiyle binükleat hücreler elde

edilmiştir. Bu çalışmada iki kadın ve bir erkek bireye ait her bir preparattan 1000 tane, toplam 3000 tane iki çekirdekli hücre, mikronükleus içerip içermediği yönünden incelenmiştir.

$$MN = \frac{1 \times (1MN) + 2 \times (2MN) + 3 \times (3MN + 4MN)}{N}$$

1MN: 1 mikronükleuslu hücre sayısı
2MN: 2 mikronükleuslu hücre sayısı
3MN: 3 mikronükleuslu hücre sayısı
4MN :4 mikronükleuslu hücre sayısı
N : İncelenen toplam hücre sayısı

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) belirlenirken her bir uygulama grubu (iki kadın ve bir erkek donörden 500'er adet) ve preparat için toplam 1500 hücre değerlendirilmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 ve daha fazla çekirdekli (4N) şeklinde sayılarak, NBİ aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$NBİ = \frac{1 \times (1N) + 2 \times (2N) + 3 \times (3N + 4N)}{n}$$

1N: 1 nükleuslu hücre sayısı
2N: 2 nükleuslu hücre sayısı
3N: 3 nükleuslu hücre sayısı
4N: 4 nükleuslu hücre sayısı
n : İncelenen toplam hücre sayısı

Comet testi ile DNA hasarının saptanması

Comet testinin analizinde her konsantrasyon için toplam 300 hücre (her bir donör için 100 hücre) değerlendirilmiştir. Hücresel hasar düzeyinin ölçümü bir Comet ölçüm programı (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda hücresel hasar dereceleri % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olmak üzere iki farklı comet parametresi açısından analiz edilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel analizler

Bu araştırmada kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testlerine ait veriler bu testlere özgü hazırlanan veri takip çizelgeleri kullanılarak, comet testine ait veriler ise özel bir program (Comet Assay IV) aracılığı ile kayıt altına alınmıştır.

Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre), mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve mikronükleus frekansı z testi ile, kardeş kromatid değişimi ve comet testi sonuçları ise t testi kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca anormal hücre frekansı, KA/hücre sayısı, mitotik, replikasyon ve nükleer bölünme indeksleri, KKD/hücre sayısı, MN/hücre sayısı, % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti için doz-etki ilişkisini belirlemek amacıyla SPSS 15.0 bilgisayar programı aracılığıyla regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Kromozom Anormallik (KA) Testi Sonuçları

4.1.1. Genotoksisite değerlendirmesi

Amygdalin'in insan lenfositlerine muamelesi sonucunda 24 saatlik uygulamada kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom olmak üzere beş farklı tipte yapısal anormalliğe rastlanmıştır (Resim 4.1). Ayrıca yalnızca en yüksek konsantrasyonda (13,75 µg/mL) sayısal bir anormallik olan poliploidiye rastlanılmıştır. 48 saatlik uygulamada ise yine kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve halka kromozom olmak üzere altı farklı tipte yapısal anormalliğe rastlanırken, sayısal bir anormallik olan poliploidi de görülmüştür (Çizelge 4.1, Resim 4.1).

Her iki uygulama süresi için en sık gözlenen anormallik tipleri sırasıyla kromatid kırığı (%61,11) ve fragmentlerdir (%16,67). Yapılan analizler sonucunda Amygdalin'in anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik oranını tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarda kontrole göre önemli düzeyde artırmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Amygdalin muamelesi sonucu insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)										
			ktk	kzk	f	kkb	ktk	ds	p	h		
Kontrol	24	0,00	5	1	3	-	-	-	-	-	2,67±0,93	0,030±0,01
MMC	24	0,20	43	1	6	2	22	-	-	-	19,67±2,30 a ₃	0,247±0,03 a ₃
Amygdalin	24	0,86	7	-	3	-	-	-	-	-	3,33±1,04	0,033±0,01
		1,72	5	-	1	1	-	-	-	-	2,33±0,87	0,023±0,01
		3,43	3	-	1	1	-	1	-	-	2,00±0,81	0,020±0,01
		6,86	4	3	-	1	-	-	-	-	2,67±0,93	0,027±0,01
		13,75	7	-	-	-	-	-	2	-	3,00±0,98	0,030±0,01
Kontrol	48	0,00	7	-	-	1	-	-	-	-	2,67±0,93	0,027±0,01
MMC	48	0,20	69	3	31	3	65	2	-	-	39,33±2,82 a ₃	0,577±0,03 a ₃
Amygdalin	48	0,86	5	1	2	-	-	-	-	-	2,67±0,93	0,027±0,01
		1,72	4	-	1	-	-	-	1	1	2,33±0,87	0,023±0,01
		3,43	5	-	2	2	-	-	-	-	3,00±0,98	0,030±0,01
		6,86	6	1	5	1	-	1	-	1	4,00±1,13	0,050±0,01
		13,75	9	-	-	2	-	-	-	-	3,33±1,04	0,037±0,01
Kromozomal Anormallik Yüzdesi			61,11	5,56	16,67	8,89	0,00	2,22	3,33	2,22		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kbb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi, h: halka kromozom, SH: Standart Hata

a₁ Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

a₂ Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

a₃ Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

4.1.2. Antigenotoksinite değerlendirilmesi

24 saatlik uygulama

24 saatlik prosedür temel alınarak gerçekleştirilen Amygdalin+MMC uygulamalarında saptanan yapısal anormallikler sırası ile şöyledir: kromatid kırığı (%51,56), kromatid değişimi (%26,99), fragment (%20,03), kromozom kırığı (%0,57), kardeş kromatidlerde birleşme (%0,43), disentrik kromozom (%0,28) ve halka kromozom (%0,14) (Çizelge 4.2, Resim 4.1).

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere tüm Amygdalin+MMC uygulamalarında (ön, eş ve geç zamanlı muamele) ve tüm konsantrasyonlarda, anormal hücre frekansında ve hücre başına

düşen anormallik sayısında pozitif kontrole göre bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma anormal hücre frekansı için ön muamelede yalnızca en yüksek üç konsantrasyonda (3,43; 6,86 ve 13,75 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyona bağlı ($r = -0,88$) olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir. Eş zamanlı muamelede söz konusu azalma 0,86 ve 3,43 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlar hariç diğer konsantrasyonlarda anlamlı iken, geç zamanlı muamelede ise 0,86 ve 13,75 $\mu\text{g/mL}$ uygulama konsantrasyonları hariç diğer konsantrasyonlarda anlamlı olduğu saptanmıştır. Anormal hücre frekansındaki bu düşüşlerin eş ve geç zamanlı muameleler için zayıf düzeyde konsantrasyona bağlı (sırasıyla $r = -0,60$ ve $r = -0,49$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.1).

Hücre başına düşen anormallik sayısında pozitif kontrole kıyasla gözlenen azalma ise ön muamele (0,86 $\mu\text{g/mL}$ hariç), eş zamanlı muamele (3,43 $\mu\text{g/mL}$ hariç) ve geç zamanlı muamelelerde tüm konsantrasyonlarda gözlenmiştir ve bu azalmaların konsantrasyona bağlı (sırasıyla $r = -0,83$; $r = -0,65$ ve $r = -0,54$ (zayıf düzeyde)) olarak önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

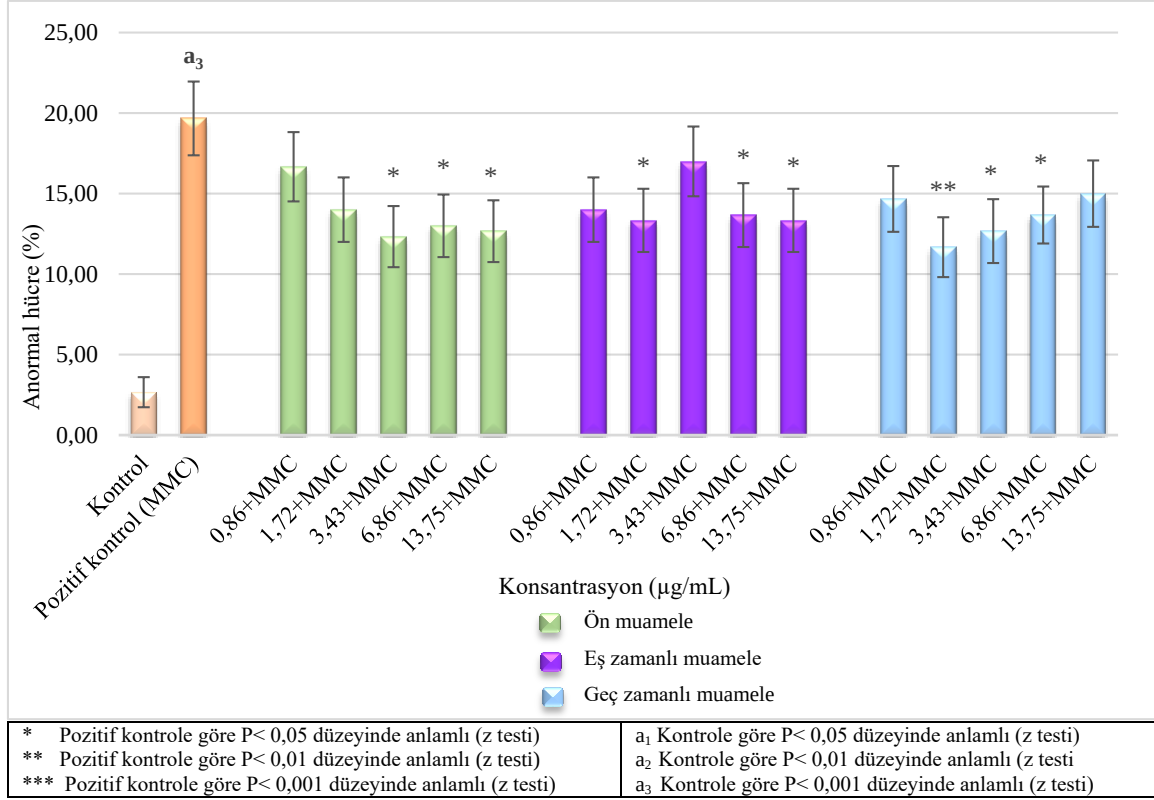
Çizelge 4.2. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre± SH (%)	KA/Hücre± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)									
			ktk	kzk	f	kkb	ktđ	ds	h		
Kontrol	24	0,00	5	1	3	-	-	-	-	2,67±0,93	0,030±0,01
Pozitif kontrol (MMC)	24	0,20	43	1	6	2	22	-	-	19,67±2,30 a ₃	0,247±0,03 a ₃
Amygdalin+MMC	Ön muamele	0,86	25	1	13	1	17	-	-	16,67±2,15	0,190±0,02
		1,72	24	-	15	-	11	-	-	14,00±2,00	0,167±0,02*
		3,43	18	-	8	-	12	-	-	12,33±1,90*	0,127±0,02***
		6,86	26	-	8	-	10	-	-	13,00±1,94*	0,147±0,02**
		13,75	22	-	15	-	7	-	-	12,67±1,92*	0,147±0,02**
	Eş zamanlı muamele	0,86	29	1	7	-	11	-	-	14,00±2,00	0,160±0,02**
		1,72	21	-	6	-	17	-	-	13,33±1,96*	0,147±0,02**
		3,43	25	1	5	-	24	1	-	17,00±2,17	0,187±0,02
		6,86	24	-	7	-	14	1	-	13,67±1,98*	0,153±0,02**
		13,75	28	-	6	-	11	-	-	13,33±1,96*	0,150±0,02**
	Geç zamanlı muamele	0,86	23	1	16	1	13	-	-	14,67±2,04	0,180±0,02*
		1,72	19	-	7	-	11	-	-	11,67±1,86**	0,123±0,02***
		3,43	29	-	7	-	8	-	-	12,67±1,92*	0,147±0,02**
		6,86	22	-	9	1	12	-	1	13,67±1,98*	0,150±0,02**
		13,75	28	-	12	-	12	-	-	15,00±2,06	0,173±0,02*
Kromozomal Anormallik Yüzdesi			51,56	0,57	20,03	0,43	26,99	0,28	0,14		

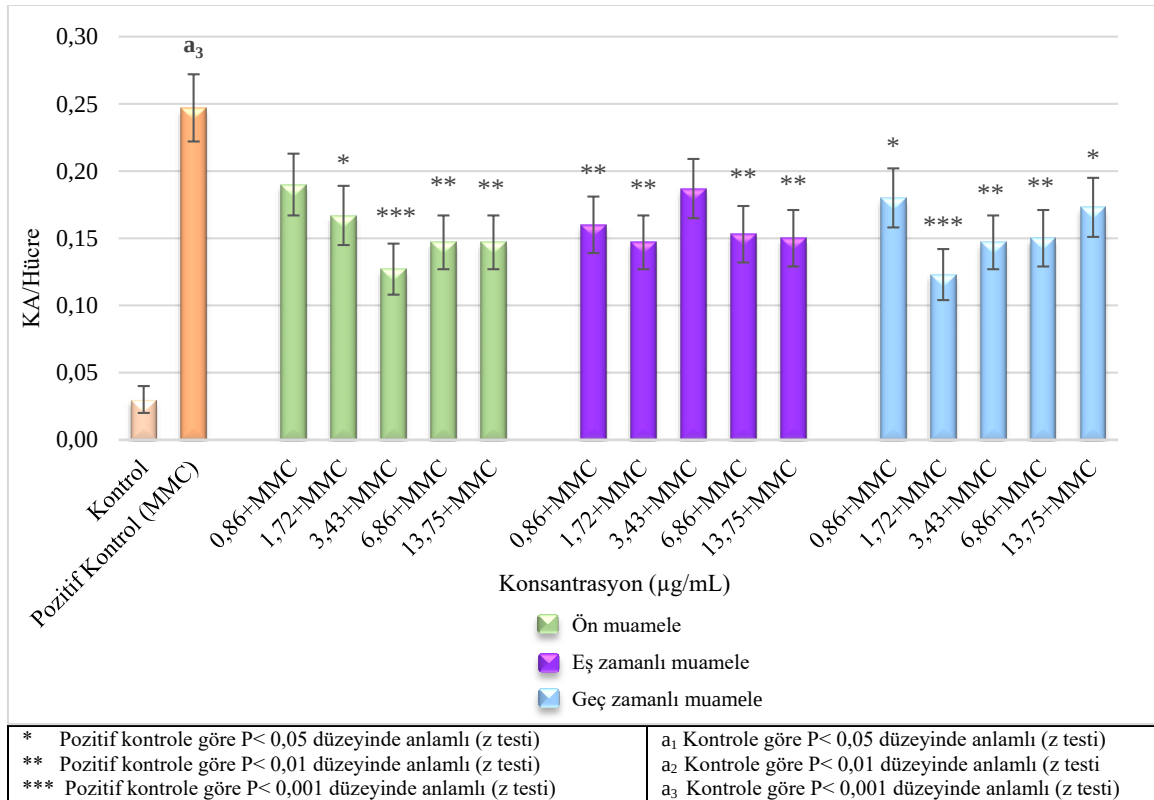
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, h: halka kromozom, SH: Standart Hata

* Pozitif kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
 ** Pozitif kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
 *** Pozitif kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

a₁ Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
 a₂ Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
 a₃ Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.1. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi



Şekil 4.2. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik sayısı

48 saatlik uygulama

48 saatlik uygulama temel alınarak gerçekleştirilen Amygdalin+MMC uygulaması sonucunda sırasıyla kromatid kırığı (%43,68), kromatid değişimi (37,24), fragment (%15,63), kromozom kırığı (%1,82), disentrik kromozom (%1,04), kardeş kromatidlerde birleşme (%0,52) ve halka kromozom (%0,07) olmak üzere yedi farklı yapısal anormallik gözlenmiştir (Çizelge 4.3, Resim 4.1).

Amygdalin+MMC uygulamaları incelendiğinde Amygdalin'in tüm konsantrasyonlarda anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısını pozitif kontrole kıyasla istatistiki olarak önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Bu azalma anormal hücre frekansı için tüm uygulama prosedürlerinde (ön, eş ve geç zamanlı muamele) zayıf oranda konsantrasyona bağlı (sırasıyla $r = -0,71$; $r = -0,41$ ve $r = -0,59$) olarak gerçekleşmiştir. Hücre başına düzen anormallik sayısı ise yalnızca ön ve geç zamanlı muamelelerde ise (sırasıyla $r = -0,72$; ve $r = -0,56$) yine düşük oranda konsantrasyona bağlıdır (eş zamanlı muamele $r = -0,35$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3, Şekil 4.4).

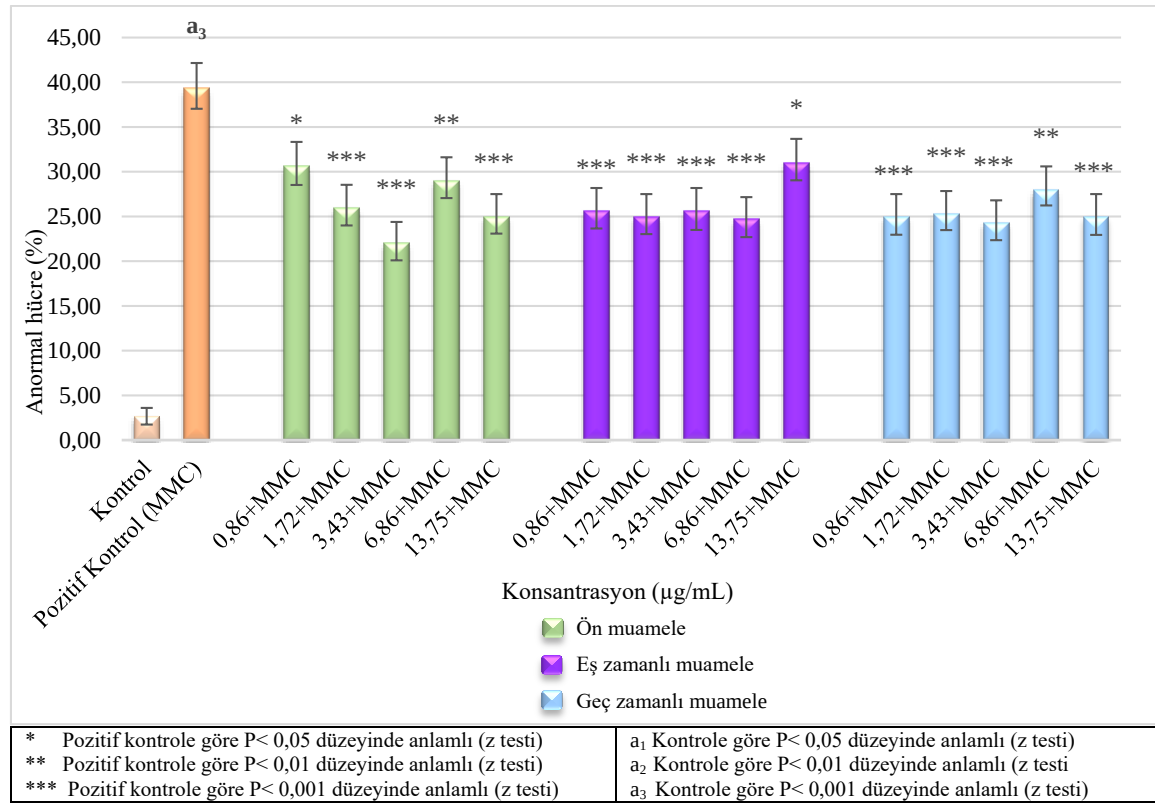
Çizelge 4.3. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Anormallikler								
			ktk	kzk	f	kkb	ktd	ds	h		
Kontrol	48	0,00	7	-	-	14	-	-	-	2,67±0,93	0,027±0,01
Pozitif kontrol (MMC)	48	0,20	69	3	31	3	65	2	-	39,33±2,82 a₃	0,577±0,03 a₃
Amygdalin+MMC	Ön muamele	0,86	57	1	19	2	47	1	-	30,67±2,66*	0,423±0,03***
		1,72	35	3	16	-	44	2	-	26,00±2,53***	0,333±0,03***
		3,43	36	1	14	-	27	-	-	22,00±2,39***	0,260±0,03***
		6,86	40	1	23	-	50	1	-	29,00±2,62**	0,383±0,03***
		13,75	41	2	17	-	35	-	-	25,00±2,50***	0,316±0,03***
	Eş zamanlı muamele	0,86	55	3	14	-	27	2	-	25,67±2,52***	0,337±0,03***
		1,72	35	1	8	-	44	1	-	25,00±2,50***	0,297±0,03***
		3,43	48	2	6	-	40	2	-	25,67±2,52***	0,327±0,03***
		6,86	43	3	13	1	39	-	-	24,67±2,49***	0,330±0,03***
		13,75	56	3	24	2	44	1	1	31,00±2,67*	0,437±0,03***
	Geç zamanlı muamele	0,86	44	3	21	2	31	1	-	25,00±2,50***	0,340±0,03***
		1,72	39	-	19	1	34	1	-	25,33±2,51***	0,313±0,03***
		3,43	40	1	15	-	34	2	-	24,33±2,48***	0,307±0,03***
		6,86	55	1	18	-	36	-	-	28,00±2,59**	0,367±0,03***
		13,75	47	3	13	-	40	2	-	25,00±2,50***	0,350±0,03***
Kromozomal Anormallik Yüzdesi			43,68	1,82	15,63	0,52	37,24	1,04	0,07		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, h: halka kromozom, SH: Standart Hata

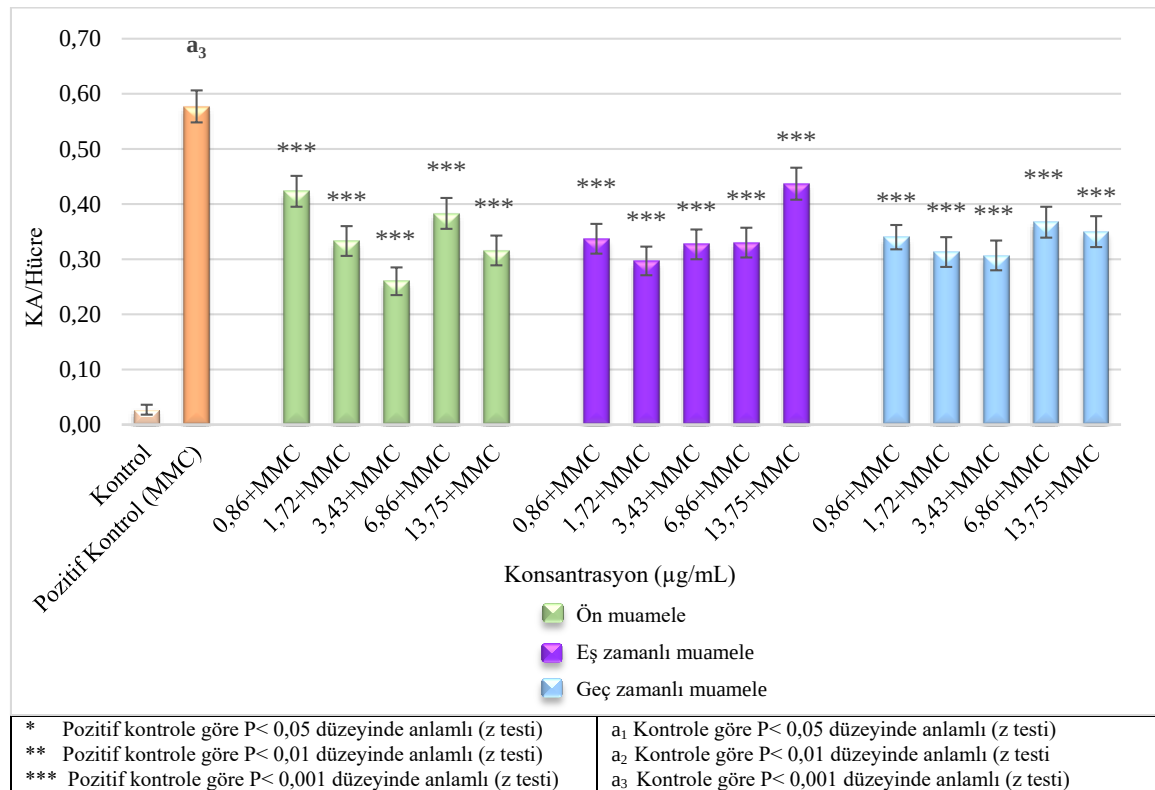
* Pozitif kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
 ** Pozitif kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
 *** Pozitif kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

a₁ Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
 a₂ Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
 a₃ Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

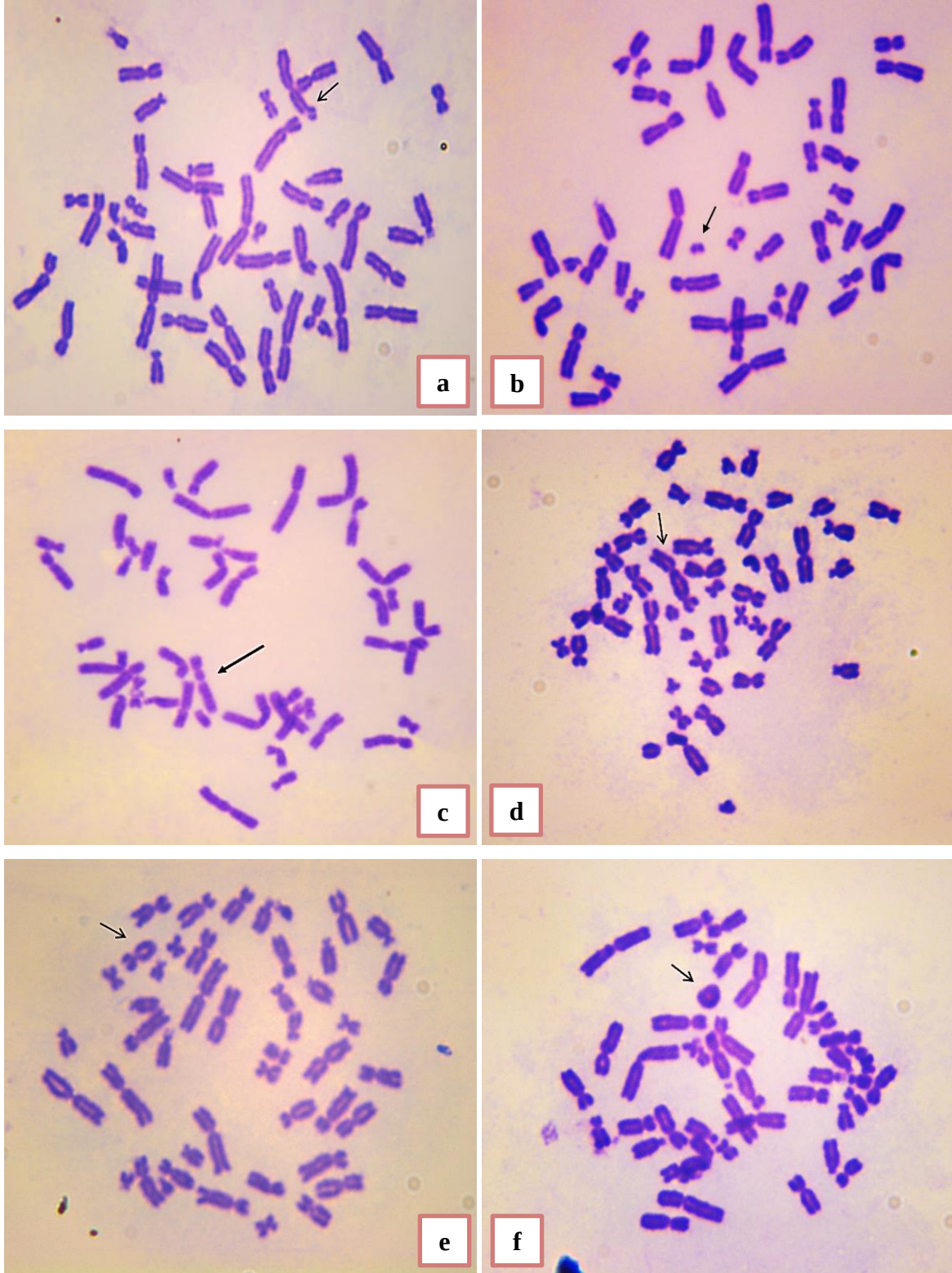


1

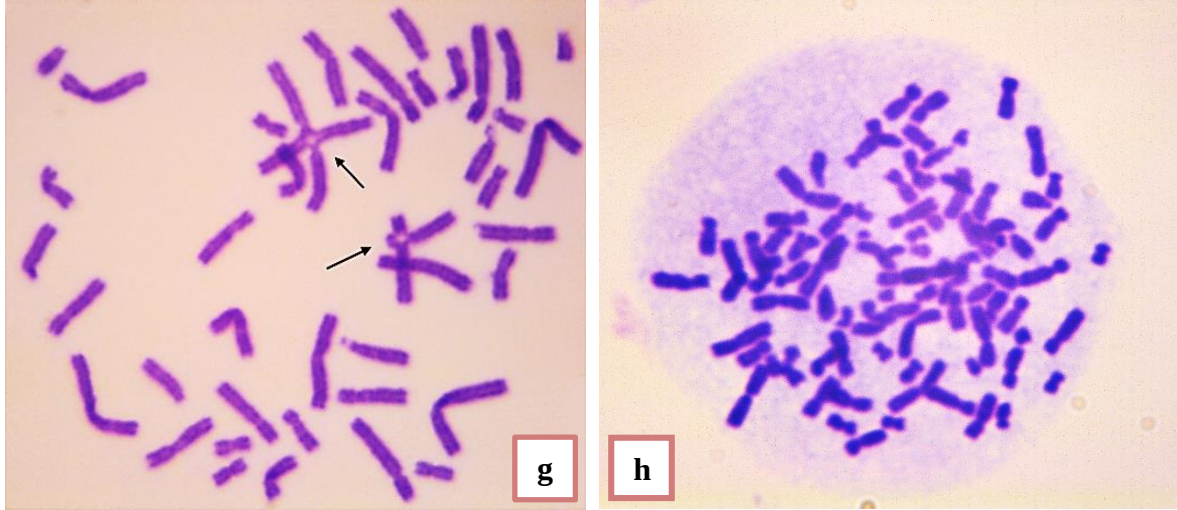
Şekil 4.3. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi



Şekil 4.4. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik sayısı



Resim 4.1. Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler: a) kromatid kırığı b) fragment c) kromozom kırığı d) disentrik kromozom e) kardeş kromatidlerde birleşme f) halka kromozom



Resim 4.1. (devam). Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler: g) kromatid değişimi, h) poliploidi

4.2. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişim (KKD) Testi Sonuçları

4.2.1. Genotoksisite değerlendirmesi

Amygdalin'ın tek başına uygulaması sonucunda insan periferik lenfositlerinde KKD frekansı, Mİ ve Rİ üzerine etkileri Çizelge 4.4 de gösterilmiştir. Amygdalin'ın tek başına uygulandığı kültürlerde hem 24 hem de 48'lik muamelelerde 0-12 arasında KKD oluşumu gözlenmiştir. Amygdalin her iki uygulama süresinde de (24 ve 48 saat) KKD frekansını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmamıştır. Ayrıca Amygdalin 24 ve 48 saatlik uygulamaların her ikisinde de Rİ ve Mİ değerlerini önemli ölçüde değiştirmemiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Amygdalin muamelesi sonucu insan periferik lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) değerleri

Uygulama grubu	Uygulama		Min- Max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	Rİ $\pm$ SH	Mİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/mL)							
Kontrol	24	0,00	1-10	3,63 $\pm$ 0,16	168	195	237	2,12 $\pm$ 0,03	6,60 $\pm$ 0,45
Pozitif Kontrol (MMC)	24	0,20	14-78	37,27 $\pm$ 0,91 a	226	245	129	1,84 $\pm$ 0,03	2,37 $\pm$ 0,28 b₃
Amygdalin	24	0,86	0-8	3,57 $\pm$ 0,15	103	175	322	2,37 $\pm$ 0,03	6,00 $\pm$ 0,43
		1,72	0-9	3,63 $\pm$ 0,16	178	203	219	1,70 $\pm$ 0,02	7,36 $\pm$ 0,48
		3,43	0-11	3,57 $\pm$ 0,15	143	213	244	2,17 $\pm$ 0,03	6,57 $\pm$ 0,45
		6,86	0-11	3,61 $\pm$ 0,16	115	182	303	2,31 $\pm$ 0,03	6,67 $\pm$ 0,46
		13,75	0-12	3,65 $\pm$ 0,17	138	195	267	2,22 $\pm$ 0,03	5,57 $\pm$ 0,42
Kontrol	48	0,00	0-10	3,67 $\pm$ 0,17	103	163	334	2,39 $\pm$ 0,03	6,97 $\pm$ 0,47
Pozitif Kontrol (MMC)	48	0,20	30-128	65,57 $\pm$ 1,47 a	346	212	42	1,10 $\pm$ 0,03	2,63 $\pm$ 0,29 b₃
Amygdalin	48	0,86	0-10	3,85 $\pm$ 0,15	130	165	305	2,29 $\pm$ 0,03	6,93 $\pm$ 0,46
		1,72	0-12	3,61 $\pm$ 0,18	79	183	338	2,27 $\pm$ 0,03	6,86 $\pm$ 0,46
		3,43	0-9	3,37 $\pm$ 0,15	121	159	320	2,33 $\pm$ 0,03	6,90 $\pm$ 0,46
		6,86	0-10	3,35 $\pm$ 0,16	124	186	290	2,28 $\pm$ 0,03	7,10 $\pm$ 0,50
		13,75	0-11	3,65 $\pm$ 0,17	99	166	335	2,39 $\pm$ 0,03	6,10 $\pm$ 0,44

a Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi),

b₁ Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

b₂ Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

b₃ Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)

4.2.2. Antigenotoksosite değerlendirme

24 saatlik uygulama

Amygdalin'in, 24 saat süre ile MMC (0,20 μ g/mL) ile birlikte insan periferik lenfositlerine uygulanması sonucunda Kardeş kromatid değişimi (KKD) ve Replikasyon indeksi (Rİ) üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Amygdalin'in MMC ile birlikte gerçekleştirilen ön muamele uygulamasında 12-66 KKD oluşumu gözlenmiştir. Eş ve geç zamanlı muamele uygulamalarında ise 8-66 KKD oluşumu saptanmıştır. Amygdalin'in, MMC tarafından oluşturulan KKD frekansını tüm uygulama protokolleri (ön, eş ve geç zamanlı muameleler) ve tüm konsantrasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı bulunmuştur. Bu azalmalar yalnızca geç zamanlı muamele (r = -0,76) ve eş zamanlı muamelelerde (r = -0,40, zayıf düzeyde) konsantrasyona bağlı olarak

gerçekleşmiştir ancak ön muamelede ($r = -0,37$) konsantrasyona bağlı değildir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5 ve Resim 4.2).

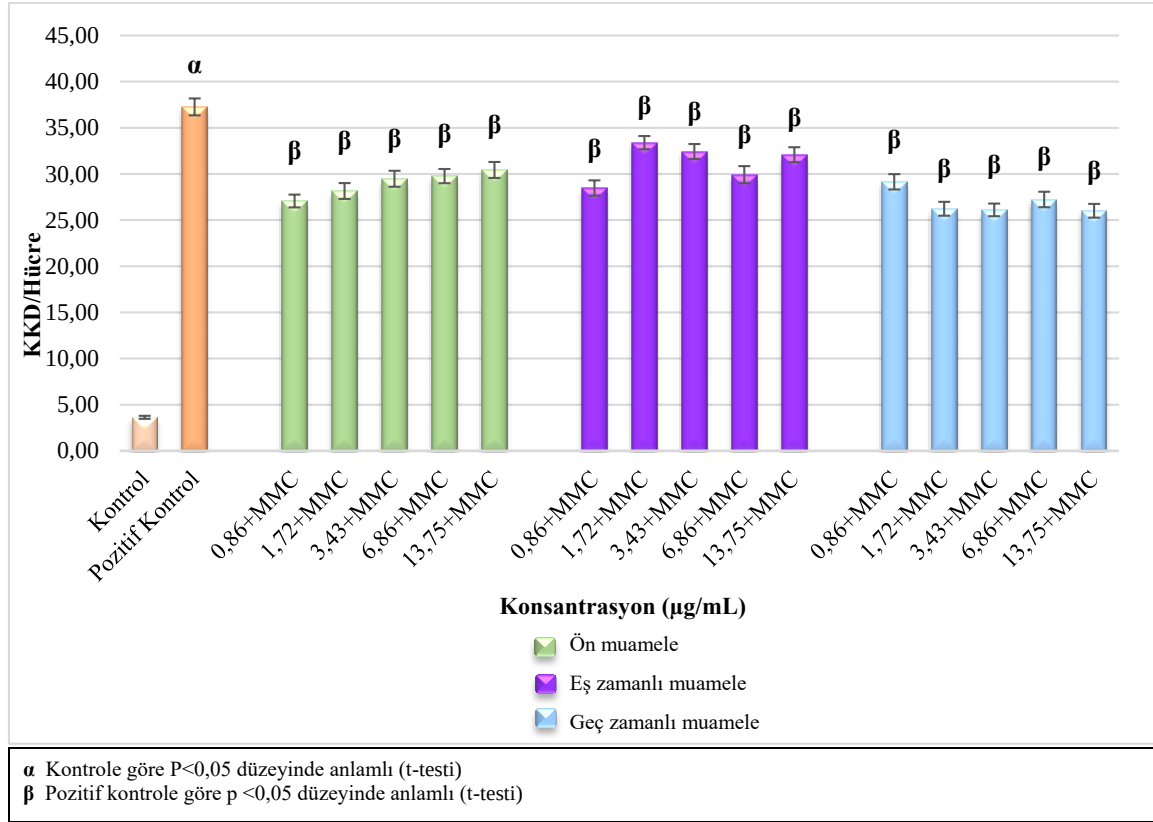
Amygdalin, 24 saat'lik Amygdalin+MMC uygulamalarında replikasyon indeksinde pozitif kontrole göre küçük miktarlarda değişikliğe neden olmuş, ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Amygdalin+MMC kombinasyonlarının tamamında (ön, eş ve geç zamanlı muamele) 24 saatlik uygulamalarda Amygdalin'in pozitif kontrole göre mitotik indeksi istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığı bulunmuştur. Bu artışlar geç zamanlı muamelede ($r=0,86$) güçlü oranda, eş zamanlı muamele ($r=0,43$) ve ön muameleyi ($r=0,75$) içeren tüm uygulamalarda ise düşük oranda doza bağlıdır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6).

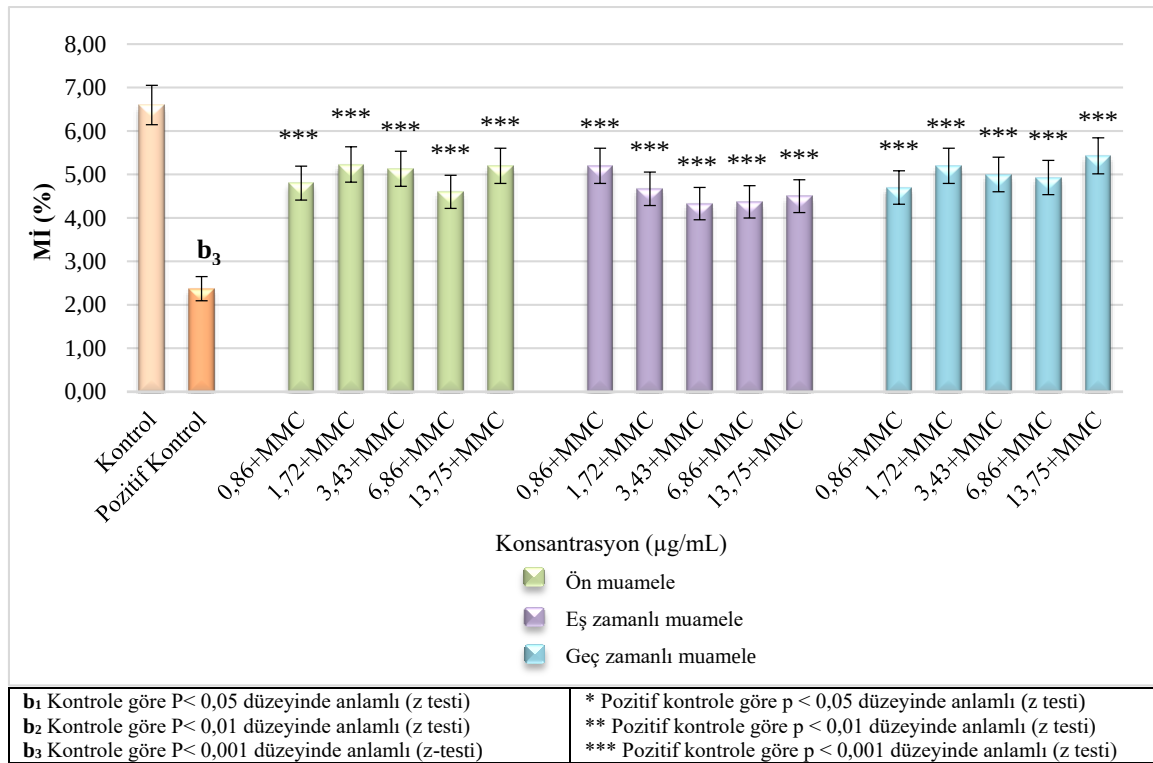
Çizelge 4.5. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferall lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon indeksi (Ri) ve mitotik indeks (Mi) değerleri

Uygulama grubu	Uygulama		Min-Max KKD	KKD/hücre ± SH	M1	M2	M3	Ri±SH	Mi±SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)							
Kontrol	24	0,00	1-10	3,63±0,16	168	195	237	2,12±0,03	6,60±0,45
Pozitif Kontrol (MMC)	24	0,20	14-78	37,27±0,91 a	226	245	129	1,84±0,03	2,37±0,28 b₃
Amygdalin	Ön muamele	0,86+MMC	12-47	27,07±0,69 β	260	271	69	1,68±0,03	4,80±0,39***
		1,72+MMC	12-61	28,15±0,86 β	226	302	72	1,74±0,03	5,23±0,41 ***
		3,43+MMC	9-66	29,48±0,87 β	212	276	112	1,83±0,03	5,13±0,40***
		6,86+MMC	12-51	29,77±0,77 β	244	272	84	1,73±0,03	4,60±0,38***
		13,75+MMC	7-55	30,43±0,87 β	221	273	106	1,81±0,03	5,20±0,41***
	Eş zamanlı muamele	0,86+MMC	9-65	28,47±0,83 β	226	233	141	1,86±0,03	5,20±0,41 ***
		1,72+MMC	16-57	33,39±0,71 β	232	262	106	1,79±0,03	4,67±0,39***
		3,43+MMC	12-56	32,43±0,81 β	263	253	84	1,70±0,03	4,33±0,37***
		6,86+MMC	11-66	29,92±0,93 β	278	233	89	1,69±0,03	4,37±0,37***
		13,75+MMC	8-66	32,09±0,82 β	292	243	65	1,62±0,03	4,50±0,38***
	Geç zamanlı muamele	0,86+MMC	12-53	29,15±0,83 β	207	296	97	1,82±0,03	4,70±0,39***
		1,72+MMC	11-57	26,23±0,75 β	229	289	82	1,76±0,03	5,20±0,41 ***
		3,43+MMC	10-58	26,11±0,69 β	193	277	130	1,90±0,03	5,00±0,40***
		6,86+MMC	7-66	27,23±0,84 β	248	260	92	1,74±0,03	4,93±0,40***
		13,75+MMC	8-50	26,01±0,74 β	220	295	85	1,78±0,03	5,43±0,41 ***

a Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)	b₁ Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)	* Pozitif kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
β Pozitif kontrole göre p <0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)	b₂ Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)	** Pozitif kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
	b₃ Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)	*** Pozitif kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.5. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimi frekansları



Şekil 4.6. 24 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen mitotik indeks değerleri

48 saatlik uygulama

48 saat süre ile gerçekleştirilen Amygdalin+MMC uygulamalarından elde edilen Kardeş kromatid değişimi (KKD) ve Replikasyon indeksi (RI) sonuçları Çizelge 4.6'de sunulmuştur.

Amygdalin ve MMC'nin birlikte uygulandığı kültürler için, ön muamele protokolünde 19-111 KKD oluşumu saptanırken, eş ve geç zamanlı muamelelerde sırasıyla 13-91 ve 16-92 KKD oluşumu gözlenmiştir. Amygdalin'in ön, eş ve geç zamanlı muamele protokollerinin tümünde MMC'nin neden olduğu KKD frekansını test edilen konsantrasyonların tamamı için anlamlı oranda ve zayıf düzeyde doza bağlı olarak (ön muamele $r = -0,42$; eş zamanlı muamele $r = -0,66$ ve geç zamanlı muamele $r = -0,63$) azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.7 ve Resim 4.2).

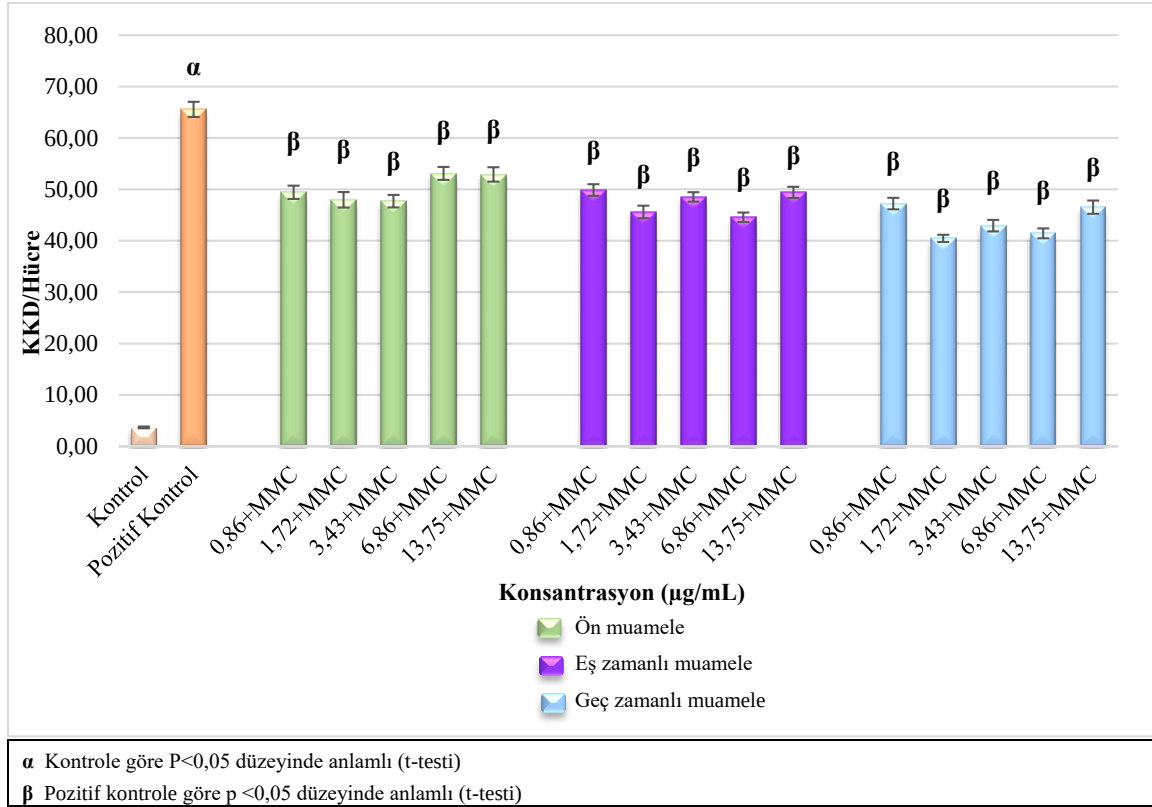
Amygdalin, MMC'in azalttığı replikasyon indeksini tüm uygulama ve konsantrasyonlarda artırmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak önemli değildir. Bununla birlikte, Çizelge 4.6'da görüldüğü üzere M1, M2 ve M3 oranları incelendiğinde, tüm Amygdalin+MMC uygulamalarında M3'e giden hücre sayısının pozitif kontrole göre yaklaşık 4-5 kat azalmış olduğu görülmüştür. Bu azalma özellikle ön ve geç zamanlı muamelelerde daha belirgindir. Analiz edilen total hücrelerin büyük çoğunluğu M1 ve M2 evrelerinde yoğunlaşmıştır.

Amygdalin pozitif kontrole göre mitotik indeksi muamelelerinin tamamında (ön, eş ve geç zamanlı muamele) istatistiksel olarak anlamlı oranda artırmıştır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8). Bu artışlar eş zamanlı muamelede ($r=0,27$) ve geç zamanlı muamele ($r=0,37$) konsantrasyona bağlı olmayıp ön muamelede ($r=0,62$) zayıf oranda konsantrasyona bağlıdır.

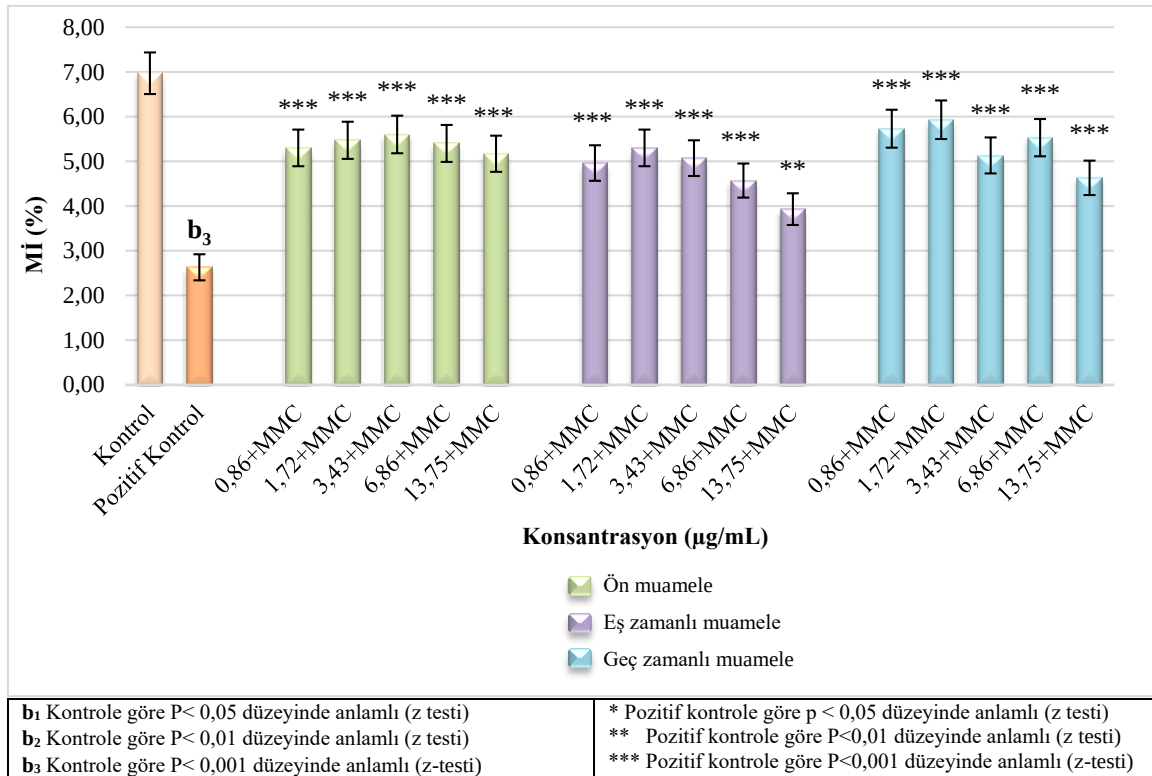
Çizelge 4.6. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferall lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon indeksi (Ri), mitotik indeks (MI) değerleri

Uygulama grubu	Uygulama		Min-Max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	Ri $\pm$ SH	MI $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/mL)							
Kontrol Pozitif Kontrol (MMC)	48	0,00	0-10	3,67 $\pm$ 0,17	103	163	334	2,39 $\pm$ 0,03	6,97 $\pm$ 0,47
	48	0,20	30-128	65,57 $\pm$ 1,47 α	346	212	42	1,09 $\pm$ 0,03	2,63 $\pm$ 0,29 b_3
Amygdalin	Ön muamele	0,86+MMC	19-111	49,43 $\pm$ 1,30 β	373	224	3	1,38 $\pm$ 0,02	5,30 $\pm$ 0,41***
		1,72+MMC	21-105	47,97 $\pm$ 1,52 β	383	209	8	1,38 $\pm$ 0,02	5,47 $\pm$ 0,42***
		3,43+MMC	22-96	47,71 $\pm$ 1,21 β	382	216	2	1,37 $\pm$ 0,02	5,60 $\pm$ 0,42***
		6,86+MMC	25-104	53,11 $\pm$ 1,25 β	416	182	2	1,31 $\pm$ 0,02	5,40 $\pm$ 0,41***
		13,75+MMC	24-98	52,91 $\pm$ 1,41 β	393	207	0	1,35 $\pm$ 0,02	5,17 $\pm$ 0,40***
	Eş zamanlı muamele	0,86+MMC	13-91	49,87 $\pm$ 1,13 β	376	210	14	1,40 $\pm$ 0,02	4,96 $\pm$ 0,40***
		1,72+MMC	13-85	45,61 $\pm$ 1,23 β	379	209	12	1,39 $\pm$ 0,02	5,30 $\pm$ 0,41***
		3,43+MMC	27-91	48,53 $\pm$ 0,93 β	345	227	28	1,47 $\pm$ 0,02	5,07 $\pm$ 0,40***
		6,86+MMC	22-83	44,57 $\pm$ 0,92 β	380	203	17	1,40 $\pm$ 0,02	4,57 $\pm$ 0,38***
		13,75+MMC	16-85	49,41 $\pm$ 1,10 β	404	183	13	1,35 $\pm$ 0,02	3,93 $\pm$ 0,36**
	Geç zamanlı muamele	0,86+MMC	16-92	47,23 $\pm$ 1,12 β	386	211	3	1,36 $\pm$ 0,02	5,73 $\pm$ 0,42***
		1,72+MMC	18-66	40,47 $\pm$ 0,70 β	353	244	3	1,42 $\pm$ 0,02	5,93 $\pm$ 0,43***
		3,43+MMC	16-88	42,94 $\pm$ 1,13 β	363	235	2	1,40 $\pm$ 0,02	5,13 $\pm$ 0,40***
		6,86+MMC	21-85	41,44 $\pm$ 0,97 β	371	219	10	1,45 $\pm$ 0,02	5,53 $\pm$ 0,42***
		13,75+MMC	18-86	46,53 $\pm$ 1,28 β	360	229	11	1,42 $\pm$ 0,02	4,63 $\pm$ 0,38***

α Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)	b_1 Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)	* Pozitif kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
β Pozitif kontrole göre p <0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)	b_2 Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)	** Pozitif kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
	b_3 Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)	*** Pozitif kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.7. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimi frekansları



Şekil 4.8. 48 saat Amygdalin+MMC muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen mitotik indeks değerleri



Resim 4.2. a) Amygdalin ve b) Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferallenfositlerde gözlenen kardeş kromatid değişimlerinden örnekler

4.3. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Mikronükleus (MN) Testi Sonuçları

4.3.1. Genotoksisite değerlendirmesi

Amygdalin'ın tek başına muamelesi sonucunda mikronükleuslu hücrelerin frekansında çok küçük değişimler olsa bile, bu değişimler kontrol göre anlamlı değildir. Amygdalin uygulanan gruplarda, bir ve iki mikronükleus içeren binükleat hücrelere rastlanmış olup nükleer bölünme indeksinde kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.7 ve Resim 4.3).

Çizelge 4.7. Amygdalin muamelesi sonucu insan periferallenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/ml)		(1)	(2)		
Kontrol	48	0,00	3000	15	-	0,50 $\pm$ 0,13	1,74 $\pm$ 0,34
Pozitif Kontrol (MMC)	48	0,20	3000	79	3	2,83 $\pm$ 0,30 c₃	1,38 $\pm$ 0,30
Amygdalin	48	0,86	3000	13	-	0,43 $\pm$ 0,12	1,68 $\pm$ 0,33
		1,72	3000	8	-	0,27 $\pm$ 0,09	1,62 $\pm$ 0,33
		3,43	3000	11	-	0,37 $\pm$ 0,11	1,62 $\pm$ 0,33
		6,86	3000	9	1	0,37 $\pm$ 0,11	1,64 $\pm$ 0,33
		13,75	3000	14	-	0,47 $\pm$ 0,12	1,56 $\pm$ 0,32

c₁ Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

c₂ Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

c₃ Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

4.3.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi

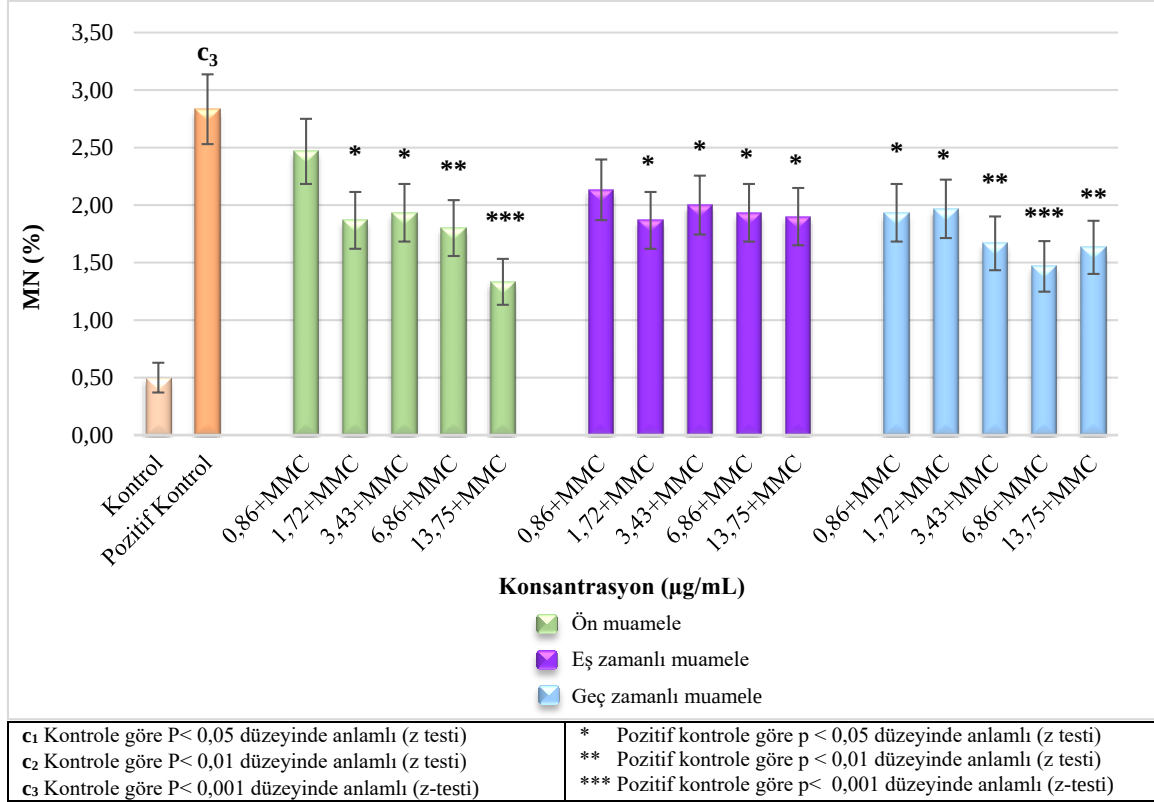
Amygdalin ve MMC'nin birlikte uygulandığı kültürlerde, Amygdalin'in pozitif kontrole göre mikronükleus frekansını tüm uygulamalar ve konsantrasyonlarda azalttığı saptanmıştır. Bu azalma n muamele ve eş zamanlı muamele uygulamalarında en düşük konsantrasyon (0,86 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda anlamlıdır. Geç zamanlı uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemlidir. Bu uygulamalarda gözlenen mikronükleus frekansındaki azalmalar n ($r = -0,95$), eş ($r = -0,75$) ve geç ($r = -0,85$) zamanlı muamelelerin tamamı için konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiş olup, n ve geç zamanlı uygulamalarda bu bağlamda güçlü bir korelasyon vardır. Ayrıca Amygdalin ve MMC'nin birlikte uygulandığı gruplarda, bir ve iki mikronükleus içeren binkleatlara rastlanmıştır. Nükleer bölünme indeksi üzerinde ise pozitif kontrole oranla anlamlı bir etki tespit edilmemiştir (izelge 4.8, şekil 4.9 ve Resim 4.3).

Çizelge 4.8. Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi

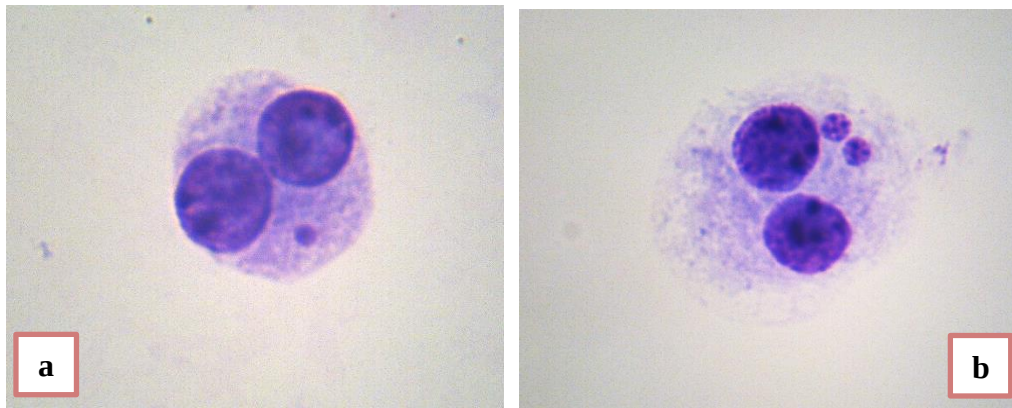
Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)		
Kontrol	48	0,00	3000	15	-	0,50 ± 0,13	1,74 ± 0,34
Pozitif Kontrol (MMC)	48	0,20	3000	79	6	2,83 ± 0,30 c3	1,38 ± 0,30
Amgdalin	Ön muamele	0,86	3000	66	4	2,47 ± 0,28	1,44 ± 0,31
		1,72	3000	54	1	1,87 ± 0,25*	1,42 ± 0,31
		3,43	3000	56	1	1,93 ± 0,25*	1,42 ± 0,31
		6,86	3000	54	-	1,80 ± 0,24**	1,36 ± 0,30
		13,75	3000	40	-	1,33 ± 0,21***	1,44 ± 0,31
	Eş zamanlı muamele	0,86	3000	60	2	2,13 ± 0,26	1,43 ± 0,31
		1,72	3000	52	2	1,87 ± 0,25*	1,51 ± 0,32
		3,43	3000	54	3	2,00 ± 0,26*	1,42 ± 0,31
		6,86	3000	58	-	1,93 ± 0,25*	1,43 ± 0,31
		13,75	3000	53	2	1,90 ± 0,25*	1,48 ± 0,31
	Geç zamanlı muamele	0,86	3000	54	2	1,93 ± 0,25*	1,41 ± 0,31
		1,72	3000	57	1	1,97 ± 0,25*	1,43 ± 0,31
		3,43	3000	50	-	1,67 ± 0,23**	1,45 ± 0,31
		6,86	3000	40	2	1,47 ± 0,22***	1,41 ± 0,31
		13,75	3000	49	-	1,63 ± 0,23**	1,51 ± 0,32

c₁ Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
c₂ Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
c₃ Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)

* Pozitif kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
** Pozitif kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
*** Pozitif kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.9. Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferel lenfositlerinde oluşan mikronükleus frekansı



Resim 4.3. Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi sonucu insan periferel lenfositlerde gözlenen mikronükleus içeren binükleat hücrelere örnekler a) bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre, b) iki mikronükleus bulunduran binükleat hücre

4.4. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Yokluğunda Gerçekleştirilen Comet Testi Sonuçları

Amygdalin'in tek başına ve H₂O₂ (100 µM) ile birlikte üç farklı muamele protokolü kullanılarak (ön, eş ve geç zamanlı muamele) izole lenfositlerle muamelesi sonucunda DNA hasarı üzerine etkileri comet testi kullanılarak iki farklı parametre açısından

değerlendirilmiştir. Bu parametreler comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olup elde edilen veriler Çizelge 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Resim 4.4'de ise comet testinde gözlenen DNA hasarı örnekleri bulunmaktadır.

4.4.1. Genotoksisite değerlendirmesi

Amygdalin'in tek başına 1 saat süre ile izole lenfositlere uygulanması sonucunda comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinde kontrole göre çok küçük artışlar gözlenmiştir. Ancak bu artış düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.9). Dolayısıyla Amygdalin'in test edilen tüm konsantrasyonlarda önemli ölçüde DNA hasarı oluşturmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.9. Amygdalin'in tek başına muamelesi sonucu izole insan periferik lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı

Test Maddesi	Süre (Saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Momenti
Kontrol	1	0,00	8,88 $\pm$ 0,70	2,32 $\pm$ 0,16
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1	100 μM	30,21 $\pm$ 1,45 α	15,00 $\pm$ 1,09 α
Amygdalin	1	0,86	8,90 $\pm$ 0,86	2,18 $\pm$ 0,29
		1,72	10,42 $\pm$ 1,15	3,46 $\pm$ 0,59
		3,43	10,59 $\pm$ 1,13	3,57 $\pm$ 0,69
		6,86	10,44 $\pm$ 1,00	2,97 $\pm$ 0,47
		13,75	8,74 $\pm$ 0,92	2,39 $\pm$ 0,39

α Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

4.4.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi

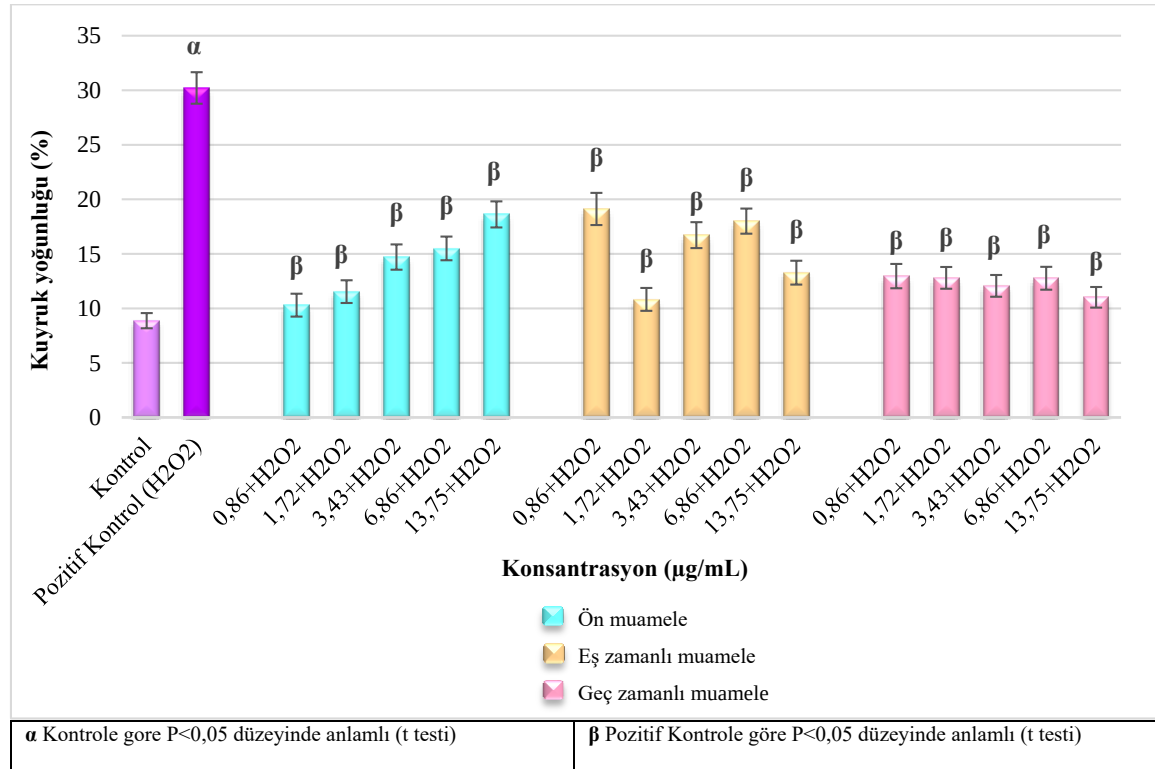
Amygdalin ve H_2O_2 'in birlikte uygulamalarında, Amygdalin'in tüm konsantrasyonlarının H_2O_2 tarafından oluşturulan DNA hasarını ön muamele, eş zamanlı muamele ve geç zamanlı muameleler için istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Bu azalmalar ön muamelede yalnızca kuyruk momenti için ($r = -0,42$ (zayıf oranda)) konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (kuyruk yoğunluğu $r = -0,29$). Eş ve geç zamanlı muameleler için ise kuyruk yoğunluğu (sırasıyla $r = -0,65$ ve $r = -0,71$) ve kuyruk momenti ($r = -0,60$ ve $r = -0,69$) bakımından konsantrasyona bağlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

Çizelge 4.10. Amygdalin ve Amygdalin+H₂O₂ muamelesi sonucu izole insan periferel lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı

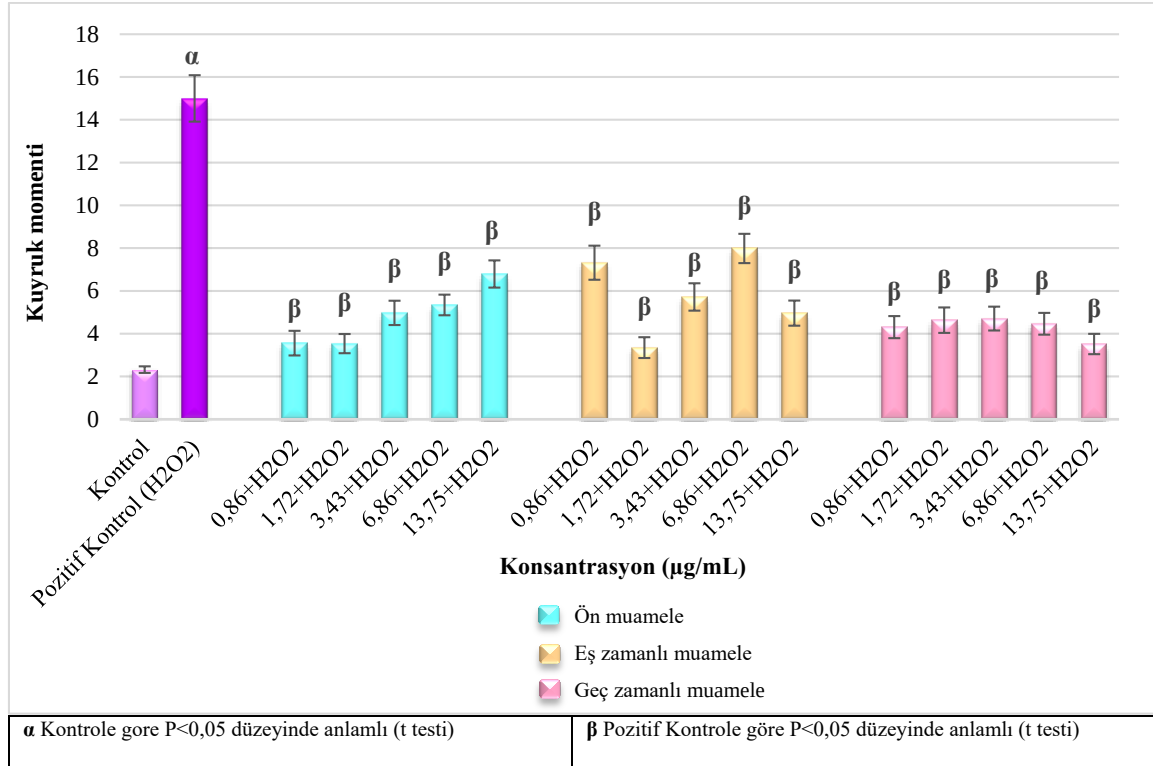
Test Maddesi	Süre (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Momenti
Kontrol	1	0,00	8,88±0,70	2,32±0,16
Pozitif Kontrol (H ₂ O ₂)	1	100 µM	30,21±1,45 α	15,00±1,09 α
Amygdalin+ H ₂ O ₂	Ön muamele	0,86	10,30±1,05 β	3,56±0,58 β
		1,72	11,54±1,05 β	3,54±0,45 β
		3,43	14,70±1,16 β	4,98±0,57 β
		6,86	15,50±1,09 β	5,34±0,48 β
		13,75	18,62±1,20 β	6,79±0,64 β
	Eş zamanlı muamele	0,86	19,12±1,48 β	7,32±0,80 β
		1,72	10,82±1,05 β	3,35±0,49 β
		3,43	16,72±1,19 β	5,72±0,64 β
		6,86	18,01±1,15 β	7,99±0,68 β
		13,75	13,28±1,09 β	4,96±0,59 β
	Geç zamanlı muamele	0,86	12,96±1,12 β	4,31±0,52 β
		1,72	12,80±0,99 β	4,63±0,60 β
		3,43	12,07±1,00 β	4,71±0,56 β
		6,86	12,77±1,05 β	4,47±0,51 β
		13,75	11,02±0,94 β	3,52±0,47 β

α Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

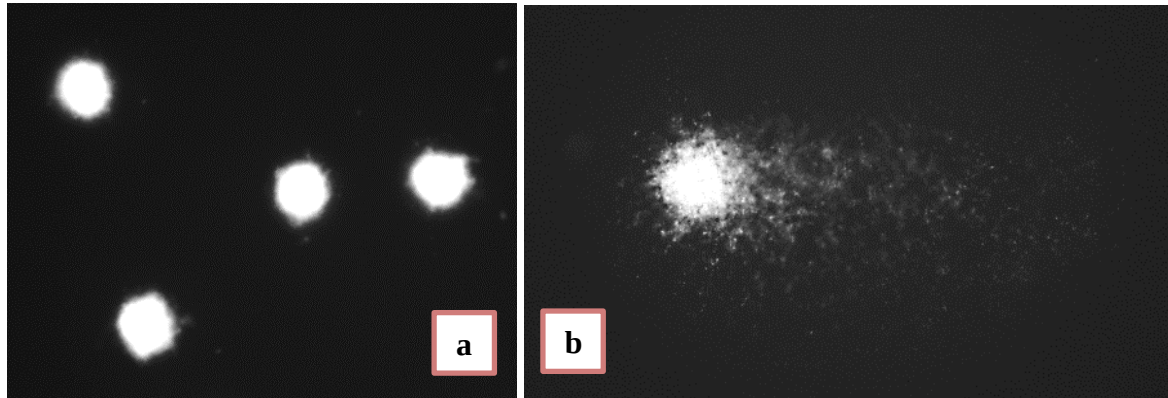
β Pozitif Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.10. Amygdalin+H₂O₂ muamelesi sonucunda izole insan periferel lenfositlerinde comet kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.11. Amygdalin+H₂O₂ muamelesi sonucunda izole insan periferel lenfositlerinde comet kuyruk momenti



Resim 4.4. Amygdalin ve Amygdalin+H₂O₂ uygulamaları sonucunda izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarından örnekler a) Hasarsız DNA b) Hasarlı DNA

4.5. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Varlığında Gerçekleştirilen Kromozomal Anormallik Testi Sonuçları

Amygdalin'in S9 karışımı varlığında insan lenfositlerinde hem tek başına hem de Siklofosamid (SF) ile birlikte eş zamanlı muamelesi sonucunda gözlenen kromozom anormallik tipleri, anormal hücre frekanları ve hücre başına düşen anormallik sayısı Çizelge 4.11'da sunulmuştur.

4.5.1. Genotoksisite değerlendirmesi

Amygdalin'in tek başına muamelesinde üç farklı yapısal anormallik tipi saptanmış olup en fazla kromatid kırığı (%66,67), takiben fragment (%20,00) ve yalnızca bir tane kromatid değişimi (%6,67) izlenmiştir. Ayrıca yalnızca bir tane sayısal anormallik tipi olan poliploidiye (%6,67) rastlanılmıştır. Amygdalin'in anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısını kontrole göre artırmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Resim 4.5).

4.5.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi

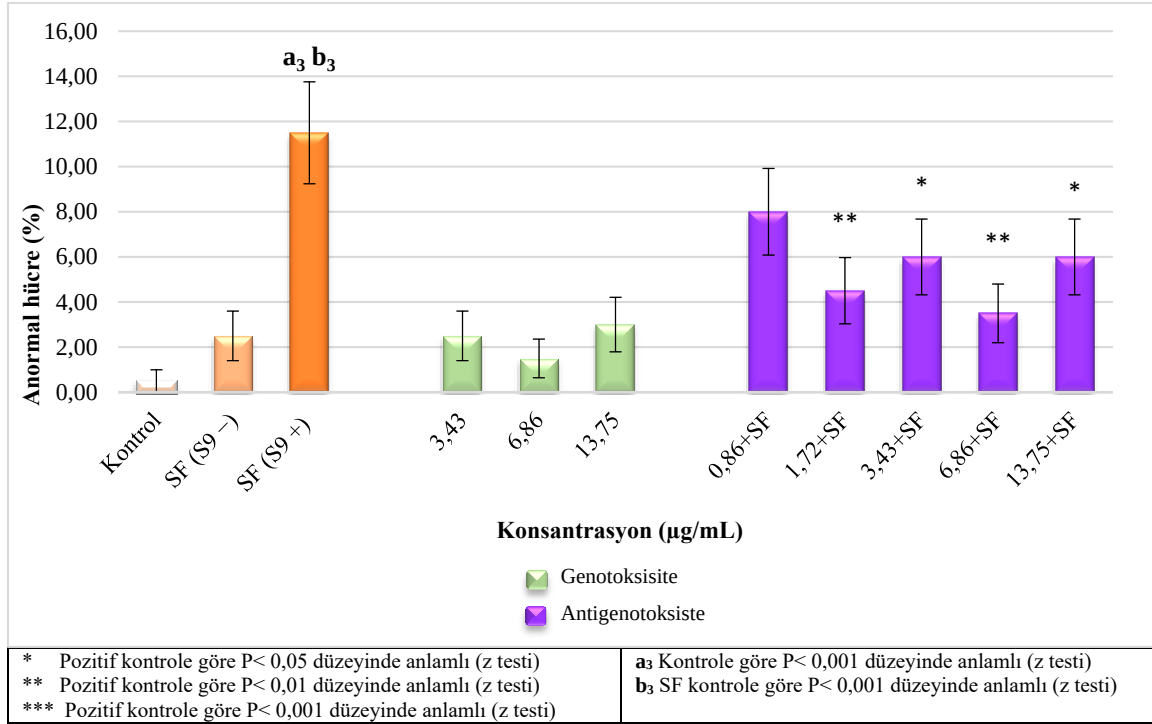
Amygdalin'in SF (12 µg/mL) ile eş zamanlı uygulaması sonucunda beş farklı yapısal anormallik tipine rastlanılmıştır. Bu anormallik tiplerinden en fazla gözlenen kromatid kırığı (%56,90) olup, diğerleri sırasıyla fragment (%24,14), kromatid değişimi (%8,62), kardeş kromatidlerde birleşme (%6,90) ve disentrik kromozom (%3,45)'dur. Eş zamanlı Amygdalin+SF muamelesi sonucunda anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısında pozitif kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalmalar anormal hücre frekansı için en düşük konsantrasyon (0,86 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ve konsantrasyona bağlı ($r = -0,74$) olarak gerçekleşmiştir. Hücre başına düşen anormallik sayısı için ise 1,72; 3,43 ve 6,86 µg/mL'lik konsantrasyonlarda önemli olup söz konusu düşüş konsantrasyona bağlıdır ($r = -0,72$). Bununla birlikte Amygdalin+SF muamelesinde SF'nin neden olduğu kromozomal anormallik oranını en fazla ve belirgin düzeyde azaltan konsantrasyon 6,86 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Resim 4.5).

Çizelge 4.11. Metabolik aktivator (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF uygulaması sonucu insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları

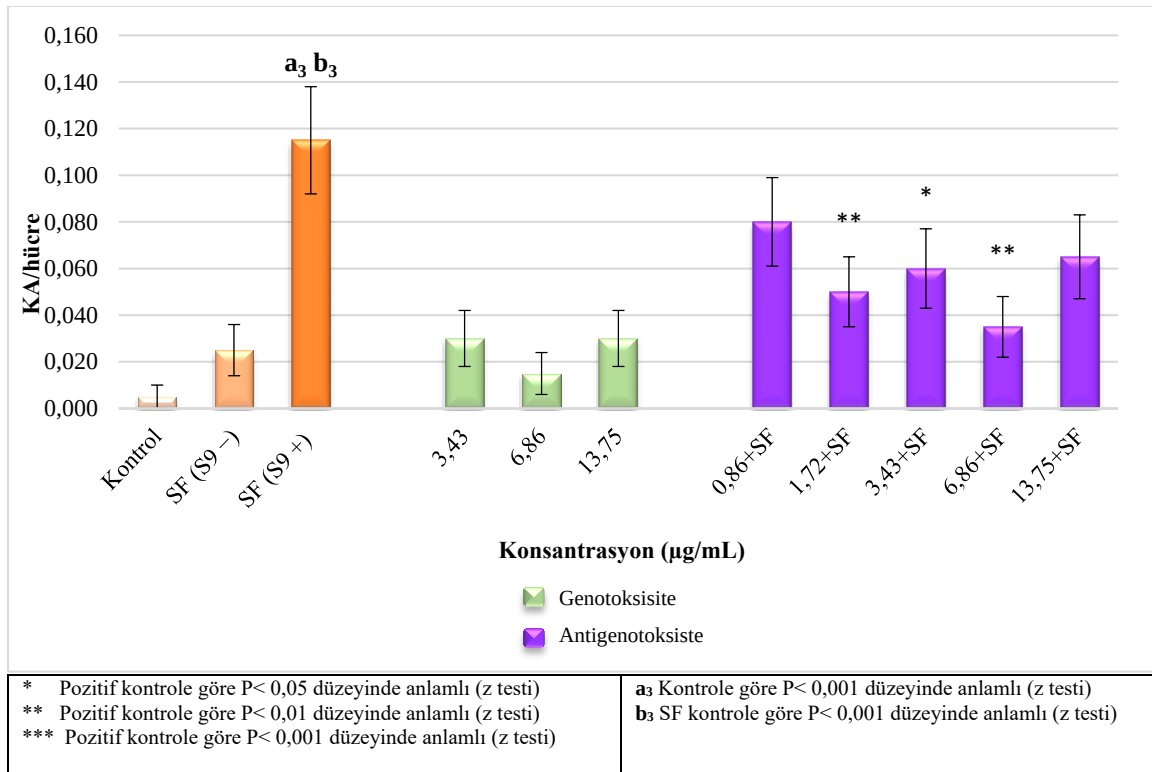
Test maddesi	Uygulama									Anormal hücre (%) ± SH	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)									
			ktk	kzk	f	kkb	ktđ	ds	p		
Kontrol	3	0,00	1	-	-	-	-	-	-	0,50±0,50	0,005±0,01
SF (S9 -)	3	12	3	-	1	1	-	-	-	2,50±1,10	0,025±0,01
Pozitif kontrol (SF, S9 +)	3	12	12	1	3	2	3	2		11,50±2,26 a₃ b₃	0,115±0,02
Amygdalin	3	3,43	3	-	3	-	-	-	-	2,50±1,10	0,030±0,01
		6,86	3	-	-	-	-	-	-	1,50±0,86	0,015±0,02
		13,75	4	-	-	-	1	-	1	3,00±1,21	0,030±0,01
Kromozomal anormallik yüzdesi			66,67	0,00	20,00	0,00	6,67	0,00	6,67		
Amygdalin+SF	3	0,86	8	-	4	2	1	1	-	8,00±1,92	0,080±0,02
		1,72	4	-	3	1	2	-	-	4,50±1,47 **	0,050±0,02 **
		3,43	10	-	1	-	1	-	-	6,00±1,68 *	0,060±0,02 *
		6,86	4	-	2	-	1	-	-	3,50±1,30 **	0,035±0,01 **
		13,75	7	-	4	1	-	1	-	6,00±1,68 *	0,065±0,02”
Kromozomal anormallik yüzdesi			59,90	0,00	24,14	6,90	8,62	3,45	0,00		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi, SH: Standart Hata

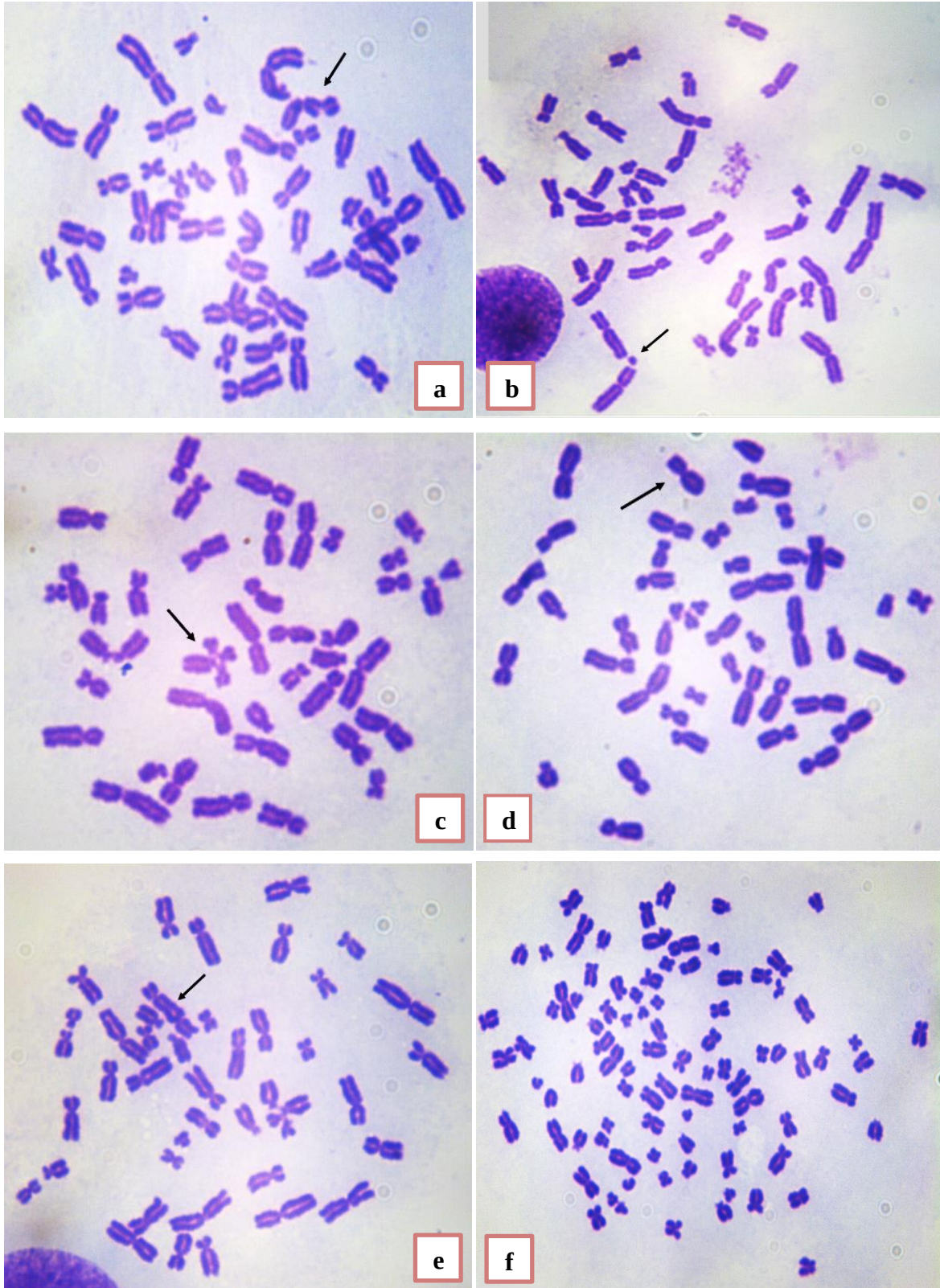
* Pozitif kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)	a ₁ Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
** Pozitif kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)	a ₂ Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)
*** Pozitif kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)	a ₃ Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)
	b ₁ SF kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
	b ₂ SF kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)
	b ₃ SF kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.12. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi



Şekil 4.13. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik sayısı



Resim 4.5. Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler a) kromatid kırığı b) fragment c) Kromatid değişimi d) kardeş kromatidlerde birleşme e) disentrik kromozom f) poliploidi

4.6. Metabolik Aktivatör (S9 karışım) Varlığında Gerçekleştirilen Kardeş Kromatid Değişim Testi Sonuçları

Metabolik aktivatör varlığında (S9 karışım) Amygdalin'in tek başına ve Siklofosfamid (12 µg/mL, SF) ile birlikte eş zamanlı insan lenfositlerine uygulanması sonucunda kardeş kromatid değişimi (KKD), mitotik indeks (Mİ) ve replikasyon indeksi (Rİ) üzerine etkileri araştırılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

4.6.1. Genotoksisite değerlendirmesi

Amygdalin'nin tek başına muamelesi sonucunda 1-8 arasında KKD oluşumu gözlenmiştir. Amygdalin KKD frekansını kontrole göre önemli oranda artırmamıştır. Replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) sonuçlarına göre ise Amygdalin kontrole göre önemli değişimlere sebep olmamıştır (Çizelge 4.12, Şekil 4.14)

4.6.2. Antigenotoksisite değerlendirmesi

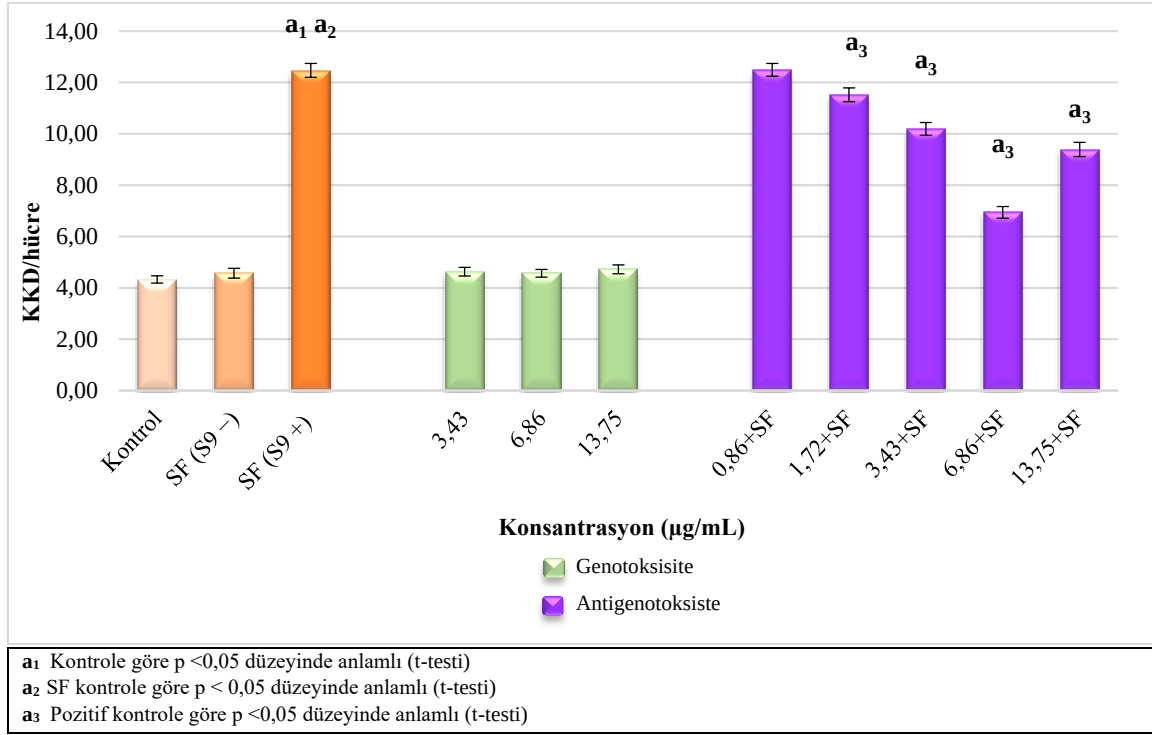
Amygdalin+SF eş zamanlı muamelesinde 2-21 arasında KKD oluşumuna rastlanılmıştır. Bu uygulama sonucunda, Amygdalin pozitif kontrole kıyasla en düşük konsantrasyon (0,86 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda KKD frekansını anlamlı düzeyde ve güçlü oranda konsantrasyona bağlı olarak ($r = -0,83$) azaltmıştır (Çizelge 4.12, Şekil 4.14 ve Resim 4.6). Bu uygulamada SF'nin önemli düzeyde arttığı KKD frekansını en fazla azaltan konsantrasyon 6,86 µg/mL olarak saptanmıştır.

Replikasyon indeksinde (Rİ) eş zamanlı Amygdalin+SF uygulaması sonucu küçük düzeyde değişimle gözlenmiş olup bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Mitotik indeks (Mİ) sonuçlarında ise Amygdalin'in SF'nin önemli oranda düşürdüğü mitotik indeks oranını tüm konsantrasyonlarda güçlü düzeyde konsantrasyona bağlı olarak ($r = 0,95$) istatistiksel olarak anlamlı oranda artırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.15 ve Resim 4.6).

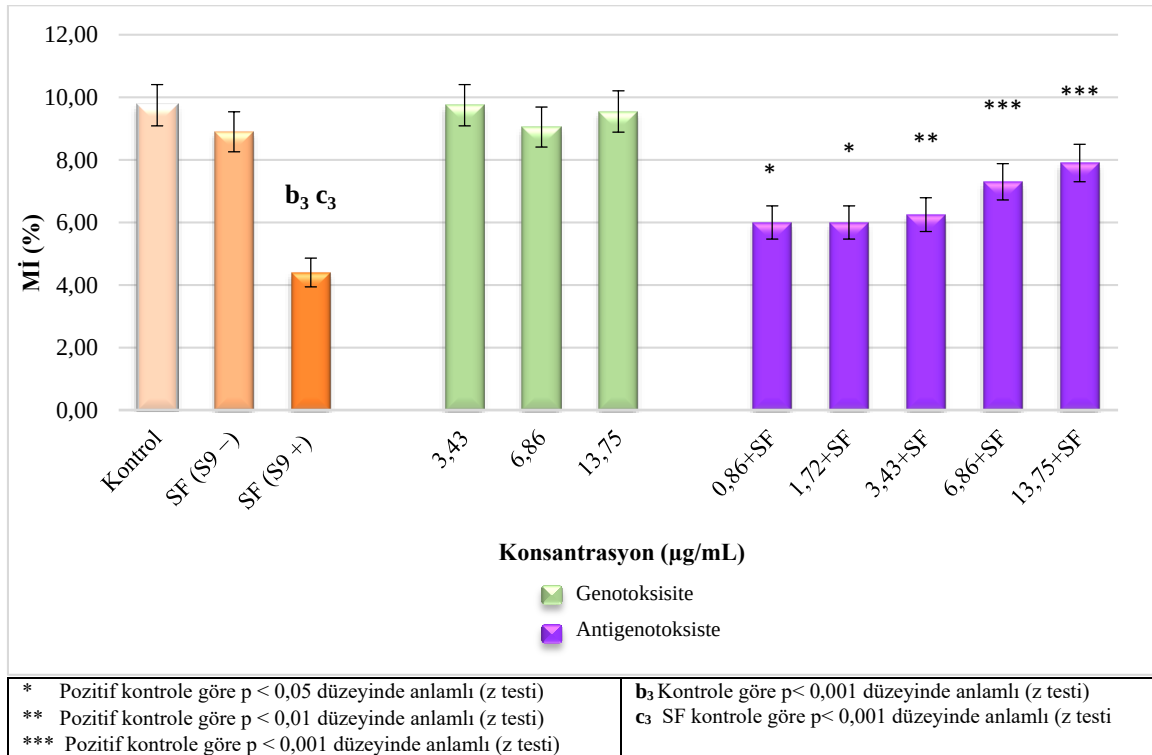
Çizelge 4.12. Metabolik aktivator (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF uygulaması sonucu insan periferik lenfositlerinde gözlenen KKD frekansı, replikasyon ve mitotik indeks değerleri

Uygulama grubu	Uygulama		Min- Max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	Rİ $\pm$ SH	Mİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/mL)							
Kontrol	3	0,00	2-8	4,33 $\pm$ 0,14	87	200	113	2,06 $\pm$ 0,04	9,75 $\pm$ 0,66
SF (S9 -)	3	12	1-10	4,57 $\pm$ 0,19	61	174	165	2,00 $\pm$ 0,04	8,90 $\pm$ 0,64
Pozitif Kontrol (SF, S9 +)	3	12	9-21	12,47 $\pm$ 0,27 a₁ a₂	111	179	110	2,26 $\pm$ 0,04	4,40 $\pm$ 0,46 b₃ c₃
Amygdalin	3	3,43	1-8	4,63 $\pm$ 0,17	118	205	77	1,90 $\pm$ 0,03	9,75 $\pm$ 0,66
		6,86	2-8	4,57 $\pm$ 0,15	106	204	90	1,96 $\pm$ 0,03	9,05 $\pm$ 0,64
		13,75	1-8	4,72 $\pm$ 0,17	95	204	101	2,02 $\pm$ 0,04	9,55 $\pm$ 0,66
Amygdalin+SF	3	0,86	9-21	12,49 $\pm$ 0,25	83	190	127	2,11 $\pm$ 0,04	6,00 $\pm$ 0,53 *
		1,72	8-21	11,52 $\pm$ 0,27 a₃	120	213	67	1,87 $\pm$ 0,03	6,00 $\pm$ 0,53 *
		3,43	6-19	10,19 $\pm$ 0,25 a₃	101	214	85	1,83 $\pm$ 0,03	6,25 $\pm$ 0,54 **
		6,86	2-12	6,94 $\pm$ 0,23 a₃	91	197	112	2,05 $\pm$ 0,04	7,30 $\pm$ 0,58 ***
		13,75	4-17	9,39 $\pm$ 0,28 a₃	97	190	113	2,04 $\pm$ 0,04	7,90 $\pm$ 0,60 ***

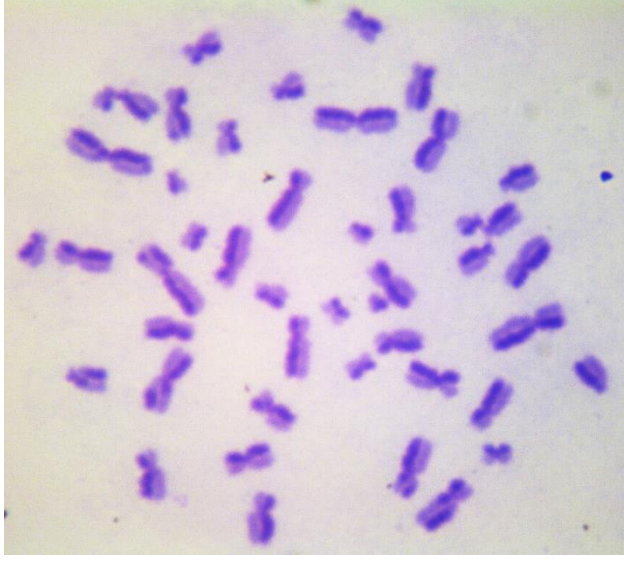
a₁ Kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi) a₂ SF kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi) a₃ Pozitif kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)	b₁ Kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) b₂ Kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) b₃ Kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)
* Pozitif kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) ** Pozitif kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Pozitif kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)	c₁ SF kontrole göre p < 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) c₂ SF kontrole göre p < 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) c₃ SF kontrole göre p < 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.14. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişim frekansları



Şekil 4.15. Metabolik aktivatör (S9 karışım) varlığında Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen mitotik indeks değerleri



Resim 4.6. Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi sonucu insan periferik lenfositlerde gözlenen kardeş kromatid değişimleri için örnek resim

Tez çalışmasında elde edilen tüm sonuçlar Çizelgeler 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da özetlenerek verilmiştir.

Çizelge 4.13. Metabolik aktivator yokluğunda insan periferik lenfosit kültüründe gerçekleştirilen 24 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi genel test sonuçları

Süre (saat)	Konsantrasyonlar	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/ Hücre	Kardeş Kromatid Değişimi	Mitotik İndeks	Muamele protokolü
24 saat	0,86 µg/mL	■	■	■	■	Amygdalin (Tek başına)
	1,72 µg/mL	■	■	■	■	
	3,43 µg/mL	■	■	■	■	
	6,86 µg/mL	■	■	■	■	
	13,74 µg/mL	■	■	■	■	
						Amygdalin+MMC
24 saat	0,86 µg/mL	■	■	↓	↑	Ön muamele
	1,72 µg/mL	■	↓	↓	↑	
	3,43 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	13,74 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
24 saat	0,86 µg/mL	■	↓	↓	↑	Eş zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	3,43 µg/mL	■	■	↓	↑	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	13,74 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
24 saat	0,86 µg/mL	■	↓	↓	↑	Geç zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	3,43 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	13,74 µg/mL	■	↓	↓	↑	

■ Anlamli bir etki yok
 ↑ Kontrolle göre anlamli düzeyde artış/azalış
 ↓ Pozitif kontrole göre anlamli düzeyde artış/azalış

Çizelge 4.14. Metabolik aktivator yokluğunda insan periferik lenfosit kültüründe gerçekleştirilen 48 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+MMC muamelesi genel test sonuçları

Süre (saat)	Konsantrasyonlar	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/Hücre	Kardeş Kromatid Değişimi	Mitotik İndeks	MN	Muamele protokolü
48 saat	0,86 µg/mL	■	■	■	■	■	Amygdalin (Tek başına)
	1,72 µg/mL	■	■	■	■	■	
	3,43 µg/mL	■	■	■	■	■	
	6,86 µg/mL	■	■	■	■	■	
	13,74 µg/mL	■	■	■	■	■	
							Amygdalin+MMC
48 saat	0,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	■	Ön muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	3,43 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	13,74 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
48 saat	0,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	■	Eş zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	3,43 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	13,74 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
48 saat	0,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	Geç zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	3,43 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	
	13,74 µg/mL	↓	↓	↓	↑	↓	

■ Anlamli bir etki yok
 ↑↓ Kontrolle göre anlamli düzeyde artış/azalış
 ↑↓ Pozitif kontrolle göre anlamli düzeyde artış/azalış

Çizelge 4.15. Metabolik aktivator yokluğunda izole insan lenfositlerinde gerçekleştirilen 1 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+H₂O₂ muamelesi genel sonuçları

Süre (saat)	Konsantrasyonlar	Kuyruk yoğunluğu	Kuyruk momenti	Muamele protokolü
1 saat	0,86 µg/mL	■	■	Amygdalin (Tek başına)
	1,72 µg/mL	■	■	
	3,43 µg/mL	■	■	
	6,86 µg/mL	■	■	
	13,74 µg/mL	■	■	
				Amygdalin+H ₂ O ₂
1 saat	0,86 µg/mL	↓	↓	Ön muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	
	3,43 µg/mL	↓	↓	
	6,86 µg/mL	↓	↓	
	13,74 µg/mL	↓	↓	
1 saat	0,86 µg/mL	↓	↓	Eş zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	
	3,43 µg/mL	↓	↓	
	6,86 µg/mL	↓	↓	
	13,74 µg/mL	↓	↓	
1 saat	0,86 µg/mL	↓	↓	Geç zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	
	3,43 µg/mL	↓	↓	
	6,86 µg/mL	↓	↓	
	13,74 µg/mL	↓	↓	

■ Anlamlı bir etki yok



Pozitif kontrole göre anlamlı düzeyde artış/azalış

Çizelge 4.16. Metabolik aktivator varlığında (S9 karışım) insan periferik lenfosit kültüründe gerçekleştirilen 3 saat'lik Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi genel test sonuçları

Süre (saat)	Konsantrasyonlar	Anormal Hücre Yüzdesi	KA/ Hücre	Kardeş Kromatid Değişimi	Mitotik İndeks	Muamele protokolü
3 saat	3,43 µg/mL	■	■	■	■	Amygdalin (Tek başına)
	6,86 µg/mL	■	■	■	■	
	13,74 µg/mL	■	■	■	■	
						Amygdalin+SF
3 saat	0,86 µg/mL	■	■	■	↑	Eş zamanlı muamele
	1,72 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	3,43 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	6,86 µg/mL	↓	↓	↓	↑	
	13,74 µg/mL	↓	■	↓	↑	

■ Anlamli bir etki yok
 ↑ ↓ Kontrolle göre anlamli düzeyde artış/azalış
 ↑ ↓ Pozitif kontrolle göre anlamli düzeyde artış/azalış

5. TARTIŞMA

Kanser, kontrolsüz çoğalan ve yayılan anormal hücreler olarak karakterize edilen hastalık grubunu ifade etmektedir (Spasić, Livsey, Keane ve Nenadić, 2014). Bugün kanserin somatik hücrelerde hücre büyümesi ve hücreler arası iletişimde görev alan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu mutasyonları teşvik eden birçok karsinogen tanımlanmış olup, bunların %90'ının genotoksik olduğu belirlenmiştir. Bu ajanlar karsinogenezin çok adımlı süreçlerine (inisiyasyon, promosyon ve progresyon) müdahil olup, malign transformasyonları indükleyerek neoplastik gelişimlere neden olmaktadır. Özellikle karsinogenezin başlamasında (inisiyasyon) önemli genlerde veya kromozomlarda mutasyonların oluşumuna genotoksik etkilerin aracılık ettiği doğrulanmıştır (Ma ve diğerleri, 2021; Radu ve diğerleri, 2014). Kanser insidansı ve ölüm oranları dünya çapında gün geçtikçe artmaktadır. Öyle ki kanser hastalıkları ölüme sebebiyet veren hastalıklar arasında dünya genelinde ikinci sırada (ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde birinci sırada) yer almaktadır (Jemal ve diğerleri, 2011; Meybodi ve diğerleri, 2017). Bu artış yaşlanma ve nüfus büyümesini içine alan sosyoekonomik ve teknolojik gelişimlerin neden olduğu risk faktörlerinde meydana gelen artışla ilişkilendirilmektedir. Çünkü yapılan araştırmalar sonucunda kanserin çok az bir kısmının (%5-10) genetik faktörlere, büyük bir kısmının (%90-95) ise çevresel faktörlere bağlı olduğu ispatlamıştır (Irigaray ve diğerleri, 2007; Ruiz ve Hernández, 2016; Woźniak ve diğerleri, 2021).

Kanser tedavisinde klasik yöntemlerin yanı sıra (kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi) farklı pek çok yöntem geliştirilmiş, tanı ve teşhisi iyileştirmek için büyük bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu gelişme kanser hastalarında toplam sağ kalım oranlarını artırmada fazla bir katkı sağlamamıştır (Okimoto ve Bivona, 2014; Krepler ve diğerleri, 2016; Zubair ve diğerleri, 2017). Klasik kanser tedavilerinde özellikle radyoterapi ve kemoterapi'nin sadece kanser hücrelerini etkilemediği sağlıklı hücrelere de zarar vererek ikincil tümörlerin ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (Nussbaumer, Bonnabry, Veuthey ve Fleury-Souverain, 2011). Bununla birlikte bu kanser tedavilerinin pek çok yan etkisi olduğu ve bu yan etkilerin ise hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, pek çok kanser hastası (yaklaşık %80) daha ucuz olmaları, kolay ulaşılabilimleri ve düşük seviyede yan etkilerinden dolayı özellikle bitkisel kaynaklı Alternatif ve Tamamlayıcı Tıp (TAT) yöntemlerini tercih eder hale gelmiştir (Blaheta ve diğerleri, 2016;

Doğan, Abuaf ve Karabacak, 2012; Düzen ve Korkmaz, 2015; Purushothaman ve diğerleri, 2020).

İnsanlarda gözlenen birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde bitkilerin (yapraklar, gövdeler, kabuklar, kökler ve gövdeler) ve bitki ürünlerinin (özütler vb.) kullanımı oldukça eski zamanlara (M.Ö.3000) dayanmaktadır (Raskin ve diğerleri, 2002). Örneğin 1770'lerde kimyasal olarak sentezlenen ilaçların oldukça az oluşu veya hiç olmaması nedeniyle bitkiler ana tedavi kaynakları olarak kullanılmıştır (Purushothaman ve diğerleri, 2020). Yirminci yüzyıl, sentetik kimya ağırlıklı ilaç endüstrisinin atılım yaptığı dönem olup bu dönemde doğal özütler, genellikle doğal ürünlerle bağlantısı olmayan sentetik moleküllerle değiştirilmiştir. İlaç endüstrisinin bu yükselişi, hastalıkların tedavisi ve önlenmesi üzerinde muazzam bir etki yaratarak, yirminci yüzyılın olağanüstü başarılarından biri haline gelmiştir (Raskin ve diğerleri, 2002). Ancak bu başarı kanser ve genetik hasara dayalı hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde beklenen düzeyde gerçekleşememiş, hastalığın insidansı ve ölüm oranlarını azaltamamıştır (Sung ve diğerleri, 2021). Dahası, yaşadığımız çağda insanların maruz kaldığı çevresel genotoksik ve mutajenik ajanların sayısında meydana gelen artış bilim ve teknolojiye hızlı gelişimin hazin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Bu ajanlar somatik ve germ hücrelerinin DNA ve kromozomlarında tehlikeli değişimlere neden olarak farklı kanser tiplerini içeren neoplastik gelişimlere ve doğumsal anormalliklere sebep olmaktadır (López-Romero ve diğerleri, 2018; Słoczyńska ve diğerleri, 2014; Tuenter ve diğerleri, 2020). Normalde iyi bilinen risk faktörlerine maruz kalmaktan kaçınmak bu tarz malign gelişimlerden korunmak için en doğru yaklaşımdır. Ancak ne yazık ki modern dünyada mutajenik ve genotoksik risk ihtiva eden durumları tamamen ortadan kaldırmak söz konusu değildir. Bu nedenle, son yıllarda çevresel karsinojenlere ve kemoterapötik ilaçlara karşı antigenotoksik, antimutajenik ve antikarsinojenik bileşiklerin belirlenmesi, tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları yaygın ve önemli bir strateji haline gelmiştir (Izquierdo-Vega ve diğerleri, 2017; López-Romero ve diğerleri, 2018). Bunların yanında, özellikle kanserin tedavisinde en az yan etki oluşturan ve güçlü etkileri bulunan yeni moleküller geliştirme ihtiyacı yeni anti-kanser ilaçları için sekonder bitki metabolitlerine dikkatleri çekmiştir. Çünkü allelokimyasallar olarak bilinen bu doğal bileşikler (alkaloidler, siyanojenik glikozitler, fenolik bileşikler vb.) bitkiler tarafından genellikle savunma amaçlı üretilmekle birlikte, düşük sitotoksikite ve yüksek farmakolojik aktiviteye sahiptirler (Chen ve diğerleri, 2020; Ijaz ve diğerleri, 2018; Wink, 2003). Tüm bunlar düşünüldüğünde, bu fitobileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* genotoksikite/antigenotoksikite araştırmalarının yapılarak

risk/yarar analizlerinin gerçekleştirilmeleri doğru tanımlanmaları açısından son derece önemlidir. Çünkü terapötik açıdan etkili olabilecek yeni ajanların genotoksik veya mutajenik olmaması doğal kemopreventif maddelerin tanımlanmasında başrol oynamaktadır.

Fitobileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin incelenmesinde *in vitro* ve *in vivo* pekçok genotoksisite testleri tercih edilmektedir. Bu testlerde prokaryotik (*S. typhimurium*, *E. coli*) ve ökaryotik (*S. cerevisiae*) organizmaların yanı sıra çeşitli memeli hücreleri de kullanılmaktadır. *In vitro* çalışmalarda özellikle insan periferik kan lenfositleri sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca bu kültürlerle S9 adı verilen post mitokondriyal memeli metabolik enzim karışımları eklenerek *in vivo* ksenobiyotik aktivasyonu ve detoksifikasyonu taklit edilebilmektedir. Bu sayede test bileşiğinin metabolizması sonucu oluşan ürünlere yönelik etkiler değerlendirilebilmektedir. Günümüzde fitobileşiklerin tanımlanmaları ve değerlendirilmelerinde sitogenetik düzeyde genellikle kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri kullanılmaktadır. Ayrıca DNA hasarının görsel olarak ölçülmesine izin veren comet testi de yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu testlerin hem S9 karışım varlığında hem de yokluğunda gerçekleştirilmeleri *in vitro* protokoller için temel bir uygulama olmuştur (Avuloğlu-Yılmaz ve diğerleri, 2020; Burlinson, 2012: 144; Cartus ve Schrenk, 2017; David, 2020, Shao ve diğerleri, 2020).

Periferik kan lenfositlerindeki genetik hasar seviyesinin, hedef dokularda kanserojenik sürece yol açan öncü hücrelerdeki hasar miktarını yansıttığı varsayılmaktadır. İnsan periferik lenfositleri (özellikle T-lenfositleri), genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hücrelerdir (Fenech, Crott, Turner ve Brown, 1999; Joseph ve diğerleri, 2009). Çünkü lenfositlerin yaklaşık olarak %80'i periferik kandan ayrılarak vücudu dolaşabilmektedir. Lenfositler, dalak, lenf düğümleri ve diğer dokulardan geçerek tekrar kan dolaşımına katılırlar. Bu nedenle, vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkan hasarlı DNA'yı içeren lenfositler, periferik kanda görülebilecektir (Velickova ve Milev, 2020).

Bu tez çalışmasında birçok bitkide özellikle de *Rosaceae* familyasına ait türlerin tohumlarında yüksek miktarlarda bulunan Amygdalin adlı bir siyanojenik glikozitin genotoksik ve antigenotoksik etkileri *in vitro* insan lenfositlerinde metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda ve varlığında analiz edilmiştir. Bu doğrultuda metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda gerçekleştirilen araştırmada kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılmıştır.

Antigenotoksisite değerlendirmelerinde ön, eş ve geç zamanlı muameleler olmak üzere üç farklı muamele protokolü kullanılmış olup genotoksik etki oluşturmak için bir anti-neoplastik ajan olan mitomisin-C (MMC) ve oksidan bir genotoksin olan hidrojen peroksit (H_2O_2 , comet) seçilmiştir. Metabolik aktivator (S9 karışım) eklenen deneylerde ise Amygdalin'e ait metabolitlerin genotoksik/antigenotoksik potansiyelleri kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile analiz edilmiştir. Bu çalışmanın antigenotoksisite kısmında ise genotoksin olarak siklofosamid adı verilen bir anti-tümöral ajan tercih edilmiş ve eş zamanlı muamele protokolü kullanılmıştır.

Mitomisin-C (MMC), önemli bir kemoterapötik ilaç olarak kabul edilen antimitotik bir ajandır. Testis, servikal, meme, akciğer, mide ve uterus gibi çeşitli habis insan tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang ve diğerleri, 2010). Esas olarak alkilleyici bir ajan olan bu bileşik memeli hücrelerinde, DNA sentezinin seçici inhibisyonu, mutajenez, ve genetik rekombinasyonun uyarılması, kromozom kırılması dahil olmak üzere geniş bir genotoksisite spektrumuna sahiptir. DNA alkilasyonu hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında meydana gelebilmesine rağmen özellikle hücre döngüsünün geç G1 ve S fazları sırasında DNA sentezini etkilemektedir. Bu nedenle MMC, genotoksik bir antibiyotik olarak çalışmakla birlikte yüksek konsantrasyonlarda hücresel RNA ve protein sentezlerini de baskılayarak apoptoz ve nekrozu indüklemektedir (Mirshahi ve diğerleri, 2018; Verweij ve Pinedo, 1990). MMC, DNA apraz bağlama eylemini başlatmak için yalnızca hücre içi indirgeyici aktivasyona ihtiyaç duyan ve doğrudan hareket eden bir klastojendir. Esasen, guaninin N-2 pozisyonunu alkilleyerek monoadductlar veya zincir içi ya da zincirler arası çapraz bağların oluşumuna neden olur. Zincirler arasında oluşan çapraz bağlar DNA zincirinin ayrılmasını önlediği ve DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu tamamen bloke edebildiği için MMC toksisitesi temelde bu eklentiler (adduct) ile ilişkilendirilmiştir (Milić ve Kopjar, 2004). Bu antineoplastik ajan biyo-indirgeyici dönüşümden sonra, DNA'yı hedef alan ve hücreler içinde oksidatif hasara neden olan reaktif ara ürünler oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda, MMC yapısında bulunan kinon kısmının bir veya iki elektronlu indirgenmesi sonucu sırasıyla her ikisi de güçlü DNA alkilleyiciler olan bir semikinon serbest radikal ara ürünü veya bir hidrokinon ara ürünü açığa çıkmaktadır (Krishna ve diğerleri, 1991; Maatouk ve diğerleri, 2018; Pawar ve diğerleri, 2009; Sassi ve diğerleri, 2021; Wang ve diğerleri, 2010). Bu elektrofilik ara ürünlerden semikinon aerobik koşullar altında, süperoksit anyonu üreten ana bileşiğe oksitlenir. Süperoksit anyonu daha sonra H_2O_2 'e dönüşerek eser metallerin varlığında hidroksil radikalleri oluşturmaktadır Açığa

çıkan bu reaktif oksijen türleri (ROT), lipidler, protein ve DNA dahil olmak üzere hücre içi makromoleküllere zarar vererek oksidatif stres ve toksisiteye neden olabilmektedir (Komiya, Kikuchi ve Sugiura, 1982; Maatouk ve diğerleri, 2018; Sassi ve diğerleri, 2021; Wang ve diğerleri, 2010). Ayrıca, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazlar (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini baskılayarak oksidatif stresin artmasına katkı sağladığı bilinmektedir (Türkez, Aydın ve Aslan, 2012).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen comet testinde, DNA hasarını teşvik etmek amacıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. S9 karışım yokluğunda gerçekleştirilen diğer testlerde olduğu gibi MMC kullanılmamıştır. Çünkü MMC'nin, DNA'da çapraz bağlara sebep olan bir ajan olması nedeniyle DNA kırıklarının gözlenebilmesi mümkün görünmemektedir (Speit, Schütz ve Merk, 2000). Ayrıca MMC hücre döngüsünün geç G1 ve/veya S fazına spesifik bir ajandır. Comet testinde ise durağan fazdaki (G0/G1) lenfosit hücreleri kullanılmakta ve uygulama süresi 1 saat ile sınırlı tutulmaktadır. Bu nedenle MMC'nin DNA'ya etkin bir şekilde hasar verebileceği düşünülmemektedir. Hasar düzeyinin tespiti hususunda şüphe ve yanılgılara sebebiyet verebilmektedir. Bu nedenle comet testinde güçlü bir oksidan olan H_2O_2 tercih edilmiştir. Reaktif bir ROT türevi olan H_2O_2 , oksidatif hasardan en çok sorumlu olan radikal olarak kabul edilmektedir. Farklı hücre ve hücre hatlarının kullanıldığı *in vitro* comet testlerinde oksidatif DNA hasarını taklit etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir ajandır (Behravan ve diğerleri, 2011; Benhusein, Mutch, Aburawi ve Williams, 2010; Farshori ve diğerleri, 2021; Kotanoğlu ve diğerleri, 2020; Song, Gou ve Zhang, 2015). Hidrojen peroksit (H_2O_2), genotoksik bir ajandır, ancak doğrudan DNA ile reaksiyona girmez. Bununla birlikte, biyolojik zarlardan geçerek, çekirdeğe nüfuz edebilir. Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu aracılığıyla önemli miktarda hidroksil radikali ($OH\bullet$) üretebilir (Razavi-Azarkhiavi ve diğerleri, 2014; Rhee ve Fries, 1968). Hidroksil radikal ($OH\bullet$) atakları DNA ile en yaygın etkileşim türüdür ve bu radikaller DNA molekülünün tüm bileşenleri (pürin, pirimidin ve deoksiriboz omurga) ile etkileşime girerek DNA zincir kırıkları, fragmentasyon ve 8-hidroksiguanin gibi DNA eklentileri (adduct) oluştururlar (Benhusein ve diğerleri, 2010; Kryston, Georgiev, Pissis ve Georgakilas, 2011; Tayeb, 2020).

Siklofosfamid (SF), oksazafosforinler sınıfına ait olan bir alkilleyici ajandır ve sitostatik etkisini kovalent DNA eklentileri oluşturarak göstermektedir. Siklofosfamidin sitotoksitesine, DNA'nın guaninin N7 pozisyonundaki alkilasyonu ve DNA-DNA çapraz

bağlarının, DNA-protein çapraz bağlarının ve tek zincir kırıklarının oluşumu aracılık etmektedir (Elangovan, Chiou, Tzeng ve Chu, 2006; Hemminki ve Kallama, 1986; Samarth, Khan, Srivas, Mishra ve Tiwari, 2018). Bu bileşik ayrıca bir antikanser kemoterapötik ajan olarak çocukluk ve yetişkin malignitelerinin yanı sıra diğer iyi huylu hastalıklar için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Abdella, 2012; Lande ve diğerleri, 2017). Örneğin, Hodgkin hastalığı, Hodgkin olmayan lenfoma, birçok lösemi türü, multipl miyelom, retinoblastom, nöroblastomlar, yumurtalık, meme ve endometrium karsinomları ve akciğerin bazı habis neoplazmaları gibi hastalıkların tedavisinde yer almaktadır. Ayrıca skleroderma, romatoid artrit, glomerülonefrit, kronik hepatit, multipl skleroz ve organ transplantasyonu için immünosupresif bir ajan olarak kullanılmaktadır (Anderson, Bishop, Garner, Ostrosky-Wegman ve Selby, 1995; McCarroll ve diğerleri, 2008; Samarth ve diğerleri, 2018). SF, spesifik olarak T-hücreleri ve B-hücreleri üzerinde etki ederek hücre aracılı ve hümorale bağışıklığın baskılanmasına neden olmaktadır (Awad ve Stüve, 2009). SF'nin terapötik ve toksik etkileri için en önemli faktör, hepatik mikrozomal sitokrom P450 fonksiyonel oksidaz sistem tarafından metabolik aktivasyonun gerekliliğidir. SF, karaciğer mikrozomal enzimi sitokrom P450'nin etkisiyle hücre DNA sentezini engelleyen ve nihayetinde hücre ölümüne yol açan 4-hidroksisiklofosamid, akrolein ve aldofosamid mustard gibi aktif alkilleyici metabolitler üretmektedir (Rehman ve diğerleri, 2012). Bu metabolitlerden akrolein ve fosforamid mustard, bu ilacın antikanser potansiyelinden ve ilişkili genotoksik etkilerinden sorumlu tutulmaktadır (Kour, Ali, Ganaie ve Tabassum, 2017). Aslında, antineoplastik etkiler fosforamid mustard (FM) ile ilişkilendirilirken, akroleinin toksik yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Kern ve Kehrer 2002). FM'nin DNA'ya kovalent olarak bağlandığı ve DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlarının yanı sıra DNA çift zincir kırıklarına neden olarak bu sayede hızla bölünen hücreleri öldürdüğü bildirilmiştir (Helleday ve diğerleri, 2008; Lande ve diğerleri, 2017). Akrolein ise süperoksit dismutaz, GSH peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimleri baskılayarak toksik reaktif oksijen türleri (ROT) üreten ve oksidatif strese yol açan reaktif bir aldehittir (Arumugam, Sivakumar, Thanisslass ve Devaraj, 1997; Dumontet ve diğerleri, 2001; Jeelani ve diğerleri, 2017). Siklofosamid toksisitesinin, başta karaciğer ve pankreas olmak üzere birçok organı etkilediği ve glutatyon tükenmesi, lipid peroksidasyonu, değişmiş DNA profili, proinflatuar yanıt ve apoptoz ile karakterize olduğu gösterilmiştir (Hamzeh ve diğerleri, 2018; Khodeer, Mehanna, Abushouk ve Abdel-Daim, 2020). Tüm bunların yanı sıra siklofosamidin *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite düzeyi mikroorganizmalar, bitkiler, böcekler, hayvanlar ve insanlarda kapsamlı olarak araştırılmıştır. Dominant letal

mutasyonları, mikronükleusları ve DNA hasarını indüklediği bilinmektedir. Ayrıca serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu dahil olmak üzere kromozomal anormallikler, kardeş kromatid değişimleri ve gen mutasyonlarını teşvik ederek kanser gibi bir dizi patolojik duruma yol açabildiği rapor edilmiştir (Abdella, 2012; Samarth ve diğerleri, 2018).

Mitomisin-C (MMC) ve Siklofosfamid (SF) kapsamlı olarak araştırılan genotoksik ajanlardır. Her ikisi de Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD Test no 487 ve 473) tarafından genotoksisite çalışmalarında referans pozitif klastojenler olarak önerilmektedir. MMC, metabolik aktivasyon gerektirmeyen klastojenler içerisinde önerilirken, SF metabolik aktivasyon gerektiren klastojenler kısmında sunulmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında metabolik aktivatör (S9 kısım) içermeyen kısımda MMC, metabolik aktivatör (S9 karışım) içeren kısımda ise SF hem pozitif kontrol hem de antigenotoksisite değerlendirmeleri için genotoksik ajanlar olarak seçilmiştir. Kullanılan MMC konsantrasyonu 0,2 µg/mL ve SF konsantrasyonu ise 12 µg/mL'dir. Her iki ajan için seçilen konsantrasyonlar hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde genotoksik etki göstermiştir. Ek olarak, comet testinde DNA hasarını indüklemek amacıyla kullanılan H₂O₂'in seçilen konsantrasyonu (100 µM) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde DNA hasar düzeyini artırmıştır.

Periferik kan lenfositlerindeki kromozomal anormallik sıklığının, ekzojen ve endojen genotoksik maddelere karşı bireyler arası duyarlılığı yansıttığı, genotoksik karsinojenlerin erken etkilerinin güvenilir biyolojik belirteçleri olduğu ve kanserojen risk belirteçleri olarak kullanılabildikleri kanıtlanmıştır (Ahmed ve Hidayat, 2020; Mateuca, Decordier ve Kirsch-Volders, 2012; Vodenkova ve diğerleri, 2015). Kanser, kromozomal değişimlerin aracılık ettiği ve sitogenetik olarak saptanabilme potansiyeline sahip olan çoklu genetik değişikliklerin birikiminden kaynaklandığı bilinmektedir (Hagmar, Strömberg, Tinnerberg ve Mikoczy, 2001; Joseph ve diğerleri, 2009). Bu nedenle, kromozom hasar oluşum mekanizmalarının farklı dokularda benzer olduğu varsayılırsa, lenfositlerdeki hasar düzeyinin kansere yatkın dokulardaki hasar düzeyini yansıtmaması ve kanser riskini göstermesi beklenebilir (Norppa ve diğerleri, 2006; Roussel ve diğerleri, 2019). İlginç olarak, kromozomal anormallik frekansı ya karsinojenlere maruziyet ya da sigara içme, yaş, cinsiyet ve sitogenetik analiz ve kanserin saptanması arasındaki periyot gibi karışıklığa neden olan ana faktörlerden bağımsız olarak da kanser riskini öngörebilmektedir (Burrell ve diğerleri,

2013; Mitelman, Johansson ve Mertens, 2007; Vodenkova ve diğerleri, 2015). Kanser gelişiminin kanser hücrelerinde gözlenen hem sayısal hem de yapısal kromozomal anormalliklerle sonuçlanan genom kararsızlığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Abbas, Keaton ve Dutta, 2013).

Kromozom anormallik (KA) testi, yapısal ve sayısal anormallikleri saptamaya yarayan bir test olup, test edilen bileşiğin klastojenik ve/veya anojenik etki mekanizmaları hakkında bilgi vermektedir (Bonassi ve diğerleri, 2000; Chacón, González ve Poletta, 2021; Minina ve diğerleri, 2018). Yapısal kromozom anormallikleri iyonize radyasyon ve genotoksik kimyasallar (alkilleyi ajanlar, nanopatiküller veya pestisitler vb.) aracılığıyla meydana gelebileceği gibi spontan olarak da (endojen reaktif oksijen türleri, topoizomerazlar, replikasyon hataları gibi diğer mekanizmalar) ortaya çıkabilmektedir (Jain ve diğerleri, 2018a; 69, 92). Yapısal kromozomal anormalliklerin oluşumu doğrudan DNA hasarı (iyonize radyasyon gibi) veya hasarlı DNA kalıbının replikasyonundan kaynaklanmaktadır. Her iki mekanizmada da kritik rol, DNA tamirinin hiç yapılamaması veya eksik yapılmasıdır. Bu bağlamda, DNA tek/çift zincir kırıklarından köken alan kromozomal anormallikler, hücre döngüsü aşaması ve DNA hasarının kökenine göre kromatid tipi ve kromozom tipi olabilmektedir (Bignold, 2009; Hagmar ve diğerleri, 2001; Niazi ve diğerleri, 2019). Kromozom tipi anormallikler, esas olarak G0/G1 fazı sırasında genotoksik hasar aracılığıyla doğrudan DNA hasarının (çift zincir kırıkları) bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. G0/G1 fazı sırasında kazanılan lezyonlar daha sonra bir kromozomun her iki kromatidinin de hasar görmesine neden olarak disentrik kromozom ve halka kromozomlar oluşturabilirler (Albertini ve diğerleri, 2000; Natarajan ve Palitti, 2008; Niazi ve diğerleri, 2019). Son yıllarda, kromozom tipi anormallik frekansına bir diğer önemli katkının telomer fonksiyonunda meydana gelen bozuklukların neden olduğu açıklanmıştır. Telomerler, ökaryotik kromozomların uç kısımlarında yer alan TTAGGG tandem tekrarlarından oluşan nükleoprotein yapılarıdır. Telomer kompleksi 'hücresel mitotik saati' düzenlemekte ve kromozomları ekzonükleolitik bozulmaya, DNA hasarına ve kromozomal kararsızlığa karşı korumaktadır (Blackburn, 2001; Maciejowski ve De Lange, 2017; Vodicka ve diğerleri, 2018). Periferik kan lenfositleri ile yapılan araştırmalarda kısalan telomerlerin kromozomal anormallik (özellikle kromozomal tip anormalliklerde) sıklığında gözlenen artışla ilişkili olduğu saptanmıştır (Hemminki ve diğerleri, 2014; Li ve diğerleri, 2013). Telomer kısalmasının genomik ve kromozomal kararsızlıkları indükleyerek kanser gelişimine neden olduğu düşünülmektedir (Jang ve diğerleri, 2008; Shay, 2016, Vodicka ve

diğerleri, 2018). Telomerler, her replikasyon döndüsünde daha da kısalırlar. Bu yüzden, telomer uçları kritik düzeye ulaşan ve düşük telomeraz aktivitesine sahip somatik hücrelerde telomerler kısaltmaya devam eder, aşınır ve zayıf uçlu bir hale gelir. Bu aşınmış uçlar, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görev yapan homolog olmayan uç birleştirme onarımı ile tanınabilir ve homolog olmayan kromozomlara eklenebilir. Sonuçta birleşmiş, halka veya fragment kromozomlar meydana gelebilmektedir (Jones, Pepper ve Baird, 2012; Gostissa, Alt ve Chiarle, 2011; Niazi ve diğerleri, 2019). Kromatid tipi anormallikler, geç S/G2 fazı sırasında klastojenlerin verdiği hasarın veya hasarlı DNA replikasyonunun bir sonucudur. Bu anormallik tipi, kromozomun yalnızca bir kromatidini içermekle birlikte kromatid kırıkları ve kromatid değişimleri bilinen örnekleridir (Durante ve diğerleri, 2013).

Disentrik kromozom, homolog veya homolog olmayan iki farklı kromozom üzerinde oluşan iki kırık nedeniyle kromozom kollarının füzyonu ile sonuçlanan iki sentromer içeren anormal kromozomdur (Satoh, Hatanaka, Yamamoto, Kuro-o ve Sofuni, 2002; Yılmaz, Ünal, Aksoy, Yüzbaşıoğlu ve Çelik, 2008). Halka kromozom, aynı kromozomun kollarında oluşan iki farklı kırık sonucu sentromere bağlı şekilde sentrik veya asentrik olarak ortaya çıkmaktadır (Ballarini ve Carante, 2016; Ghoshal ve diğerleri, 2017). Bir diğer anormallik tipi olan kardeş kromatidlerde birleşme ise genellikle kromozom uçlarında oluşan terminal delesyonlar sonucunda meydana gelen kromozom kolları arasındaki karşılıklı birleşmenin bir sonucudur (Murli, 2003; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006). Mitotik hücre döngüsünün G1 fazında bir kromatidde oluşan kırık S fazında da sürdürülür ise replikasyondan sonra her iki kromatidde de kırık ortaya çıkarak kromozom kırıkları meydana gelmektedir. Bu kırıkların tekrar bir araya gelmemesi sonucu delesyonlu bir kromozom ve asentrik fragmentler oluşabilmektedir. Diğer yandan fragmentler, bir sentromere sahip olan iki kromozomun karşılıklı translokasyonu sonucu da üretilebilmektedir. İnterkromozom (kromozomlar arası) değişimler olan ve quadriradial veya triradial kromozomlar şeklinde görülen kromatid değişimine, özellikle DNA'da çapraz bağlara neden olan ajanların sebep oldukları bildirilmiştir (Satoh ve diğerleri, 2002; Yılmaz ve diğerleri, 2008).

Mevcut araştırmada metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda tek başına Amygdalin ve Amygdalin+MMC insan lenfositleriyle uygulanması sonucu genel olarak kromatid kırığı, fragment, kromozom kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve halka kromozom olmak üzere farklı oranlarda yapısal anormallik tipleri izlenmiştir. Ayrıca yalnızca Amygdalin+MMC uygulamalarında çok miktarda kromatid değişimlerine

rastlanmıştır. Metabolik aktivator varlığında gerçekleştirilen çalışmada ise tek başına Amygdalin ve Amygdalin+SF muamelesi ile kromatid kırığı, fragment, kromatid değişimi, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom görülmüştür.

Sayısal kromozom anormalliklerini (anöploidi/poliploidi) indükleyen ajanlara anöjenler denilmektedir. Böyle ajanların hücre döngüsü boyunca görev alan temel DNA içeren yapıları (sentromer ve telomerler), iç aparatlarını (tübülün, MAP ve sentriol) ve hücre döngüsü kontrol moleküllerini hedeflediği belirlenmiştir (Itoh, Hattori, Nagata ve Sanbuissho, 2012). Bu çalışmada Amygdalin'in tek başına uygulandığı tüm kültürlerde az sayıda, sayısal bir anormallik olan poliploidiye de rastlanılmıştır. Poliploidi, kromozom sayısının haploid kromozom sayısının tam katı kadar artması olarak tanımlanmaktadır. Mitotik iç ipliklerinin fonksiyon kaybı sonucunda kutuplara kromatid göçünün başarısızlığı poliploidiyi indükleyebilmektedir. Bir diğer mekanizma, iki çekirdekli hücrelerde sitokinez veya nükleer füzyonun başarısızlığıdır (Kirsch-Volders, Vanhauwaert, De Boeck ve Decordier, 2002). Ayrıca, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunun yanı sıra kardeş kromatidlerin ayrılmasında görev yapan topoizomera II enziminin aktivitesinin inhibisyonu sonucunda da poliploidi oluşmaktadır. Mitoz bölünme sırasında topoizomera II'nin işlevi engellendiğinde hücrelerin metafaz evresinde kalarak kromatidlerin karşılıklı kutuplara çekilmediği ve hücrede kromozom artışı ile sonuçlandığı görülmüştür (Doğan ve diğerleri, 2013).

Amygdalin'in metabolik aktivator yokluğunda ve varlığında test edilen tüm konsantrasyonlarda genotoksik etkili olmadığı görülmüştür. Ayrıca antigenotoksisite uygulamalarında MMC ve SF'nin neden olduğu kromozomal hasarları tüm uygulamalarda genel olarak azalttığı belirlenmiştir. Bu nedenle, Amygdalin'in antigenotoksik potansiyeli üzerinde konsantrasyon ve sürenin etkili olduğu söylenebilir. Kromozomal anormallik testi gibi karsinogeneze doğrudan bağlantısı olduğu belirlenen bir testten böyle sonuçların elde edilmiş olması, Amygdalin'in *in vitro* koşullarda genetik bir risk taşımadığını, aksine MMC ve SF gibi klastojenik ajanlara karşı antiklastojenik etki sergilediğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılan diğer yöntem kardeş kromatid değişim testidir. KKD testi, genotoksik ajanlara maruz kalan bireylerin insan lenfositlerinde DNA hasarının ölçülmesi ve/veya takiben gerçekleşen DNA tamirinin bir biyobelirteci olarak kullanılmaktadır. Bu bakımdan, insan lenfositlerinin kullanıldığı *in vitro* araştırmalarda yaygın olarak tercih edilen bir test metodudur. Mitomisin C gibi DNA'da çapraz bağlara neden olan sitostatik

alkilleyiciler ve topoizomeraz II enzim zehirleri gibi inhibitörler KKD'nin potansiyel indükleyicileridir (Akyıl, Konuk, Eren, Liman ve Sağlam 2017; Mourelatos, 2016). KKD'nin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak DNA'daki hataların ve yanlış DNA onarımlarının KKD'ye neden olduğuna inanılmaktadır (Salawu ve diğerleri, 2018).

Kardeş kromatid değişimleri, hücre döngüsünün S fazında, genel kromozomal morfolojiyi değiştirmeyen DNA kırılması ve homolog rekombinasyon yoluyla tamir edilen DNA çift zincir kırıklarının olası bir sonucudur. Replikasyon sırasında ortaya çıkan tıkanıklığı onarmak için homolog rekombinasyon gereklidir. Ek olarak, DNA-tek zincir kırıklarının sayısını artıran şartların ve ilaçların da KKD'lerin sayısını önemli derece artırdığı görülmektedir. Muhtemelen baz eksizyon tamir yolağına aşırı yük binmesi sonucu kalan tamir edilmeyen tek zincir kırıkları replikasyon sırasında çift zincir kırıklarına dönüşerek homolog rekombinasyon ile tamir işlemine yol açmaktadır. Bu yüzden, KKD'lerin hücrelerdeki genom kararsızlığı için hassas göstergeler olduğuna inanılmaktadır (Stults ve diğerleri, 2014: 439, 440; Tumini ve Aguilera, 2021: 383; Wilson III ve Thompson, 2007). Homolog rekombinasyon (HR) kromozomal çift zincir kırıklar, sarmallar arasında meydana gelen çapraz bağlar ve çökmüş replikasyon çatalı dahil olmak üzere birçok DNA hasarının genomik onarımı için önemli bir yoldur. HR genellikle 'hatasız' onarım olarak düşünülmektedir, çünkü çift zincir kırıklarını tamir etmek için kardeş kromatidden elde edilen özdeş sekansı kullanır ve bu sayede DNA sekans bilgilerinin korunmasını sağlar. Homolog rekombinasyon süreçlerinde yer alan bileşenlerde oluşan kusurlar uzun bir süredir kanser ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin, homolog rekombinasyon işleminde görev alan tümör baskılayıcı BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde meydana gelen bozukluklar kansere yatkınlığa yol açmaktadır (Helleday, 2010; Rothkamm, Krüger, Thompson ve Löbrich, 2003; Stults ve diğerleri, 2014: 439, 440).

Metabolik aktivatör yokluğunda gerçekleştirilen deneylerde, Amygdalin tek başına tüm uygulama süreleri (24 ve 48 saat) ve tüm konsantrasyonlar için KKD frekansını anlamlı düzeyde artırmamıştır. Ek olarak, Amygdalin, MMC tarafından oluşturulan KKD frekansını tüm Amygdalin+MMC uygulamaları ve test edilen tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltmıştır. Metabolik aktivatörün kullanıldığı uygulamalarda ise Amygdalin tek başına KKD frekansını kontrole göre önemli oranda artırmazken, Amygdalin+SF'nin eş zamanlı muamelesinde ise pozitif kontrole kıyasla en düşük

konsantrasyon (0,86 $\mu\text{g/mL}$) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda KKD frekansını önemli ölçüde azaltmıştır. Birçok araştırma, KKD oluşumunun hücre döngüsün S fazına spesifik olması, kromatid aberasyonlarının ise S ve G2 fazında ortaya çıkmaları dolayısıyla KKD ve KA testlerinin birbirlerini tamamlama özelliğinde olduğunu bildirmektedir (Bozkurt ve diğerleri, 2004; Hagmar ve diğerleri, 2004). Bu açıdan bakıldığında, Amygdalin'in KA ve KKD testleri kullanılarak değerlendirilmesi ile ulaşılan sonuçlar büyük ölçüde ortak olup veriler birbiri ile örtüşmektedir.

Tez çalışmasında kromozomal anormallik testi için hazırlanan preperatlardan mitotik indeks (Mİ), KKD testi için hazırlanan preparatlardan ise replikasyon indeksi (Rİ) analizleri gerçekleştirilmiştir. Mİ, hücre kinetiklerinde değişikliklere neden olan ajanların etkilerinin göstergelerinden biridir. Tekrarlanabilirliği, özgüllüğü ve duyarlılığı nedeniyle sitotoksikite ve sitostatik yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçdir (Chacón ve diğerleri, 2021; Mark ve diğerleri, 1994). Mitotik indeks hücre proliferasyon oranının güvenilir bir göstergesidir. Genel bir kural olarak, mitotik indeks yüksek olduğunda proliferasyon hızlıdır ve düşük olduğunda ise hücrelerin çoğalma oranı da düşüktür (Zeweil, Rizk, Bekhet ve Ahmed, 2015). Bu bağlamda, mitotik indeksteki azalma sitotoksik etkileri işaret ederken kromozomal ve nükleer anormalliklerin indüklenmesi kimyasal ajanların teşvik ettiği genotoksik etkileri göstermektedir (Afzal ve diğerleri, 2020; Hemachandra ve Pathiratne, 2016). Bu tez çalışmasında kullanılan genotoksik ajanların her ikisinde (MMC ve SF) kullanılan konsantrasyonlarda (sırasıyla 0,20 ve 12 $\mu\text{g/mL}$) mitotik indeksi anlamlı oranda azaltarak antimitotik ve sitotoksik etki göstermişlerdir. Mitotik indeksteki azalmanın nedenleri hücre membranlarında ATPaz inhibisyonuna bağlı olarak mitokondriyal fonksiyona müdahale sonucu azalan ATP düzeyi ve enerji üretim merkezinin işleyişi nedeniyle ortaya çıkan baskı olabilir (Azab ve diğerleri, 2017; Epel, 1963; Jain ve Sorbhoy, 1988; Rencüzoğulları, Parlak ve İla, 2008). Ayrıca hücre ölümü veya hücre döngüsünün interfazda durması da Mİ'deki azalmanın sebebi olarak yorumlanabilmektedir. Birçok kimyasalın kromozomal hasar nedeniyle hücre döngüsünü tercihen G2 fazında bloke ederek mitozaya ilerlemeyi engellediği öne sürülmüştür. Bu nedenle, Mİ'daki değişiklik, ya DNA ile doğrudan etkileşim ya da hücre döngüsü düzenleme faktörlerinin modifikasyonu yoluyla hücre bölünmesine müdahale edilmesi ile gerçekleşebilir (Chacón ve diğerleri, 2021; A. P. Rao ve P. N. Rao, 1976; Rojas ve diğerleri, 1993). Yapılan araştırmalarda MMC'ye maruz bırakılan insan periferik kan lenfositlerinde hücre döngüsünün S fazında hücrelerin birikme göstererek sitostatik etki sergilediği saptanmıştır (Herrera, Tittelbach, Gebhart ve Ostrosky-Wegman,

1991; Rojas ve diğerkleri, 1992). Dahası hem MMC'nin hem de SF'in genellikle apoptotik yolakları aktive ederek hücre ölümüne neden oldukları bilinmektedir (Hamzeh ve diğerkleri, 2018; Mirshahi ve diğerkleri, 2018; Verweij ve Pinedo, 1990).

Amygdalin S9 karışımı yokluğunda ve varlığında tüm uygulama sürelerinde Mİ değerlerini anlamlı oranda değıştirmemiştir. Bunula birlikte S9 karışım yokluğunda gerçekleştirilen değerkendirmelerde, Amygdalin'in MMC ile birlikte uygulandığı tüm kültürlerde (ön, eş ve geç zamanlı muamele) ve her iki muamele süresinde de (24 ve 48 saat), Amygdalin test edilen tüm konsantrasyonlarda MMC'nin önemli ölçüde azalttığı Mİ değerlerini, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmayı başarmıştır. S9 karışım varlığında gerçekleştirilen inceleme sonucunda eş zamanlı Amygdalin+SF muamelesi neticesinde Amygdalin SF'nin önemli oranda düşürdüğü mitotik indeks oranını tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır. Buna göre, Amygdalin'in sitotoksik etkileri oldukça güçlü olan MMC ve SF gibi alkileyici ajanların normal hücrelerde neden olduğu toksik cevapların önüne geçerek sito-protetif bir aktivite sergilediğı düşünölmektedir.

Bir sitotoksiste göstergesi olan replikasyon indeksi (Rİ), hücre bölünmesi döngülerinin oranından oluşan hücre proliferasyonunun bir ölçüsüdür. Mitotik bir hücrenin ardışık olarak tamamlamış olduğı bir, iki, üç ve daha fazla hücre döngüsü frekanslarından elde edilen ortalama replikasyon oranını ifade etmektedir. Rİ, kimyasalların hücre döngüsünün S ve G2 aşamaları üzerindeki etkili olduklarını yansıtmaktadır (Lazutka ve Margolin, 1991; Rencüzoğulları ve diğerkleri, 2008). Elde edilen sonuçlara göre Amygdalin tek başına muamelesinde Rİ önemli bir değışim sergilememiştir. Ancak, Amygdalin+MMC uygulamalarında, Rİ 24 saatlik muamele süresinde önemli bir değışim göstermezken, 48 saatlik uygulamada tüm muamele şekillerinde pozitif kontrole göre arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir. İlginç olarak uygulamaların tamamında üçüncü mitoz evresindeki (M3) hücrelerin sayısının özellikle 48 saatlik uygulamada daha belirgin olmak üzere pozitif kontrole göre oldukça azalmıştır. Diğerk yandan, Amygdalin+SF muamelelerinin replikasyon indeksinde kontrol ve pozitif kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan önemli bir değışime neden olmadıkları saptanmıştır.

Amygdalinin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerkendirilmesinde kullanılan diğerk yöntemler mikronökleus (MN) ve comet testleridir. Bu tez çalışmasında her iki test metabolik aktivatör S9 karışım yokluğunda gerçekleştirilmiştir.

Mikronükleus testi, çeşitli kimyasalların veya diğer ajanların popülasyon biyoizleme ve radyasyon biyodozimetrisi alanlarında DNA hasarını indüklemeye kabiliyetini değerlendirmek için dünya çapında kullanılmaktadır. Bu test aynı zamanda insan kullanımına yönelik kimyasalların, farmasötiklerin ve kozmetiklerin gelişimini test etmek için genetik toksikolojide de bir temel haline gelmiştir (Bonassi ve diğerleri, 2007; Fenech, 2010; Fenech ve diğerleri, 2013; Rodrigues ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte, test bileşiğinin klastojenik ve/veya anöjenik etki mekanizmasına ilişkin olarak bilgi verebilen hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kabul görmektedir (Aristizabal-Pachon ve Castillo, 2020; Fenech, 2007; Hemachandra ve Pathiratne, 2016; Rodrigues ve diğerleri, 2021).

Mikronükleus analizi, genotoksik bir ajana maruziyeti takiben *in vitro* ve *in vivo* DNA hasarını belirlemenin yanı sıra DNA tamir yeteneğinin ve kromozomal kararsızlığın bir biyobelirteci olarak da kabul görmektedir (Dhillon ve diğerleri, 2011). MN'ler, mitoz bölünme esnasında nükleer bölünmeyi takiben ana çekirdeğe dahil edilemeyen asentrik fragmentler veya tam kromozomları içermektedir (Fenech, 2007; Rodrigues ve diğerleri, 2021; Zhao, Cai, Lu, Tian ve Liu, 2021). Mikronükleus oluşumunun temel nedeni kromozom fragmentleri veya tüm kromozomlarda fonksiyonel sentromer kaybının yanı sıra tamir edilmemiş veya yanlış tamir edilmiş DNA hasarları, mitotik sistemin (iğ ipliği, kinetokor) ya da bu sistemde yer alan proteinlerde oluşan işlev kayıpları olabilmektedir (Fenech ve diğerleri, 2020). Ayrıca, klastojenik ve anöjenik ajanlara maruziyet veya oksidatif stres nedeniyle hücre döngüsü kontrol noktaları ve DNA tamirinden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan genetik aberasyonlar (kromozomlarda yeniden düzenlenmeler, değişmiş gen ekspresyonları veya anöploidi gibi) MN oluşumunu teşvik edebilmektedir (Fenech, 2000). Bu tarz anormallikler pek çok kanser çeşidinde gözlenen kromozomal kararsızlıkla ilişkilendirilmektedir. Bu bakımdan yapılan pek çok araştırmada yüksek orandaki MN frekansı ile kanser insidansı arasında doğrusal bir korelasyon olduğu anlaşılmıştır (Bolognesi ve diğerleri, 2015; Bonassi, El-Zein, Bolognesi ve Fenech, 2011; Palmitelli ve diğerleri, 2019; Zhao ve diğerleri, 2021).

Bu araştırmada, tek başına Amygdalin muamelesi sonucunda mikronükleuslu hücrelerin frekansında anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, Amygdalin ve MMC'nin birlikte uygulandığı kültürlerde, ön muamele ve eş zamanlı muamelelerde en düşük konsantrasyon (0,86 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda, geç zamanlı uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda Amygdalin, MMC'nin önemli oranda artırdığı mikronükleus

frekansını anlamlı oranda azaltmıştır. Mikronükleus testinde gözlenen bu sonuçlar, tez çalışmasında gerçekleştirilen diğer genotoksisite testlerinden elde edilen KA, KKD ve Mİ sonuçları ile son derece uyumlu olup Amgdalin'in genotoksik bir etkisinin olmadığı, ancak özellikle MMC'ye karşı belirgin bir antigenotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Sitotoksik etkileri tespit etmek amacıyla kullanılan parametlerden birisi de Nükleer bölünme indeksi (NBİ)'dir. Bu çalışmada, mikronükleus testi için hazırlanan preparatlardan NBİ analizi de yapılmıştır. Buna göre, Amygdalin'in hem tek başına hem de MMC ile birlikte uygulanması sonucunda tüm uygulama süreleri ve tüm konsantrasyonlarda NBİ'inde önemli değişimler olmadığı belirlenmiştir. Mİ ve Rİ'de olduğu gibi NBİ'de hücrenin çoğalması, hücre döngüsü kinetiği ve sitotoksisite göstergesi olarak kullanılmaktadır. Proliferasyon düzeyini ölçen diğer parametrelerle benzer şekilde NBİ'de kimyasalların *in vitro* şartlarda hücre bölünmesi üzerindeki etkileri hususunda bilgi sağlamakta ve hücre döngüsünün ilerleme kapasitesi ve hücre çoğalma potansiyelinin anlaşılmasında etkili olmaktadır (Gündoğan ve diğerleri, 2018; Şekeroğlu, Aksoy ve Atlı Şekeroğlu, 2017).

Comet testi, hücresel düzeyde DNA hasarını ve tamirini saptayabilen, genomik kararlılıkta izlenen değişimleri ölçebilen en güvenilir biyobelirteçlerden biridir. Bu test hasas, hızlı, basit ve daha az numune gerektirmesinin yanında farklı tipte doku ve hücrelere uygulanabilmesi ve DNA fragmentasyonunu görsel olarak belirleyebilmesi dolayısıyla oldukça avantajlıdır. Bu nedenle fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, ekotoksikoloji alanında, radyasyon biyolojisi ve kanser araştırmalarında tercih edilmektedir (Collins ve diğerleri, 2014; Koppen ve diğerleri, 2018; Qian ve diğerleri, 2021; Tice ve diğerleri, 2000; Wasson, McKelvey-Martin ve Downes, 2008). Ayrıca, oksidatif stres ve buna bağlı olarak oluşan DNA oksidasyonunun ölçülebildiği araştırmaların yanında antioksidanlar veya antioksidan bakımından zengin gıdalarla müdahaleyi içeren beslenme ve yaşam tarzı çalışmaları da gerçekleştirilmektedir (Azqueta ve diğerleri, 2020). Özellikle, mesleki veya çevresel mutajenlere maruz kalmanın etkisini incelemek, yaşam tarzı, diyet ve diyet takviyesinin genetik stabilite üzerindeki etkisini ölçmek ve kontrol etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA hasarının varlığı veya yetersiz onarımı, kanser ve diğer bulaşıcı olmayan hastalıkların etiyolojisinde iyi bilinen bir faktördür. Bu nedenle comet testinin teoride gelecekteki hastalık riskini gösteren erken genetik hasarları tespit etmek için kullanılabileceği ön görülmektedir (Collins ve diğerleri, 2014; Milić ve diğerleri, 2021).

Bu çalışmada kullanılan alkali comet testi, nötral comet testinden farklı olarak DNA tek ve çift zincir kırıkları, alkali labil bölgeler, DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağları, eksik eksizyon tamir bölgeleri ile ilişkili DNA tek zincir kırıkları gibi daha küçük miktarlardaki DNA hasarlarına karşı oldukça duyarlıdır (Cordelli ve diğerleri, 2021; Lu ve diğerleri, 2017; Tice ve diğerleri, 2000). DNA hasarının ölçümünde en çok kullanılan parametreler kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentidir. Kuyruk yoğunluğu, comet kuyruğundaki % DNA'yı içermekte olup DNA hasarı arttığında yükselerek kırık frekansını doğrudan ortaya koymaktadır. Deneysel koşulların değişiminden etkilenmeyen ve DNA hasarını mümkün olan en kapsamlı aralıkta saptayabilen bu parametre, laboratuvarlar arasında önemli düzeyde farklılık göstermemesi açısından son derece hasas ve kullanışlıdır. Kuyruk momenti ise kuyruktaki % DNA ve kuyruk uzunluğunu entegre ederek kuyruktaki DNA miktarı ve ortalama göç aralığını göstermektedir. Belirlenebilen en küçük DNA parçası ile kırık sayısının ölçülebildiği bir parametre olan kuyruk momentin yükselmesi DNA hasarının arttığı anlamına gelmektedir (Azqueta ve diğerleri, 2020; Ghebretinsae, Faes, Molenberghs, De Boeck ve Geys, 2013; Musa, Ponnuraj, Mohamad ve Ab Rahman, 2012; Singh, 2016; Tice, 2000). Bu bakımdan, kuyruk momentini de DNA hasar indeksi olarak kullanmak, hem hasarlı DNA miktarını hem de genetik materyalin göç mesafesini tek bir sayı ile temsil etmesi açısından büyük bir avantajdır (Hellman, Vaghef ve Boström, 1995).

Amygdalin'in tek başına izole lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini önemli ölçüde artırmadığı belirlenmiştir. Amygdalin+H₂O₂ uygulamasında ise Amygdalin H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarını tüm muamele tiplerinde (ön-, eş ve geç zamanlı muamele) ve tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı oranda azaltmıştır. Bu bakımdan Amygdalin'in tek başına DNA hasarına sebep olmadığı, aksine H₂O₂'nin sebep olduğu oksidatif DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir.

Yapılan literatür taramasında Amygdalin ve metabolitlerinin insan lenfosit kültüründe potansiyel genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri ile inceleyen herhangi bir araştırmaya ulaşamamıştır. Ayrıca, Amygdalin'in ait olduğu fitotoksin grubu siyanojenik glikozitler ile ilgili olarak da herhangi bir genotoksisite veya antigenotoksisite çalışmasına rastlanılmamıştır. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi) ve CONTAM Paneli (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) siyanojenik glikozitlerin genotoksisitesine dair hiçbir bilgi

bulunmadığı sonucuna ulaşarak herhangi bir araştırma açıklamamışlardır (FAO/WHO, 2012; CONTAM, 2019). Buna rağmen literatürde Amygdalin'in farklı genotoksisite ve mutajenisite testleri ve model organizmalar kullanılarak değerlendirildiği araştırmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde Amygdalinin mutajenik/antimutajenik ve rekombinojenik etkileri *Saccharomyces cerevisiae* test sisteminde (diploid D7ts1 suşları) değerlendirilmiştir. Amygdalin'in anti-mutajenik etkisi, sitotoksik ve mutajenik etkisi bulunmayan farklı konsantrasyonları (25, 50 ve 100 µg/mL) kullanılarak alkilleyici bir ajan olan metil metansülfonata (MMS, 16 mM) karşı ön muamele protokolü kullanılarak test edilmiştir. Sonuçta, tüm konsantrasyonlarda Amygdalin'in MMS tarafından indüklenen ters mutasyon frekansını azalttığı ve anti-mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu açıdan, Amygdalin'in hem hatalı hem de hatasız rekombinasyon olaylarını aktive ederek alkilleyici ajanların neden olduğu mutasyonları önleyebildiği öne sürülmüştür. Aynı çalışmada, maya temelli *in vivo* bir test (Ty1 test, *S. cerevisiae* 551 suşları) kullanılarak Amygdalin'in kanserojenik heksavalent kroma (CrVI, 5mM) karşı ön-muamelesinde, CrVI tarafından indüklenen transpozisyon oranını üç kat (25 ve 50 µg/mL) ve dört kat (100 µg/mL) düşürerek anti-karsinojenik aktivite sergilediği bulunmuştur. Sonuç olarak, Amygdalin'in CrVI gibi güçlü bir oksidatif stres indükleyicisinin teşvik ettiği retrotranspozisyon olaylarını azaltabildiği öne sürülmüştür. Ayrıca Amygdalin'in tümörigenezin başlangıç aşamaları ile ilişkili olan mitotik gen konversiyonunun indüklenmesi, ters mutasyonlar, mitotik kros-over ve Ty1 retrotranspozisyon gibi değişimlere neden olmadığı ifade edilmiştir (Todorova ve diğerleri, 2017).

Amygdalin'in (Vitamin B-17), Ehrlich asit karsinomu tarafından karaciğer ve renal toksisite üzerine iyileştirici etkileri iki farklı çalışmada değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda, yalnızca Vitamin B-17 uygulanan grubun yanı sıra, vitamin B17 uygulandıktan 2 hafta sonra Ehrlich asit karsinom hücrelerinin intraperitoneal olarak transfer edildiği (ön muamele) bir grup ve aynı gün karsinom hücreleri ile vitamin B17'nin 2 hafta süre ile uygulandığı (eş zamanlı muamele) başka bir grup bulunmaktadır. Tüm bu deneylerde, Amgdalin'in 100 mg/kg'lik konsantrasyonda ve intramusküler olarak uygulanmıştır. Daha sonra karaciğer ve böbrekler DNA hasarı açısından comet testi kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, Vitamin B17'nin tek başına DNA hasarını önemli oranda etkilememiştir. Bununla birlikte, ön ve eş zamanlı uygulamalarda Vitamin B17, Ehrlich asit karsinomun artırdığı DNA hasarını önemli düzeyde azaltmıştır. Buna göre, Ehrlich asit karsinom tarafından indüklenen karaciğer ve

böbrek hasarına karşı vitamin B17'nin güçlü bir koruyucu olduğu belirtilmiştir (Mutar ve diğerleri, 2020; Tousson ve diğerleri, 2020).

Başka bir çalışmada ise El-Masry ve diğerleri (2020) vitamin B17'nin farelerde geliştirilen Ehrlich solid tümör üzerine etkilerini comet testi ile araştırmışlardır. Hayvan gruplarından birine yalnızca vitamin B17 (175 mg/kg) oral olarak 2 hafta süreyle uygulanmıştır. Diğer bir grupta ise subkutan olarak Ehrlich asit karsinom hücreleri transferi yapılarak solid tümör geliştirilmiş, takiben fareler 2 hafta süre ile vitamin B17'ye (175 mg/kg, oral olarak) maruz bırakılmıştır. Vitamin B 17'nin tek başına uygulanması sonucunda anlamlı ölçüde DNA hasarı oluşmadığı, ancak tümörlü dokularda artmış DNA hasarının vitamin B17 tarafından önemli düzeyde azaltıldığı saptanmıştır. Bu nedenle, Amygdalin'in (vitamin B17) Ehrlich solid tümör tedavisi üzerinde yararlı etkiler gösterebileceği savunulmuştur.

Di Mauro ve diğerleri (2017) yaptıkları farklı bir çalışmada Amygdalin'in DNA hasarı üzerine etkilerini comet testi ile incelemişlerdir. Kirlilik oranı oldukça yüksek olan Augusta limanından (Syracuse, İtalya) toplanan *C. julis*'den alınan kan örneklerini kullanan araştırmacılar, Amygdalin'in iki farklı konsantrasyonu (100 µM, 200 µM) ile muamele işlemini gerçekleştirmişlerdir. Augusta limanından *C. julis*'den elde edilen ve hiçbir uygulama yapılmayan kan örneklerinde yüksek düzeyde DNA hasarı belirlenmiştir. Amygdalin'in bu hasarı büyük ölçüde azaltarak, DNA onarım kapasitesini uyarmak suretiyle DNA'yı koruduğu açıklanmıştır.

Amygdalin'in anöploidi üzerine olası etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, bir grup tavşan ticari diyet ve kayısı çekirdeği (P3: 60 mg/kg; P4: 300 mg/kg) karışımıyla 1 ay s beslenirken, diğer hayvan gruplarına izole Amygdalin intramusküler olarak (P1: 0,6 mg/kg; P2: 3 mg/kg) uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, tavşan kan hücrelerinde Amygdalin'in anlamlı düzeyde anöploidi oluşturmadığı ve ekstra anöploid hücrelerin oluşmasına işaret eden olumsuz etkilerin ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Curlej ve diğerleri, 2016).

Amygdalin veya Amygdalin içeriği oldukça fazla olduğu düşünülen kayısı ve şeftali çekirdeği özütlerinin kullanıldığı farklı genotoksisite ve antigenotoksisite araştırmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde kayısı tohumu (*Armeniaca semen-Prunus armeniaca* L.), şeftali tohumu *Persicae semen* (*P. persica* Bat.), kiraz (*P. avium* L.), erik (*P. salicina* Lindle) ve badem (*P. dulcis* Mill) tohumlarından elde edilen hekzan özütlerinin

farklı mutajenlere karşı anti-mutajenik etkileri Ames/Salmonella/mikrosom testi ile değerlendirilmiştir. Kayısı ve şeftali tohumlarından elde edilen hekzan özütlerinin benzo[a]piren (B[a]P) mutajenitesini önleyebildiği bulunmuştur. Ancak kiraz, erik ve badem tohumları aynı etkiyi sergilememiştir. Ek olarak, bu özütlerin (kayısı ve şeftali) 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b] indol (Trp-P-1) ve 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) akrilamid (AF-2) kimyasallarının neden olduğu mutajenik etkileri engelleyebildiği belirlenmiştir (Yamamoto ve diğerleri, 1992)

Salah ve diğerleri (2019), şeftali çekirdeği (*Prunus persica* L.) metanol özütlerinin siklofosfamidin (SF) neden olduğu genotoksik etkiler üzerindeki aktivitesini incelemişlerdir. Özütlerin SF'ye karşı etkinliğini saptamak amacıyla mikronükleus ve kromozomal anormallik testleri gerçekleştirilmiştir. Özütler hayvan gruplarına tek başına (500 mg/kg) ve SF (75 mg/kg, intraperitoneal) muamelesinden sonra iki farklı konsantrasyonda (500 ve 250 mg/kg) 5 gün süre ile oral olarak uygulanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, SF'nin kemik iliği hücrelerinde tek başına mikronükleus ve kromozomal anormallik frekanslarını anlamlı oranda artırarak genotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Şeftali özütünün ise tek başına, hiç uygulama yapılmamış gruba göre yüksek oranda kromozomal anormallik ve toksisik etki sergilediği bulunmuştur. Buna rağmen, şeftali özütlerinin ise SF tarafından indüklenen genetik hasarı büyük ölçüde azaltarak, koruyucu bir etki gösterdiği açıklanmıştır.

Jin ve diğerleri (2009) acı kayısı çekirdeği (semen *Armeniacae amarum*, SAA) tohumu Çin tıbbında balgam söktürücü ve anti-astmatik aktivitelerinden dolayı uzun süredir akut alt solunum yolu enfeksiyonu ve astımı kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. SAA sulu özütlerin (3,906; 7,812; 15,625; 31,25; 62,5; 125 ve 1000 mg/mL) mutajenitesinin standart ve iki farklı modifiye Ames testi kullanılarak incelendiği bir çalışmada *S. typhimurium* TA100 ve TA98 suşları kullanılmıştır. Standart Ames testi, SAA'nın mutajenitesi için pozitif bir sonuç vermiştir. Petri birleştirme testinin kullanıldığı ilk modifikasyon standart Ames testi ile aynı şekilde gerçekleştirilmiş olup farklı konsantrasyonlarda SAA'ya karşılık gelen farklı miktarlarda histidin içeren yeni negatif kontrol sistemleri ile birlikte test gerçekleştirilmiştir. İkinci modifikasyonda ise histidin sınırlı ortam yerine histidin açısından zengin olan standart Ames testine benzer bir sıvı süspansiyon testini kullanmıştır. Bu değişikliğin amacının SAA daki histidinin etkilerini his⁺ revertantlarının son sayımına etkisini önlemek olduğu belirtilmiştir. Standart Ames testi sonuçları SAA'nın mutajenik etkisi ile ilgili olarak pozitif sonuçlar ortaya koymuştur. Ancak modifiye edilmiş petri

birleştirme ve modifiye edilmiş süspansiyon Ames testlerinde SAA mutajenitesine ilişkin olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir. Standart Ames testinin SSA'nın mutajenitesini değerlendirmek için uygun olmadığı açıklanmıştır. Elde edilen pozitif sonucun SAA içeriğinde bulunan histidin içeriğinden kaynaklanmış olabileceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte modifiye edilmiş iki Ames testi sonuçları SAA'daki histinin etkili olabileceğini desteklemiştir. Bu iki modifiye edilmiş Ames testinde yanlış pozitif sonuç dışlanmıştır. Bu çalışma ile SAA'nın *in vitro* test sisteminde mutajenik etkili olmadığı belirlenmiştir. Ancak bu sonucun daha fazla deneysel veri ile desteklenmesi gerektiği yorumu yapılmıştır.

Tüm bu çalışmalar çoğunlukla Amygdalin'in genotoksik olmadığını ve hatta antigenotoksik potansiyel sergilediğini göstermekte, tez çalışmasının sonuçlarıyla örtüşmektedir. Bu çalışmaların yanında son yıllarda Amygdalin kullanılarak gerçekleştirilen çok sayıda sitoaktivite ve anti-kanser etkinliği çalışması bu bileşiğin etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Amygdalin'in kansere karşı kemopreventif etkileri, esas olarak sitoaktivite üzerine etkileri, hücre döngüsü üzerine etkileri ve apoptozu indüklemeye etkileri ele alınarak araştırılmıştır.

Amygdalin'in sitotoksik aktivitesinin değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Zhou ve diğerleri (2012) Amygdalin'in HepG2 hücrelerindeki sitoaktivitesini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarıdaki Amygdalin solüsyonlarını (1,75; 3,50; 7 ve 14 mg/mL, 24-72 saat) tek başına ve β -glukosidaz enzimi (0,1 mg/mL) ile birlikte MTT testi ile incelemişlerdir. Test sonuçlarına göre Amygdalin'in test edilen tüm konsantrasyon ve uygulama sürelerinde HepG2 proliferasyonunun inhibisyonunu artırdığı belirlenmiştir. HepG2 hücre proliferasyonu üzerine 48 saatlik IC₅₀ değerleri amygdalinin tek başına uygulaması için 458,10 mg/mL ve Amygdalin+ β -glukosidaz uygulaması için ise 3,2 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca apoptotik hücreler AO/EB (akridin oranj/etidyum bromür) floresan boyama yöntemi ve Annexin V-FITC/PI boyama flow sitometri hücre döngüsü analizi ile belirlenmiştir. Amygdalin'in konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak apoptotik oranın yükseldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre Amygdalin'in tek başına etkili bir anti-HepG2 aktivitesi sergilemediği belirlenmiştir. Ancak Amygdalin'in, β -glukosidaz ile aktive edildiğinde açığa çıkan bileşenlerin (hidrosiyanik asit, benzaldehit, prunasin ve mandelonitril) en yüksek ve etkili anti-HepG2 aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bakımdan Amygdalin+ β -glukosidaz kombinasyon stratejisinin tümör tedavisi için kullanılabileceği ve yüksek aktivitede etki elde edilebileceği ileri sürülmüştür.

Moon ve diğerleri (2016), amacı insan kanserleri ve fibroblast hücre hatlarında Amygdalin'in hücre çoğalması ve telomeraz aktivitesi üzerine etkilerini saptamak olan çalışmalarında akciğer adenokarsinomu (A-549), meme adenokarsinomu (MDA-MB-231 ve MCF-7) ve beyin glioblastomu (U87-MG) kanser hücre hatlarının yanında normal fetal akciğer fibroblastlarını (MRC-5) da kullanılmışlardır. Tüm hücre hatlarına Amygdalin'in (D-mandelonitril- β -gentiobiosid) farklı konsantrasyonları 2,5; 5, 10, 20 ve 30 mg/mL uygulanmış ve hücreler muameleden sonra 3 ve 7 gün arası bir hemositometre ile sayılmıştır. Amygdalin uygulaması sonucunda fibroblastlarda kontrol grubuna kıyasla herhangi bir etki gözlenmezken, çoğu kanser hücresindeki hücre proliferasyonunun özellikle Amygdalin'in 10 mg/mL'lik konsantrasyonunda etkili bir şekilde inhibe edildiği gözlenmiştir. Ayrıca, 30 mg/mL'lik Amygdalin muamelesinin hücre proliferasyon oranını tüm hücre hatlarında önemli ölçüde düşürdüğü ölçülmüştür. β -glukosidaz aktivitesinin ölçümü için kanser ve normal hücre hatlarından elde edilen proteinden birim başına 10 μ g değerlendirilmiştir. Siyanür salınmasını sağlayan β -glukosidaz seviyesinin, kanser hücre hatlarında (A-549, MDA-MB-231, MCF-7 ve U87-MG), MRC-5 fibroblastlara göre önemli oranda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, 10 mg/mL Amygdalin ile muamele edilen hücreler ve hiçbir uygulama yapılmayan hücreler (kontrol) faz-kontrast mikroskop ile incelenmiştir. Amygdalin muamelesi yapılmış olan hücrelerin kontrol grubundaki hücrelere göre genişlemiş ve yıldız şeklinde morfolojik görünüme sahip oldukları saptanmıştır. Bu hücresel değişimin hücresel yaşlanmadaki artışı işaret ettiği ifade edilmektedir. Oysa MRC-5 fibroblastlarında bu etkilerin ya hiç olmadığı ya da az sayıda bulunduğu tespit edilmiştir. Yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz aktivitesi ölçüm sonuçlarına göre kontrol ve Amygdalin (10 mg/mL) muamele edilen MRC-5 fibroblastlar arasında β -galaktosidaz bakımından bir fark olmadığı, ancak Amygdalin (10 mg/mL) ile muamele edilen kanser hücrelerinde, hiçbir muamele yapılmayan kanser hücrelerine göre yüksek oranda β -galaktosidaz aktivitesi olduğunu gösterilmiştir. Bu sonuca göre kanser hücrelerinin Amygdalin uygulamasından sonra MRC-5 fibroblastlarından daha hızlı yaşlandığı ifade edilmiştir. Ayrıca, RQ-TRAP testi ile telomeraz aktivitesi ve RT-PCR ile telomeraz ters transkriptaz (TERT) ve telomeraz RNA bileşen (TERC) transkriptlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Telomeraz aktivitesinin düzeyi, TERT ve TERC'i büyük ölçüde eksprese eden kanser hücre hatlarında, TERT ve TERC'i eksprese etmeyen MRC-5 fibroblastlarından anlamlı oranda daha yüksek (~8–13 kat) bulunmuştur. Ancak, kontrol grubu kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında Amygdalin (10 mg/mL) muamele edilen kanser hücrelerinde azalmış TERT ve TERC ifadeleri ile birlikte telomeraz aktivitesinin anlamlı derecede down-regüle olduğu

saptanmıştır. Amygdalin uygulanan MRC-5 fibroblastlar ve kontrol grubu fibroblastlar arasında ise telomeraz aktivitesinde bir farklılık gözlenmemiştir. Bu gözlemlere dayanılarak, Amygdalin'in, β -glukosidaz aktivitesi artmış olan kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasının inhibisyonu ve telomeraz aktivitesinin down-regülasyonuna neden olarak kanser tedavisinde önemli bir seçenek olarak sunulabilceği açıklanmıştır.

Todorova ve diğerleri (2017), Amygdalin'in (0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/mL) sitotoksik (24 s) ve antiproliferatif aktivitesinin (96 s) iki tümör (hepatoselüler karsinom HepG2 ve kolon karsinom HT-29) ve iki normal (fare embriyonik fibroblastları-BALB/3T3 ve insan fibroblastları-BJ) olmak üzere dört farklı hücre hattında MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Amygdalin normal insan hücre hattında (BJ) sitotoksik ve antiproliferatif bir etki göstermezken, fare embriyonik fibroblast hücre hattında (BALB/3T3) en düşük konsantrasyon hariç (0,075 mg/mL) diğer tüm konsantrasyonlarda sitotoksik olup, en yüksek üç konsantrasyonda (2,5; 5, ve 10 mg/mL) hücre canlılığını anlamlı oranda azaltmıştır. Amygdalin hepatoselüler karsinom HepG2 hücre hattında en düşük konsantrasyon (0,075 mg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda önemli oranda sitotoksik olup antiproliferatif aktivitesini büyük ölçüde en yüksek beş konsantrasyonda (0,6; 1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/mL) sergilemiştir. Kolon karsinom HT-29 hücre hatlarında ise Amygdalin tüm konsantrasyonlarda sitotoksik etkiliyken, yalnızca en yüksek iki konsantrasyonda (5 ve 10 mg/mL) antiproliferatif aktivite sergilemiştir. Amygdalinin yüksek proliferatif ve metabolik aktiviteye sahip olan tümör hücre hatlarında gösterdiği toksisitenin normal insan hücre hattında görülmemesi, Amygdalin'in hidrosiyanik asit ve benzaldehite dönüştüğü dikkate alındığında, bu bileşiğin tümör hücrelerine karşı gösterdiği yüksek seçicilik olarak yorumlanmıştır.

Abboud ve diğerleri (2019) Amygdalin'in iki insan meme kanser hücre hattı (MCF-7 ve T47D) üzerine etkisini MTT testi kullanarak incelemişlerdir. Amygdalin'in beş farklı konsantrasyonu (4, 8, 16, 32 ve 65 mmol/L, 24, 48 ve 72 saat) hücre hatlarına uygulanmıştır. Amygdalin'in her iki hücre hattında da konsantrasyona ve sürelerle bağlı olarak hücre büyümesini azaltabildiği gözlenmiştir. MCF-7 ve T47D hücrelerine karşı inhibisyon potansiyeli sırasıyla 39 ve 45 mM olarak ölçülmüştür. Bu inhibisyonun oksidatif stresle olan ilişkisini incelemek için glutatyon, lipid peroksidasyonu ve glutatyon redüktaz aktivitesi düzeyleri analiz edilmiştir. Buna göre Amygdalin her iki hücre hattında da malondialdehit (MDA) oluşumunu ve okside glutatyon düzeylerini indüklediği ve total glutatyon ve

glutasyon redüktaz aktivitesinin azalmasına neden olduğu saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinde, total glutasyon üretiminin Amygdalin ile muamele edilmiş hücrelerde hiçbir muamele olmamış hücrelere göre 6 kat daha az olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, MCF-7 hücrelerinde Amygdalin ile muamele edilmiş kültürlerde MDA oluşumu herhangi bir uygulama yapılmamış kültürlerle göre 2,4 kat daha yüksekken, T47D hücrelerinde bu oranın 1,3 kat düşük olduğu bulunmuştur. Amygdalin'in meme kanseri hücrelerinde *in vitro* antitümör etkisinin bulunduğu ve bu etkinin Amygdalin'in büyük ölçüde hücreleri oksidatif strese duyarlı hale gelmesini teşvik ederek bir pro-oksidan ajan olarak davrandığı varsayımı önerilmiştir.

Başka bir çalışmada, şeftali çekirdeği (*Persicae semen*) özütünün farklı konsantrasyonlarının (0, 1, 2, 5 ve 10 mg/mL, 48 saat) insan promiyelositik lösemi (HL-60) hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz indüksiyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada şeftali çekirdeği özütünde HPLC metodu ile Amygdalin'in en fazla aktif D-formunun bulunduğunu saptamış ve şeftali çekirdeğinin ana bileşeni olduğunu belirtilmiştir. HL-60 hücrelerinde β -glukozidaz (250 nM) enzim varlığında şeftali çekirdeği özütlerinin 6,4 mg/mL (IC_{50} değeri)'lik konsantrasyonda sitotoksik olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak şeftali çekirdeklerinin anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiş olup bu etkinin ise apoptoz ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Kwon, Hong, Hahn ve Kim, 2003). Kayısı çekirdekleri ve bademlerden elde edilen Amygdalin özütlerinin (10, 50, 100, 150 ve 200 μ g/mL, 24 ve 48 saat) (etanolik) antikarsinojenik etkilerini insan oral kanser hücre hattında MTT testi kullanarak değerlendirildiği bir diğer çalışmada, her iki özütte sitotoksik ve antiproliferatif aktivite sergilemiştir. Badem özütleri hücrelerin %78'ini öldürerek maksimum etkisini 50 μ g/mL'de gösterirken kayısı çekirdeğinden elde edilen özütlerin ise 100 μ g/mL (%82)'de bu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sitotoksik etkiye, esas olarak sekonder metabolit olan hidrosiyanid salınmasının neden olduğu ve bu etkinin apoptozisten kaynaklanabileceği yorumu yapılmıştır (Sireesha, Reddy, Reginald, Samatha ve Kamal, 2019).

Kanser hücreleri, kemoterapötik ajanlara karşı kanser tedavisini zorlaştıran bir direnç geliştirebilmektedir. Araştırmacılar bu kanser hücre direncinin üstesinden gelmek için ilaç kombinasyonlarının kullanımını içeren veya antikanser ajanı olarak umut vadeden bileşiklerin kullanımı gibi farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Bu yaklaşımdan faydalanılarak Amygdalin'in anti-kanser ajanları ile kombinlenerek sinerjistik etkilerinin incelendiği *in*

vitro araştırmalar da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde kayısı ekirdeği (*Prunus armeniaca*) etanolik özütleri (100-500) $\mu\text{g/mL}$, Amygdalin (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) ve bir kemoterapi ajanı olan metotreksatın (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) tek başlarına insan servikal kanser (HeLa) hücre hattındaki sitotoksik etkileri analiz edilmiştir. Yanı sıra kayısı çekirdeği özütü+metotraksat ve Amygdalin+metotraksat şeklinde kombinasyonlarının da sitotoksitesini değerlendirilmiştir. Karışımlarda test edilen bileşiklerin tek başına uygulanan konsantrasyonlarının yarısı kullanılmış olup üç farklı muamele periyodu (24, 48 ve 72 saat) ile değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Kayısı özütlerinin tek başına ve kayısı çekirdeği özütü+metotraksat kombinasyonlarının sitotoksik aktivitesinin, metotraksatın tek başına HeLa kanser hücre hattındaki sitotoksitesinden daha fazla olduğu izlenmiştir. Bunun nedeni kayısı çekirdeği özütünün, metotraksatın daha düşük konsantrasyonlarının kullanımına bağlı olarak, kanser hücrelerinde metotraksat aktivitesine karşı direnç oluşumunu en aza indirme kabiliyetiyle ilişkili olabileceği olarak açıklanmıştır. Amygdalin+metotraksat karışımının sitotoksik aktivitesi ise Amygdalin ve metotraksatın tek başına gösterdikleri sitotoksiteden daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu etkilerin metotraksat ve Amygdalin içeren karışımın hem metotraksat aktivitesinin hemde siyanür ve benaldehit salımını içeren antikanser aktivitesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Kafi, Hussein ve Jumaa, 2015).

Benzer şekilde, antikanser ajanlar olarak vincristine ve Amygdalin'in tek başına ve bu iki ajanın kombinasyonlarının olası sinerjistik etkileri, insan servikal kanser hücre hattında (HeLa) MTT hücre canlılığı testi kullanarak araştırılmıştır. Her iki ajan için kullanılan konsantrasyonlar 1, 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g/mL}$ olup uygulama süreleri 24, 48 ve 72 saattir. Her iki ajanında tek başlarına konsantrasyon ve uygulama sürelerine bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettikleri belirlenmiştir. Vincristine ve Amygdalin kombinasyonunun HeLa hücre hattına uygulanması sonucunda her birinin tek başına göstermiş olduğu etkiden daha güçlü bir sitotoksik etki sergiledikleri gözlenmiştir. Bu etkinin özellikle 72 saatlik uygulama süresinde 10000 $\mu\text{g/mL}$ 'de daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Vincristine ve Amygdalin kombinasyonunun apoptozu teşvik ederek sinerjistik bir etki gösterdikleri ileri srlmştir (Jumaa, 2016). Amygdalin sito-aktivite üzerine etkilerinin analiz edildiği tüm bu çalışmalarda, Amygdalin'in belirli konsantrasyonlarının tek başına veya β -glukozidaz enziminin hareketi altında hidrosiyamid salınması aracılığıyla kanser hücrelerini seçici olarak öldürebileceği ifade edilmiştir.

Amygdalin'ın hücre döngüsü üzerine etkilerin araştırıldığı pekçok çalışma bulunmaktadır. Makarević ve diğerleri (2016), Amygdalin'ın (1–10 mg/mL, 24 saat veya 2 hafta) anti-tümör aktivitesini LNCaP (kastrasyon-duyarlı), DU-145 ve PC3 (kastrasyon-dirençli) prostat kanseri hücre hatlarında değerlendirmiştir. Rapamisin (mTOR) yolağının hedefi olan protein kinaz B (AKT), prostat kanserinde oldukça aktiftir ve kastrasyona dirençli hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Hücre büyüme düzeyi MTT testi ile klonal formasyon ise klonojenik test ile ölçülmüştür. Flow sitometri ile apoptoz ve hücre döngüsü fazları araştırılmıştır. Ayrıca hücre döngüsü düzenleyici proteinler Western blotlama ile analiz edilmiştir. Amygdalin maksimum etkisini 10 mg/mL'de göstermekle beraber, doza bağlı olarak tümör hücre büyümesini azalttığı bulunmuştur. Ayrıca Amygdalin (10 mg/mL, 2 hafta) DU-145 hücrelerinde apoptozisi etkilemediği ve LNCaP ve PC3 hücrelerinde ise apoptoz oranını artırdığı saptanmıştır. Hem 24 saat hem de 2 hafta süreli Amygdalin uygulamalarının G2/M- ve S-fazındaki hücreleri anlamlı olarak azaltırken, G0/G1 faz hücrelerinin sayısında önemli artışa sebebiyet vererek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ek olarak, Amygdalin uygulamalarından sonra siklin bağımlı kinaz 1 (cdk1), cdk2, cdk4 ve siklin A, siklin B, siklin D3 gibi hücre döngüsü proteinlerinin ifadelerinin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle Amygdalin'ın hem kastrasyona duyarlı hem de kastrasyona dirençli prostat kanser hücrelerinde hücre döngüsünü düzenlemesi sayesinde hücre çoğalmasını engelleyerek önemli düzeyde anti-tümör aktivite sergilediği belirtilmiştir.

Yine Makarević ve diğerleri (2014) Amygdalin'ın (1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/mL) bir grup mesane kanser hücre hatındaki (UMUC-3, RT112 ve TCCSUP) etkilerini tümör büyümesi, proliferasyon, klonal büyüme ve hücre döngüsü ilerlemesi bakımından araştırmışlardır. Hücre döngüsü düzenleme proteinleri cdk1, cdk2, cdk4, siklin A, siklin B, siklin D1, p19, p27'in yanı sıra rapamisin hedefi (mTOR) ilişkili sinyaller olan phosphoAkt, phosphoRaptor and phosphoRictor incelenmiştir. Amygdalin'ın her üç mesane kanser hücre hattında büyüme ve proliferasyonda doza bağlı bir azalmaya neden olduğu ve hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirerek G0/ G1 fazındaki hücre sayısında önemli bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Cdk'ler, siklinlerle birlikte, hücre döngüsü ilerlemesi ve hücre bölünmesinden sorumlu anahtar moleküllerdir, bu nedenle belirli cdkler, belirli siklinlerle bağlantılıdır. Moleküler değerlendirmeler sonucunda phosphoAkt, phosphoRictor, Cdk ve siklin bileşenlerinin azaldığı saptanmıştır. Amygdalin'ın en göze çarpan etkileri cdk2-siklin A kompleksi üzerinde gözlenmiştir. Amygdalin, UMUC-3 ve TCCSUP hücrelerinin G0/G1 fazında tutuklanmalarına neden olarak aynı zamanda cdk2/siklin A kompleksini down-

modüle ettiği bulunmuştur. Bunun sebebi cdk2-siklin A kompleksinin G1/S faz geçişini teşvik etmesi olarak açıklanmıştır. Bu proteinler mitotik döngüye girişi düzenlediği için ayrıca tümör büyümesindeki rolleri siRNA knock-down çalışmaları gerçekleştirililerek değerlendirilmiştir. Bu sayede Cdk2/siklin A ekspresyon seviyesi ile tümör büyümesi arasındaki pozitif bir korelasyon olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle Amygdalin'in tümör büyümesini ve gelişimini engelleyebilme mekanizmalarından birinin cdk2 ve siklin A'yı baskılamak olduğu düşünülmektedir.

Amygdalin'in renal karsinom hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerinin incelendiği benzer bir çalışmada ise, Amygdalin (10 mg/mL) Caki-1, KTC-26 ve A498 olmak üzere farklı renal karsinom hücre hatlarına 24 saat ve 2 hafta süreyle uygulanmıştır. MTT ve BrdU testleri kullanılarak tümör hücre büyümesi ve proliferasyonu belirlenmiş ve hücre döngüsü fazları değerlendirilmiştir. Hücre döngüsü aktive edici proteinler cdk1, cdk2, cdk4, siklin A, siklin B, siklin D1 ve D3'ün yanı sıra hücre döngüsü inhibe edici proteinler p19 ve p27'nin ekspresyonu Western blot analizi ile incelenmiştir. Ayrıca farklılaşma belirteçleri olan E- ve N-kadherinin yüzey ifadesi araştırılmıştır. Amygdalin muamelesi RCC hücre büyümesi ve proliferasyonunda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bu etki S- ve G2/M-fazındaki hücrelerin azalarak, G0/G1 fazındaki hücrelerin artması (Caki-1 ve A498 hücreleri için) veya S-fazında hücre döngüsünün tutuklanması (KTC-26 hücrelerinde) ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, Amygdalin hücre döngüsünü aktive eden proteinlerde özellikle de Cdk1 ve siklin B'de belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Cdk1 ve siklin B'nin foksiyonel blokajı her üç renal karsinom hücre hattında da tümör hücre büyümesini anlamlı olarak azaltmıştır. Bunların yanında Amygdalin farklılaşma belirteçleri olan E- ve N-kadherini de modüle etmiştir. Bu sonuçlar nedeniyle, Amygdalin'in *in vitro* olarak renal karsinom hücrelerinde antitümör bir etkisinin olduğu önerilmiştir (Juengel ve diğerleri, 2016).

Amygdalin'in hücre döngüsü üzerine etkilerinin insan kolon kanser hücre hattında incelendiği farklı bir çalışmada ise, öncelikle Amygdalin'in farklı konsantrasyonlarının (0,5; 2,5; 5 ve 25 mg/mL, 24 saat) SNU-C4 insan kolon kanser hücrelerine etkisi MTT ile araştırılmıştır. Amygdalin en düşük konsantrasyonu (0,5 mg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Ardından cDNA mikroarray analiz yöntemini kullanılarak insan kolon kanseri SNU-C4 hücrelerinde 24 saat süre ile Amygdalin uygulanan (5 mg/mL) ve hiçbir uygulanma yapılmayan gruplar arasındaki gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. cDNA mikroarrayde downregüle

genler seçilerek, bu genlerin mRNA düzeyleri RT-PCR ile incelenmiştir. Sonuç olarak, Amygdalin'in özellikle hücre döngüsü ile ilişkili genler olan eksonükleaz 1 (EXO1), ATP-bağlama kaseti alt-aile F üye 2 (ABCF2), MRE11 mayotik rekombinasyon 11 homolog A (MRE11A), topoizomeraz DNA I (TOP1) ve FK506 bağlayıcı protein 12-rapamisin-ilşkili protein 1 (FRAP1)'i down-regüle ettiği belirlenmiştir. Ek olarak, RT-PCR analizi ile bu genlerin mRNA seviyelerinin de Amygdalin muamelesini takiben azaldığı ortaya konmuştur. Bu genler DNA replikasyonu, onarımı veya rekombinasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle, bu genlerin Amygdalin tarafından down-regüle edilmesinin SNU-C4 hücrelerinde DNA hasarına sebep olabileceği ifade edilmiştir. Böylece Amygdalin'in insan kolon kanser SNU-C4 hücre hattında hücre döngüsü ile ilişkili genlerin down-regülasyonu aracılığıyla antiproliferatif etkisini gösterdiği belirtilmiştir (Park ve diğerkleri, 2005). Bahsi geçen tüm çalışmalarda, Amygdalin'in, tümör hücresi döngüsüyle ilgili proteinleri veya genleri düzenleyerek, hücre döngüsünü etkileyerek ve cdk-siklin kompleksleri ile Akt-mTOR yolağını düzenleyerek, insan kanserlerinde hücre çoğalmasını önleyebileceği ve tümör hücrelerinin kötü huylu proliferasyonuna engel olabileceği gösterilmiştir.

Farklı kanser hatları kullanılarak Amygdalin'in apoptotik etkilerinin ve bu etkiler ile ilişkilili olabileceği düşünölen mekanizmal yolakların araştırıldığı çalışmalarda Amygdalin'in apoptozis ile ilişkilili proteinleri düzenleyerek anti-tümör etkisini ortaya koyduğu belirlenmiştir. Chang ve diğerkleri (2006), kayısı çekirdeğinden (*Armeniacae semen*) elde ettikleri Amygdalin özütünün insan DU145 ve LNCaP prostat kanser hücrelerine etkilerini MTT, RT-PCR ve kaspaz enzim aktivitesi testlerini kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışmada Amygdalin'in 0,01; 0,1; 1 ve 10 mg/mL'lik farklı konsantrasyonları kullanılmış olup 24 saatlik muamele soucunda her iki hücre hattında Amygdalin'in yüksek konsantrasyonlarda sitotoksisite sergilemiştir. Ayrıca, Amygdalin'in hem DU145 hem de LNCaP hücrelerinin morfolojilerinde karakteristik apoptotik değişimlere neden olduğu belirtilmiştir. Amygdalin'in DU145 ve LNCaP prostat kanser hücrelerinde Bax (pro-apoptotik protein) ifadesini artırarak, Bcl-2 ifadesini (anti-apoptotik protein) azalttığı ve kaspaz-3 enzim aktivitesini de artırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak Amygdalin'in Bcl-2 down-regülasyonu ve Bax up-regülasyonu üzerinden kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla insan prostat kanser hücrelerinde (DU145 ve LNCaP) apoptotik hücre ölümlünü teşvik ettiği belirtilmiştir. Bu nedenle Amygdalin'in prostat kanserlerinin tedavisinde bir seçenek olarak değerlendirilebileceği vurgulanmıştır.

Amygdalin'ın insan servikal kanser HeLa ve insan embriyonik amnion FL hücre hattında Amygdalin'ın hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT testi ile incelendiği bir çalışmada, Amygdalin'ın beş farklı konsantrasyonu (1,25; 2,5; 5, 10 ve 20 mg/mL) 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Muamele sonrasında HeLa hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalma gözlenirken, FL hücre hattında herhangi bir etkiye neden olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte Amygdalin uygulanan HeLa hücre hattında 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI) boyamasından sonra hücre morfolojisinde apoptotik değişimler gözlenmiştir. Bu hücrelerde Bax'ın Bcl-2'ye oranında ve yalnızca kaspaz-3 aktivitesinde belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Apoptoza ek olarak, Amygdalin muamelesi sonrasında HeLa hücre canlılığında gözlenen azalmanın hücre döngüsü tutuklaması ile ilgili başka bir mekanizmadan kaynaklanma ihtimalini anlamak amacıyla hücrelerin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılımı flow sitometri ölçümü ile değerlendirilmiş ve Amygdalin ile kontrol grubu (muamele yapılmayan) HeLa hücreleri arasında G0/G1, S ve G2/M fazlarının aynı kaldığı ifade edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada Amygdalin'ın *in vivo* antikanser etkisini değerlendirmek amacıyla HeLa hücreler implante edilmiş farelere (BALB/c) Amygdalin (300 mg/kg) 14 gün süre ile intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Amygdalin'ın bir apoptoz mekanizması yoluyla tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar Amygdalin'ın servikal kanserli hastalar için yeni bir terapötik seçenek olarak düşünülebileceğini öne sürmüşlerdir (Chen ve diğerleri, 2013).

Lee ve Moon (2016) Amygdalin'ın insan meme kanseri hücreleri proliferasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Amygdalin'ın farklı konsantrasyonları (0; 2,5; 5, 10, 20, 40, 80 mg/mL) östrojen reseptörleri (ER)-pozitif MCF7 hücreleri ve MDA-MB-231 ve Hs578T üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerine 24 saat uygulanarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. Amygdalin'ın konsantrasyona bağlı olarak MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 30,8; 48,5 ve 52,9 mg/mL olarak bulunmuştur. Amygdalin Hs578T hücrelerinde apoptozu indüklemiştir. B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ekspresyonunu azaltmış, Bcl-2- ilişkili X proteini (Bax)'nin ekspresyonunu artırmış, kaspaz-3'ü aktive ederek poli ADP-riboz polimerazın (PARP) bölünmesine neden olmuştur. Bununla birlikte Amygdalin Hs578T hücrelerinde pro-apoptotik sinyal molekülü p38 mitojen aktive edici protein kinazları aktive ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada Amygdalin muamelesinin muhtemelen integrin $\alpha 5$ yoluyla, Hs578T insan meme kanseri hücrelerinde hücresel adhezyonu azalttığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda Amygdalin'ın meme kanseri

(özellikle TNBC) için bir pro-apoptotik ve anti-adhesiv ajan olarak kemopreventif bir potansiyele sahip olabileceği yorumu yapılmıştır.

Amygdalin'in insan meme kanseri üzerindeki kemopreventif etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan başka bir çalışmada, HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2)'nin aşırı ifadesini içeren ve kadın meme kanserlerinden köken alan bir adenokarsinom hücre hattı (SK-BR-3) kullanılmıştır. Amygdalin'in farklı konsantrasyonlarıyla (2,5; 5, 10, 20, 40 ve 80 mg/mL, 24 saat) muamele edilen bu hücrelerin canlılık oranları MTT testiyle ölçülmüş ve Amygdalin'in 5, 10 ve 20 mg/mL'lik konsantrasyonları kullanılarak Bax ve Bcl-2 düzeyleri Western blot analizi ile tespit edilmiştir. Ayrıca, Bcl-2 (PDB ID: 4LVT) ve HER2 (PDB ID: 3RCD) aktif bölgesi içine Amygdalin'in moleküler yerleştirilmesi çalışmaları (*in silico*) AutoDock 4.2.5 ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Amygdalin'in SK-BR-3 hücrelerinde doza bağlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, Amygdalin'in pro-apoptotik Bax proteinin ifadesinde artışa ve anti-apoptotik protein Bcl-2 ifadesinde ise azalmaya neden olarak apoptotik ölümleri indükleyebildiği gözlenmiştir. Moleküler yerleştirme çalışmalarında, Amygdalin'in hidrojen bağı ve bazı hidrofobik etkileşimler yoluyla Bcl-2 ve HER2'nin aktif bölge amino asitleri ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Buna göre, Amygdalin'in özellikle HER2 pozitif hücrelerde meme kanserinin tedavisi için değerli bir aday olabileceği önerilmiştir (Moradipoodeh, Jamalan, Zeinali, Fereidoon nezhad ve Mohammadzadeh, 2019).

Arshi ve diğerleri (2019) Amygdalin'in sitotoksik etkilerini, iki apoptotik gen (Survivin, XIAP) ve iki lncRNA'lar (GAS5, MALAT1) üzerine etkilerini insan kanser hücrelerinde (A549-akciğer kanser hücreleri, MCF7-meme kanser hücreleri, AGS-mide kanser hücreleri) incelemişlerdir. Kanser hücrelerinde Amygdalin (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 ve 5 mg/mL) ile muamele edilen (24, 48 ve 72 saat) ve muamele edilmeyen gruplar arasındaki apoptozis ile ilgili genlerin mRNA düzeylerini RT-qPCR tekniğini kullanarak karşılaştırmışlar, sitotoksik etkilerini ise MTT testi ile analiz etmişlerdir. Amygdalin AGS, MCF7 ve A549 kanser hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunu tüm muamele sürelerinde konsantrasyona bağlı olarak azaltmıştır. Ayrıca Amygdalin ile muamele edilmiş hücrelerde muamele edilmeyen hücrelere kıyasla Survivin, XIAP, GAS5 ve MALAT1 ifadelerinde anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır. Amygdalin, Survivin ve XIAP anti-apoptotik genlerin ifadesini önemli ölçüde engellemiştir. Bu bulgulara göre Amygdalin'in insan kanser

hücrelerinde çeşitli kritik genlerin ifadelerini değiştirmesi dolayısıyla doğal bir terapötik antikanser ilacı olarak bir potansiyelinin olabileceği ileri sürülmüştür.

2020 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada ise hepatoselüler karsinom (HepG2) hücre hattında Amygdalin'in tek başına ve çinko ile beraber etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Hücre kültürlerine tek başına Amygdalin, Amygdalin+20 µmol çinko ve 800 µmol çinko olacak şekilde üç farklı uygulama gerçekleştirilmiştir. MTT testi ile sitotoksikite ölçümü yapılmıştır. Amygdalin'in tek başına güçlü anti-HepG2 aktivitesi sergilemiştir. Diğer yandan flow sitometri ile hücre döngüsünün dağılımı ve Annexin V-FITC/PI boyama testi ile apoptoz etkileri saptanmıştır. Ayrıca, P53, Bcl2, Bax, sitokrom c ve kaspaz-3 oranlarındaki değişim yüzdeleri aracılığıyla apoptoz yolağı belirlenmiştir. Her iki Amygdalin+çinko muamelesi Amygdalin'in tek başına uygulanmasından daha iyi apoptotik etki göstermiştir. Amygdalin uygulaması G2/M fazında hücre döngüsünün tutuklanmasına neden olmuş ve P53, Bax, sitokrom c ve kaspaz-3 düzeylerini önemli ölçüde artırırken, anti-apoptotik Bcl2 düzeyini düşürmüştür. Sonuç olarak hepatoselüler karsinom tedavisinde kullanılabileceği düşünülen doğal bir anti-kanser ajanı olan Amygdalin'in çinko ilavesi ile HepG2 tedavisindeki potansiyelinin önemli ölçüde arttığı ve Amygdalin'in intrinsik hücre ölümü yolağı (mitokondriyel yolak) ve hücre döngüsü tutuklaması vasıtasıyla apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (El-Desouky, Fahmi, Abdelkader ve Nasraddin, 2020).

Yukarıda bahsi geçen bazı araştırmalarda, Amygdalin'in test edilen konsantrasyonlarının tümünün normal hücre hatlarında sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Benzer şekilde, mevcut tez çalışmasında da Amygdalin'in S9 içermeyen ve içeren çalışmaların her ikisinde de insan lenfositlerinde bir sitotoksikite parametresi olan mitotik indeksi (Mİ) test edilen konsantrasyonlarda önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır. Yine bu araştırmalardan bazılarında, Amygdalin'in diğer anti-kanser ajanları ile birlikte kanser hücrelerinde gözlenen sitotoksik etkileri nedeniyle sinerjistik etkisinin olabileceği görülmektedir. Bu tez çalışmasında ise Amygdalin'in insan lenfositlerinde kullanılan antikanser ajanlarının (MMC ve SF) neden olduğu sitotoksik etkilere karşı antagonistik bir etki göstererek hücreleri korumuş olduğu düşünülmektedir. Amygdalin'in (25–800 µg/mL), fitohemaglutinin ile uyarılan *in vitro* insan periferik kan T lenfositlerinin çoğalmasını kolaylaştırdığı (Guo ve diğerleri, 2008), başka bir çalışmada ise Amygdalin'in (100–400 mg/L), 200 mg/L'lik konsantrasyonda en belirgin etkiyle T lenfositlerin çoğalmasını teşvik ettiği (Zheng ve diğerleri, 2009) bulunmuştur. Amygdalin'in bu etkileri bağışıklık sistemi üzerindeki

düzenleyici aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (He ve diğerleri, 2020). Bu bakımdan, hem MMC hem de SF'in güçlü birer immün baskılayıcı ajanlar olduğu düşünüldüğünde, Amygdalin'in Mİ'deki düzenleyici etkileri, immün sistemindeki olumlu etkilerine atfedilebilir.

Hücre döngüsü üzerine etkilerinin analiz edildiği araştırmalarda ise, Amygdalin'in farklı kanser hücre hatlarında hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirerek G0/G1 fazında hücre yüzdesinin artırılmasını ve S- ve G2/M- faz hücrelerinin yüzdesinin önemli ölçüde azaltılmasını teşvik etmekte olduğu ifade edilmektedir. Bu bakımdan, Amygdalin'in hücre döngüsünü yavaşlatarak hücre proliferasyonunu ve büyümesini bloke ettiği düşünülmektedir. Son yapılan bir araştırmaya göre, Amygdalin'in insan Michigan Kanser Vakfı-7 (MCF-7) meme kanseri hücre hattında DNA replikasyonunda kritik rol oynayan 32 genin (DNA polimeraz α -primaz kompleks, DNA polimeraz δ -kompleks vb.) down-regülasyonuna neden olduğu, bu sayede antiprolatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Albogami ve Alnefaie, 2021). Ayrıca, yine farklı kanser hücre hatlarında gerçekleştirilen birçok çalışmada, Amygdalin'in genellikle pro-apoptotik Bax proteinin ifadesini artırarak ve anti-apoptotik protein Bcl-2 ifadesini azaltarak apoptozu teşvik ettiği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında özellikle 48 saatlik Amygdalin+MMC uygulamaların tamamında Rİ ölçümünde kullanılan, üçüncü mitoz evresindeki (M3) hücrelerin sayısının pozitif kontrole göre ciddi miktarda azalmış olduğu gözlenmiştir. Bu etki ön muamele ve geç zamanlı muamlede daha fazla öne çıkmaktadır. Bu nedenle, hücre döngüsünün geç G1 ve erken S fazlarında DNA sentezinin inhibisyonuna neden olan MMC'nin zararlı etkilerini, bu evrelerden önce bloke etmiş olabileceği olası görünmektedir. Kanser hücrelerinin de yüksek miktarda kromozomal ve DNA hasarı içerdiği göz önüne alınacak olursa, Amygdalin'in insan lenfositlerinde de hücre döngüsünü yavaşlatarak veya literatürde yer alan benzer veya farklı apoptotik yolları aktive etmek suretiyle MMC'nin neden olduğu genetik hasarın sonraki hücre nesillerinde de sürdülmesini önlediği tahmin edilmektedir. Yalnızca bu noktada MMC ile sinerjistik bir etki göstermiş, üstelik tek başına MMC uygulamasına kıyasla toksik etki oranını önemli düzeyde azaltmıştır. Gerek Mİ gerek Rİ bakımından Amygdalin'in güçlü bir sito-protektif etki sergilemiş olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Amygdalin'in *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkileri metabolik aktivatör yokluğunda ve varlığında farklı test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu bağlamada metabolik aktivatör yokluğunda gerçekleştirilen

testler KA, KKD, mikronükleus ve comet testleriyken, metabolik aktivatör varlığında yalnızca KA ve KKD testleri gerçekleştirilebilmiştir. Genotoksik değerlendirmeler için tüm deneylerde Amygdalin hücre kültürlerine tek başına uygulanmıştır. Antigenotoksik değerlendirmelerde ise metabolik aktivatör içermeyen kısımda üç farklı antigenotoksisite protokolü kullanılmış olup bunlar ön muamele, eş zamanlı muamele ve geç zamanlı muameledir. Metabolik aktivatör varlığında gerçekleştirilen antigenotoksisite kısmında ise yalnızca eş zamanlı muamele uygulanmıştır.

Antigenotoksisite değerlendirmelerinde yaygın olarak üç farklı uygulama protokolü kullanılmaktadır. Bunlardan ilki *ön muamele* protokolüdür. Bu uygulamada, antigenotoksik potansiyeli belirlenmek istenen bileşik genotoksik (mutajenik) etkisi iyi bilinen bir ajandan belirli bir süre önce test sistemine uygulanır. Diğer muamele protokolü olan *eş zamanlı muamelede*, antigenotoksik potansiyeli belirlenmek istenen bileşik yine iyi bilinen bir genotoksin/mutajen ile birlikte aynı anda test sistemine uygulanır. Son olarak, *geç zamanlı muamelede* ise antigenotoksik potansiyeli belirlenmek istenen bileşik genotoksik ajandan belirli bir süre sonra test sistemine uygulanır. Bu uygulama protokollerindeki farklılık test edilen bileşiğin etki mekanizması ile ilgili olarak bilgi vermektedir.

Ön muamele protokolü, mutajen veya bir genotoksinin neden olduğu genotoksik hasarı önleme kabiliyetinin değerlendirilmesine izin vermektedir. Bu protokolde gözlenen antigenotoksik aktivite, genotoksik ajanın veya bu ajana ait metabolik ürünlerin doğrudan veya dolaylı olarak inaktivasyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, ön muamele protokolünde etkili olan bileşiklerin reaktif oksijen türlerini süpürebilme yeteneğinde oldukları söylenebilir. Bu bileşikler DNA oksidasyonunu önleyebilmekte, ayrıca metabolik kimyasallar veya mutajenik ajanların enzimatik inaktivatörleri olarak hareket eden veya promutajenlerin aktivasyonunu inhibe eden belirli metabolize edici enzimleri indükleyebilirler. Bu nedenle, ön muamele uygulamasında aktivite gösteren bileşiklerin desmutajenik etki gösterdikleri tahmin edilmektedir (Barcelos ve diğerleri, 2011; De Flora, 1998, Kada ve diğerleri, 1982; Kuroda, Jain, Tezuka ve Kada, 1992; Luca ve diğerleri, 2016). Geç zamanlı muamele protokolü, test bileşiğinin mutajen veya genotoksin tarafından oluşturulan hasarı onarma kabiliyeti hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu muamelede antigenotoksik aktivitenin gözlenmesi, hücre ve DNA'nın korunmasında görev alan fizyolojik mekanizmalarının indüklendiği, genotoksik etkilerin tersine çevrilerek mutasyonların kalıcı hale gelmesinin önüne geçildiği anlamına gelmektedir. Bu yüzden, geç

zamanlı uygulamada aktivite gösteren antigenotoksik bileşiklerin biyoantimutajenler olarak hareket ettikleri düşünülmektedir (Barcelos ve diğerleri, 2011; De Flora ve Ramel, 1988, Kada ve diğerleri, 1982; Luca ve diğerleri, 2016). Eş zamanlı muamele protokolünde etkili olan antigenotoksik/antimutajenik ajanların, mutajenleri kimyasal veya enzimatik olarak inaktive eden veya promutajenlerin metabolik aktivasyonunu inhibe eden desmutajenler olarak hareket edebildikleri ifade edilmiş olsada, desmutajenik aktiviteyi doğrudan ortaya koyan uygulamanın ön muamele olduğu açıklanmıştır (Kuroda ve diğerleri, 1992). Bu nedenle, bazı araştırmacılar, ön ve eş zamanlı uygulamalarda etkili olan bileşiklerin, desmutajenler olarak hareket ettiklerini öne sürmektedir (De Flora ve Ramel, 1988; Srivastava ve diğerleri, 2016). Bununla birlikte, eş zamanlı muamele protokolünde gözlenen antigenotoksik etkinin yukarıda belirtilen tüm mekanizmalar aracılığı ile oluşabildiği de bildirilmiştir (Barcelos ve diğerleri, 2011; De Flora, 1998, Kada ve diğerleri, 1982; Luca ve diğerleri, 2016).

Amygdalin'in serbest radikal süpürücü etkisi ve antioksidan aktivitesi üzerine yapılan bir çok çalışma bulunmaktadır. Buna göre, ilk kez Heikkilä ve Cabbatt, 1980 yılında yaptıkları çalışmada Amygdalin'in kimyasal yapısı (bir benzen halkası ve bir kısım şeker) dolayısıyla hidroksil radikalleri ile yüksek oranda reaktiviteye sahip olduğunu ve iyi birer hidroksil radikali süpürücü aktiviteye sahip olabileceğini bildirmişlerdir. Āuračka ve diğerleri (2016) Amygdalin'in tavşan testis dokularında düşük konsantrasyonda (0,6 mg/kg, intramusküler) bir antioksidan olarak hareket edebileceğini ifade etmişlerdir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda (3,0 mg/kg, intramusküler) benzaldehit ve siyanür dozlarının kritik seviyeye ulaşması neticesinde, Amygdalin'in pro-oksidan gibi davranarak hassas oksidatif dengeyi aşırı ROS üretimi yönünde bozduğu ve lipid peroksidasyonundan ziyade protein oksidasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Albogami ve diğerleri (2020) farklı Amygdalin dozlarının (200, 100 and 50 mg/kg) farelerde antioksidan gen ekspresyonu ve oksidatif hasarın baskılanması üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Amygdalin farelere oral olarak 2 hafta süre ile uygulanmış olup süre bitiminde gen ekspresyonu, biyokimyasal ve histopatolojik analizler için karaciğer ve testis örnekleri toplanmıştır. Çalışma sonucunda 100 mg/kg Amygdalin konsantrasyonu hepatik ve testiküler dokularda glutatyon peroksidaz (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) mRNA ifadesini upregüle etmiştir. Karaciğer ve testis dokularında lipid peroksidasyonunu önemli oranda azaltmıştır. Amygdalin'in bu konsantrasyondaki düzenleyici etkisinin doğrudan GSH upregülasyonuna bağlı olan antioksidan etki nedeniyle olabileceği ifade edilmiştir. Bununla birlikte en düşük Amygdalin

konsantrasyonu (50 mg/kg) gen ve protein düzeylerini etkilemezken, en yüksek Amygdalin konsantrasyonu (200 mg/kg) hepatik ve testiküler dokularda glutatyon peroksidaz (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) mRNA ifadelerinin downregülasyonuna sebep olmuş ve lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde artırmıştır. En yüksek konsantrasyondaki bu etkisi ise hidrojen siyanür ve benzaldehit konsantrasyonu kritik bir seviyeye yükseltildiğinde, Amygdalin'in oksidatif dengeyi değiştirerek bir pro-oksidan olarak hareket etmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Ehrlich solid tümör (EST) geliştirilen farelerde vitamin B17'in (Amygdalin) oksidatif stres, DNA hasarı ve apoptoz üzerine etkilerini incelemiştir. Yalnızca EST uygulanan gruplarda tümör hacmi büyük ölçüde artarken, aynı zaman MDA (malondialdehit), H₂O₂ (hidrojen peroksit), NO (nitrik oksit), ve dsDNA da artmıştır. Ayrıca katalaz, GSH ve SOD aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. EST geliştirilen farelere Vitamin B17 (175 mg/kg, oral olarak, 2 hafta) muamelesinden sonra MDA, H₂O₂, NO, ve dsDNA düzeyleri önemli ölçüde azalırken, antioksidan indikatörler olan katalaz, GSH ve SOD düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Bu sonuçlar vitamin B-17'nin antioksidan savunma sistemini aktive ederek ve serbest radikalleri süpürücü etkisi ile EST ile ilişki oksidatif stresi azalttığı ve antineoplastik ve antioksidan özelliğe sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır (El-Masry, Al-Shaalan, Tousson, Buabeid ve Alyousef, 2019). Amygdalin'in (3 g/kg, intraperitoneal) ön muamelesinde Tunikamisin'in (2 g/kg, intraperitoneal) neden olduğu oksidatif stresle ilişkili olan endoplazmik retikulum (ER) stresi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Amygdalin'in Tunukamisinin neden olduğu ER stresini azalttığı belirlenmiştir. Ek olarak Amygdalin'in karaciğer dokusunda endoplazmik retikulum stresinin artırdığı MDA düzeyini azalttığı ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak antioksidan aktivite sergilediği bildirilmiştir (A. Moslehi, Komeili-Movahed ve M. Moslehi, 2019). Başka bir çalışmada ise, Elsaed (2019) farelere ön muamle şeklinde uygulanan Amygdalin'in (5 mg/kg, intraperitoneal enjeksiyon) concanavalin-A (Con-A, 15 mg/kg, intravenöz enjeksiyon) tarafından indüklenen otoimmün hepatitli farelerin karaciğerinde, malondialdehit (MDA) düzeyini azalttığını ve antioksidan enzimlerin (SOD, KAT ve GSH) düzeylerini artırdığını saptamıştır. Amygdalin'in ROT üretimini azaltarak ve antioksidan sistem aktivasyonu aracılığıyla koruyucu etkisini gösterdiğini belirtmiştir. Tüm bu çalışmalar Amygdalin'in antioksidan etki mekanizmalarından serbest radikal süpürücü aktivite ve doğrudan antioksidan etkilerle enzimatik antioksidan seviyelerinin artmasına neden olduğunu göstermektedir.

Kanser tedavisi için umut vadettiğine inanılan ve son derece popüler hale gelen Amygdalin doğada en fazla bulunan siyanojenik glikozitlerden biridir. Bugün Amygdalin'in kanser hastalığını tedavi ettiği konusu henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Konu üzerindeki tartışmalar ve araştırmalar devam etmektedir. Bu konu henüz netlik kazanmadığı halde Amygdalin tabletleri ticari olarak “laetrile” veya vitamin “B17” adlarıyla doğal diyet takviyesi şeklinde satışa sunulmaktadır (Wahab ve diğerleri, 2015; Çelik ve Yıldırım, 2017). Doğada insan diyetinde önemli bir yer tutan özellikle *Rosaceae* familyasına ait türlerin bitki tohumlarında (şeftali, kayısı, acı badem, elma, kiraz vb.) bulunması, bu bileşiğin doğal yollar aracılığıyla da ulaşılabilmesini kolaylaştırmıştır (Ames ve diğerleri, 1981; Hwang ve diğerleri, 2008; Kolesar ve diğerleri, 2018). Gerek tüketimi gerek diyet takviyesi şeklinde kullanımı açısından zararlı durumlar oluşturabilmektedir. Amygdalin oral olarak uygulandığında çok güçlü bir toksisite oluşturarak siyanür zehirlenmelerine neden olmakta ve ciddi yan etkiler ortaya çıkarmaktadır. Bu bağlamda yapılan birçok araştırmaya da fazla miktarlarda tüketilen acı bademlerin ve kayısı çekirdeklerinin çocuk ve yetişkinlerde siyanür zehirlenmelerine neden olabildiği saptanmıştır (Akyıldız ve diğerleri, 2010; He ve diğerleri, 2020; Mouaffak ve diğerleri, 2013). Normalde toksik olmayan Amygdalin, oral olarak uygulanmadan sonra gastrointestinal kanalda β -glukozidaz tarafından prunasine metabolize edilmektedir. Prunasin ise liyaz enzimi aracılığıyla hidroliz edilerek glikoz ve mandelonitril adı verilen başka bir bileşik oluşturmaktadır. Mandelonitril ise enzimatik olmayan bir şekilde benzaldehite ardından hidroksil nitril liyaz tarafından hidrojen siyanüre (HCN) dönüştürülmektedir. Siyanür, hızla karaciğer ve böbrekte rodanaz tarafından tiyosiyanata detoksifiye edilerek, vücuttan atılır. Ancak, Amygdalin'in intravenöz olarak uygulandığında gastrointestinal sistemdeki enzimatik bozunmayı atlayarak, siyanür veya benzaldehit üretimine neden olmadığı, böylece siyanür toksisitesinin önlendiği belirtilmektedir (Jaswal ve diğerleri, 2018; Mani ve diğerleri, 2019; Oduwale ve Abdelnaser, 2020; Strugala ve diğerleri, 1986). Amygdalin'in enzimatik kataliz olamadan da hidrolize uğrayabildiği, su aracılığıyla glikoz, benzaldehit ve hidrosiyamik aside hidrolize olabildiği bildirilmiştir (Holzbecher, Moss ve Ellenberger, 1984; Strugala, Stahl, Elsenhans, Rauws ve Forth, 1995; Albogami ve diğerleri, 2020).

Bu tez çalışmasında Amygdalin ve metabolitlerinin *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkilerini metabolik aktivatör (S9 karışım) yokluğunda ve varlığında araştırmak amaçlanmış olup böyle bir çalışma ilk kez gerçekleştirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde, Amygdalin ve metabolitlerinin test edilen konsantrasyonlarda

genotoksik bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Amygdalin'in genotoksik ve alkilleyici kemoterapi ajanlarının (MMC ve SF) neden olduğu genetik hasara karşı genoprotektif kapasitesinin yanı sıra insan lenfositlerinde H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif DNA hasarı üzerine etkilerinin de araştırıldığı bu tez çalışmasında, S9 karışım yokluğunda ve varlığında gerçekleştirilen deneylerden edilen veriler birbiri ile son derece uyumludur. Amygdalin, S9 karışım yokluğunda MMC'nin teşvik ettiği artmış kromozom anormallik, kardeş kromatid değişim ve mikronükleus frekanslarını özellikle 48 saatlik uygulamalarda tüm muamele tiplerinde ve neredeyse test edilen konsantrasyonların hepsi için önemli ölçüde azaltmıştır. S9 karışım varlığında yapılan deneylerde ise Amygdalin eş zamanlı uygulamada, yalnızca 3 saatlik muamele süresinde SF'nin önemli oranda artırdığı kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişim frekanslarını önemli düzeyde azaltmaya yeterli gelmiştir. Bunun nedeni muhtemelen Amygdalin'in, karaciğer mikrozomal enzim P450 tarafından gerçekleştirilen siklofosamidin metabolik aktivasyonunu önlemesi olabilir. Birçok çalışma antioksidan fitobileşiklerin kanserojenleri biyoaktif hale getiren Faz I enzimlerinin inhibisyonu veya glutatyon S-transferaz (GST) gibi kanserojenleri daha fazla atılabilir formlara metabolize eden Faz II enzimlerinin indüksiyonu yoluyla detoksifikasyonu teşvik ettiğini bildirmiştir (Bacon ve diğerleri, 2012; James ve diğerleri, 2012; Liskova ve diğerleri, 2020; Razis, De Nicola, Pagnotta, Iori ve Ioannides, 2012). Diğer taraftan, comet testi sonuçları da, tüm muamele protokollerinde (ön, eş ve geç zamanlı muamele) oksidan bir ajan olan H_2O_2 'in artırdığı DNA hasarını azalttığını göstermektedir. Hem MMC hem de SF alkilleyici kemoterapi ajanları olmalarına rağmen genotoksik etkilerini sadece DNA alkilasyonu aracılığıyla değil aynı zamanda da hücre içi antioksidan enzimleri baskılayarak (SOD, GSH ve katalaz gibi) ve reaktif oksijen türleri üreterek oksidatif ataklar aracılığıyla da göstermektedirler. Bu doğrultuda bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile Amygdalin'in antioksidan etkilerinin araştırıldığı literatür verileri birbiri desteklemekle birlikte, Amygdalin'in, MMC, SF ve H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif hasarlara karşı DNA yapısında koruyucu bir etkiye ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu doğrulayabilir niteliktedir. Bu nedenle Amygdalin'in hücreleri kromozom ve DNA hasarından korumadaki diğer bir mekanizmanın genotoksik ajanların neden olduğu toksik elektrofil/nükleofil ara ürünlerin süpürülmesi veya hücre içi antioksidan seviyesinin artırılması olabilir. Amygdalin enzimatik veya enzimatik olmayan yolla metabolize olurken, salınan glikozun hücrenin antioksidan mekanizmalarını bir dereceye kadar uyaran ilk bileşik olduğu tahmin edilmektedir (Ceriello, Russo, Amstad ve Cerutti, 1996; Ďuračka ve diğerleri ve 2016; Ruiz-Roca, Navarro ve Seiquer, 2008). Amygdalin'de glikoz bulunması sayesinde bu molekülün

düşük konsantrasyonlarda hücre koruyucu etkiler gösterebildiği düşünülebilir (Heikkila ve Cabbatt, 1980).

Sonuç olarak, Amygdalin'in ön ve eş zamanlı muamelelerdeki antigenotoksik aktivitesinin desmutajenik hareket mekanizması aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Amygdalin, genotoksik ajanların veya bu ajanlara ait metabolik ürünlere doğrudan bağlanmak suretiyle bu genotoksin/mutajenleri inhibe ederek kromozomları ve DNA'yı korumuş olabilir. Ayrıca bu genotoksik ve mutajenik ajanların (MMC, SF ve H₂O₂) neden olduğu oksidatif hasarları da önlemiş ve mutajenlerin aktivasyonunu inaktive eden metabolize edici enzimleri teşvik ederek hareket etmiş olabilir. Amygdalin'in ön ve eş zamanlı bu muamelelerde gözlenen etkisinin hücrelerin antioksidan kapasitesini artırarak veya serbest radikal süpürücü aktivitesi nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

Geç zamanlı muamelede gözlenen antigenotoksik etkisi sebebiyle aynı zamanda Amygdalin'in bir biyoantimutajen gibi davranarak hücre içinde hareket etmek suretiyle genotoksik etkilerin (mutasyonların) kalıcı hale gelmesini önleyebildiği, hatta DNA tamiri veya replikasyon sürecine müdahale ederek hareket ettiği düşünülebilir. Bu nedenle, Amygdalin'in geç zamanlı muameledeki iyileştirici etkisi reaktif oksijen türlerini süpürme ve antioksidan enzim aktivasyonunun yanı sıra DNA tamir mekanizmalarının uyarılması gibi mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıktığı ifade edilebilir. Genel olarak, Amygdalin'in bu olumlu etkilerinin serbest radikal süpürücü aktivitesinin yanında antioksidan enzimler ve diğer detoksifiye enzimleri stimule etmesi sonucu ortaya çıkmış olabileceği ön görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, teşhis ve tedavideki yer alan pek çok seçeneğe rağmen insidansı gün geçtikçe artan ve ne yazıkki sağ kalım oranı düşük bir hastalık grubu haline gelmiştir. Bugün kanserin başlamasında (inisiyasyon), gelişimi (promosyon) ve ilerlemesinde büyük ölçüde genotoksik ajanların etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kanser hastalığı artık beslenme ve bazı davranışsal riskleri içeren yaygın bir yaşam tarzı hastalığı olarak kabul görmektedir. Kanser tedavisinde yer alan konvansiyonel yöntemler hastalığı tedavi etmede yeterli başarı sergilememektedir. Bu yöntemler arasında en sık tercih edileni sitotoksik ve genotoksik ajanların kullanımını içeren kemoterapidir. Bu metot hastalarda birçok yan etkiye sebep olmakta hatta sadece kanser hücrelerine değil aynı zamanda normal ve sağlıklı hücrelere de hasar verdiği için süreç içerisinde ikincil tümör gelişimlerini teşvik edebilmektedir. Bu nedenle belkide sayıları tahmin edilemeyen boyuta ulaşan pekçok kanser hastası, özellikle bitkisel kürlerin yer aldığı tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemlerini konvansiyonel tıp yöntemlerinin ortaya çıkardığı yan etkilerden kurtulmak ve/veya hastalığı tedavi etmek amacıyla konvensiyol tıp ile birlikte veya konvansiyonel tıbbın yerine kullanmaya başlamıştır. Bu trajik durumların üstesinden gelebilmek için birçok araştırmacı kolay ulaşılabilirliği, doğal olmaları, insan diyetinde yer almaları, düşük toksik etkileri, sayısız farmakolojik aktiviteleri ve eski çağlardan beri farklı hastalıkların tedavisinde kullanılıyor olmaları dolayısıyla yeni anti-kanser ajanları olarak sekonder bitki metabolitlerine yönelmişlerdir.

Doğal fitobileşiklerle yapılan birçok pre-klinik çalışmalarda bu bileşiklerin karsinogenezin tüm aşamalarına müdahale ederek neoplazi gelişimini tersine çevirebilen, baskılayabilen veya önleyebilen kemopreventif etkilere sahip oldukları ispatlanmıştır. Buna göre doğal kemopreventif ajanların etkilerini iki ana mekanizma ile gösterdikleri bildirilmiştir. Bunlardan ilki birincil (anti-inisiyasyon) kemoprevensiyon süreci içerisinde yer alan, ilaç metabolizmasında görev alan faz I enzimlerinin inhibisyonu ve detoksifikasyon enzimlerinin indüklenmesi (faz II enzimleri) veya serbest radikallerin/kanserojenlerin süpürülmesi ve DNA tamirinin başlatılmasıdır. Bu aşamada etkinlik gösteren bileşikler bloke edici ajanlar olarak isimlendirilir. İkincil (anti-promosyon ve anti-progresyon) kemoprevensiyonda ise hücre döğüsünün durdurulması ve/veya yavaşlatılması, apoptoz indüksiyonu gibi neoplastik gelişime (promosyon) ve ilerlemeye (progresyon) müdahale söz konusudur. Bu süreçte etkili olan bileşikler ise baskılayıcı ajanlar olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanizmaların

anlaşılması doğal fitobileşiklerin yeni anti-kanser ilaçları geliştirmede umut verici ajanlar olabileceklerini açığa çıkarmıştır. Bu nedenle bu doğal fitobileşiklerin mutajenik/antimutajenik, genotoksik/antigenotoksik ve karsinojenik/antikarsinojenik etkilerini analiz ederek, bunları tanımlamak ve sınıflandırmak terapötik adayları saptamada yaygın bir strateji olmuştur.

Amygdalin bitkiler tarafından üretilen ve doğada yaygın olarak bulunan bir bitki ikincil metabolittir. Bu ana ve kapsamlı grup içersinde siyanojenik glikozitler grubuna dahil olan Amygdalin birçok bitki tohumunda yer almakta ve insanlar tarafında tüketilmektedir. Normalde toksik bir bileşik olmayan Amygdalin'in metabolizması, uygulanma şekine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Oral olarak uygulanan Amygdalin gastrointestinal sistemde bakteriyel β -glikozidaz enzimlerin hareketi altında önce prunasine son ürün olarak hidrojen siyanüre dönüşmektedir. Bununla birlikte, Amygdalin'in intravenöz olarak uygulanması sonucunda gastrointestinal sistemdeki bozunmanın atladığı ve siyanür oluşmadığı bildirilmiştir. Ancak, tümör hücrelerindeki β -glikozidaz aktivitesinin normal hücrelere oranla son derece yüksek olduğunun düşünülmesi Amygdalin'in tümör hücrelerinde seçici siyanür zehirlenmesi ile normal hücrelere zarar vermeden yalnızca tümör hücrelerini öldürebileceği yaklaşımını ortaya çıkarmıştır. Gerçektende son yıllarda çeşitli kanser hücreleriyle yapılan araştırmalar Amygdalin'in normal hücrelere zarar vermediğini ancak kanser hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik yanıtları teşvik ettiğini ortaya çıkarmıştır. Bu kemopreventif aktivitesi Amygdalin'i olumlu bir antikanser ajanı haline getirse de, son ürün olarak zehirli siyanür oluşumu güvenilirliği ve güvenliği hususunda tereddüt yaratmaktadır.

Amygdalin'in yarısentetik formu olan Laetrile geçmişte uzun yıllar anti-kanser ilacı olarak kullanılmış, daha sonra Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilaç olarak kullanılamayan toksik ürün olarak yasaklanmıştır. Buna rağmen, Amygdalin Kuzey Avrupa ve Meksika'da antikanser tedavisi için üretilmekte ve uygulanmaya devam edildiği bildirilmiştir. Ayrıca, bugün Amygdalin alternatif tıpta halen kanser başta olmak üzere migren, astım, bronşit, amfizem, cüzzam, diyabet ve vitiligo gibi hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda tamamlayıcı ve alternatif tıba olan ilginin giderek arttığı göz önüne alınacak olursa, internet promosyonu ve pazarlamasıyla yönlendirilen Amygdalin (vitamin B17) ürünü ve bu ürünü tüketenlerin sayısı belirsizdir. Son zamanlarda umut verici bir anti-kanser ajanı haline gelen Amygdalin üzerine yapılan

alışmalar halen yetersizdir. Amygdalin uzun yıllar anti-kanser tedavisinde kullanılmasına rağmen farmasötiklerin kullanımına ilişkin yapılması zorunlu olan ulaşılabilir genotoksisite çalışması bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında insan lenfosit kültüründe metabolik aktivatör yokluğunda ve varlığında (S9 karışım) Amygdalin ve metabolitlerinin genotoksik olmadığı ve MMC ve SF gibi alkilleyici antinoplastik ilaçların yanı sıra güçlü bir DNA oksitleyici ajan olan H₂O₂'in neden olduğu genetik hasarlara karşı koruyucu ve onarıcı bir etki sergilediği belirlenmiştir. Antigenotoksik etki neredeyse tüm deneylerde ve muamele tiplerinde gözlenmiştir. Bu nedenle Amygdalin'in hem desmutajenik hem de biyoantimutajenik hareket mekanizmaları aracılığıyla etki gösterdiğine inanılmaktadır. Bu bağlamda, Amygdalin genotoksik bileşiklerin neden olduğu elektrofil ve nükleofilleri (ROT/RNT vb.) süpürerek, hücre içerisindeki enzimatik antioksidanların seviyelerini düzenleyerek, DNA tamirini artırarak ve belkide faz I metabolize enzimlerini inhibe ederek veya faz II detoksifikasyon enzimlerini indükleyerek antigenotoksik bir etki sergilediği öne sürülebilir. Bu bakımdan Amygdalin'in birincil kemoprevensiyon mekanizmalarını kullanarak hareket eden bir bloke edici ajan olduğu söylenebilir. Ayrıca Amygdalin'in anti-kanser etkilerinin incelendiği pek çok araştırmada, Amygdalin'in kanser hücrelerinde apoptotik, sitotoksik ve hücre döngüsünü durdurma/yavaşlatma gibi etkileri olduğu belirlenmiştir. Aslında literatürde yer alan bu çalışmalara dayanarak Amygdalin'in ikincil kemoprevensiyon mekanizmalarını da kullanabilen bir baskılayıcı ajan olarak etki, gösterdiği de söylenebilir. Bu bağlamda literatürde yapılan çalışmalar ile bu tez çalışmasının sonuçları birbirini destekler niteliktedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, ilk kez gerçekleştirilmiş oluşu ve literatürde yer alan boşluğu kapatması bakımından önemli ve umut vericidir. Çünkü Amygdalin'in genotoksik, antigenotoksik ve kemopreventif aktivitesi bakımından önemli veriler barındırmaktadır. Amygdalin'in özellikle uygulama metoduna (oral/intravenöz gibi) ilişkin optimal dozunun belirlenerek en önemlisi diğer anti-tümör ilaçları ile beraber kullanımının uygulanabilirliği bakımından daha ileri araştırmalarla incelenmesi gerekmektedir. Farmakolojik ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için daha fazla *in vitro* ve özellikle *in vivo* alışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- Abbas, T., Keaton, M. A., and Dutta, A. (2013). Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), 1-18.
- Abboud, M. M., Al Awaida, W., Alkhateeb, H. H., and Abu-Ayyad, A. N. (2019). Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress. *Nutrition and Cancer*, 71(3), 483-490.
- Abdella, E. M. (2012). Short-term comparative study of the cyclophosphamide genotoxicity administered free and liposome-encapsulated in mice. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 5(2), 51-60.
- Abreu, I. A., and Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 263-274.
- Adewusi, S. R. A., and Oke, O. L. (1985). On the metabolism of amygdalin. 1. The LD50 and biochemical changes in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 63(9), 1080-1083.
- Afzal, M., Kazmi, I., Alharbi, K. S., Quazi, A. M., Nadeem, M. S., Alotaibi, N. H., Nabil, A., Anwar, K. A. F., Alenezic, S. K and Al-Sanea, M. M. (2020). Genotoxic potential of a novel PDE-4B inhibitor Apremilast by chromosomal aberration and micronucleus assay in mice. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(5), 615-620.
- Ahmed, S. A., and Hidayat, H. J. (2020). Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident of female breast cancer patients in Iraq. *Annals of Tropical Medicine and Health*, 23, 23-1014.
- Akintonwa, A., Tunwashe, O., and Onifade, A. (1994). Fatal and non-fatal acute poisoning attributed to cassava-based meal. *Acta Horticulturae*, 375, 285-288.
- Akram, M., Hamid, A., Khalil, A., Ghaffar, A., Tayyaba, N., Saeed, A., Ali, M., and Naveed, A. (2014). Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(3), 313-319.
- Akyıl, D., Konuk, M., Eren, Y., Liman, R., and Sağlam, E. (2017). Mutagenic and genotoxic effects of Anilofos with micronucleus, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and Ames test. *Cytotechnology*, 69(6), 865-874.
- Akyıldız, B. N., Kurtoğlu, S., Kondolot, M., and Tunç, A. (2010). Cyanide poisoning caused by ingestion of apricot seeds. *Annals of Tropical Paediatrics*, 30(1), 39-43.
- Albabbain, H., Alwhaibi, M., Alburaikan, K., and Asiri, Y. (2018). Quality of life and complementary and alternative medicine use among women with breast cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(3), 416-421.

- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajang, A. T., Norppah, H., Hukeri, D. E. G., Ticej, R., Waters, M. D., and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172.
- Albogami, S., and Alnefaie, A. (2021). Role of amygdalin in blocking DNA replication in breast cancer *in vitro*. *Current Pharmaceutical Biotechnology Abstracts*.
- Albogami, S., Hassan, A., Ahmed, N., Alnefaie, A., Alattas, A., Alquthami, L., and Alharbi, A. (2020). Evaluation of the effective dose of amygdalin for the improvement of antioxidant gene expression and suppression of oxidative damage in mice. *PeerJ*, 8, 1-20.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8), 2281-2285.
- Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., and Selby, P. B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 330(1-2), 115-181.
- Angelieri, F., Yujra, V. Q., Oshima, C. T. F., and Ribeiro, D. A. (2017). Do dental x-rays induce genotoxicity and cytotoxicity in oral mucosa cells? a critical review. *Anticancer Research*, 37(10), 5383-5388.
- Arshi, A., Hosseini, S. M., Hosseini, F. S. K., Amiri, Z. Y., Hosseini, F. S., Lavasani, M. S., Kerdarian, H., and Dehkordi, M. S. (2019). The anti-cancer effect of amygdalin on human cancer cell lines. *Molecular biology Reports*, 46(2), 2059-2066.
- Arumugam, N., Sivakumar, V., Thanisslass, J., and Devaraj, H. (1997). Effects of acrolein on rat liver antioxidant defense system. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35(12), 1373-1374.
- Ashraf, R., Sultana, B., Yaqoob, S., and Iqbal, M. (2017). Allelochemicals and crop management: a review. *Current Science*, 3(1), 1-13.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran E. Ş., ve Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Attia, S. M. (2012). Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 741(1-2), 22-31.
- Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., and Ünal, F. (2020). *In vitro* genotoxicity assessment of monopotassium glutamate and magnesium diglutamate. *Toxicology in Vitro*, 65, 1-7.

- Awad, A., and Stüve, O. (2009). Cyclophosphamide in multiple sclerosis: scientific rationale, history and novel treatment paradigms. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2(6), 357-368.
- Azab, M., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., Hawamdeh, H., Quttina, M., and Nassar, L. (2017). Assessment of genotoxicity of pyrethrin in cultured human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(3), 251-255.
- Azqueta, A., and Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949-968.
- Azqueta, A., Ladeira, C., Giovannelli, L., Boutet-Robinet, E., Bonassi, S., Neri, M., Gajski, G., Duthie, D., Del Bo, C., Riso, P., Koppen, G., Basaran, N., Collins, A., and Møller, P. (2020). Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 1-20
- Bacon, J. R., Williamson, G., Garner, R. C., Lappin, G., Langouët, S., and Bao, Y. (2003). Sulforaphane and quercetin modulate PhIP–DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis*, 24(12), 1903-1911.
- Ballarini, F., and Carante, M. P. (2016). Chromosome aberrations and cell death by ionizing radiation: Evolution of a biophysical model. *Radiation Physics and Chemistry*, 128, 18-25.
- Barcelos, G. R., Grotto, D., Angeli, J. P. F., Serpeloni, J. M., Rocha, B. A., Bastos, J. K., and Barbosa Jr, F. (2011). Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. *Phytotherapy Research*, 25(9), 1381-1388.
- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., and Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213-1224.
- Baroni, A., Paoletti, I., Greco, R., Satriano, R. A., Ruocco, E., Tufano, M. A., and Perez, J. J. (2005). Immunomodulatory effects of a set of amygdalin analogues on human keratinocyte cells. *Experimental Dermatology*, 14(11), 854-859.
- Bartsch, H., and Malaveille, C. (1989). Prevalence of genotoxic chemicals among animal and human carcinogens evaluated in the IARC Monograph Series. *Cell Biology and Toxicology*, 5(2), 115-127.
- Basu, T. K. (1983). High-dose ascorbic acid decreases detoxification of cyanide derived from amygdalin (laetrile): studies in guinea pigs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(11), 1426-1430.
- Begas, P., Liedgens, L., Moseler, A., Meyer, A. J., and Deponte, M. (2017). Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nature Communications*, 8(1), 1-13.

- Behravan, J., Mosafa, F., Soudmand, N., Taghiabadi, E., Razavi, B. M., and Karimi, G. (2011). Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. aerial parts on H₂O₂-induced DNA damage in lymphocytes by comet assay. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 4(3), 193-197.
- Benhusein, G. M., Mutch, E., Aburawi, S. and Williams, F. M. (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*, 5(1), 4637-4643.
- Bhattacharya, R., and Rao, P. L. (1997). Cyanide induced DNA fragmentation in mammalian cell cultures. *Toxicology*, 123(3), 207-215.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., and Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329-354.
- Bignold, L. P. (2009). Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2-3), 271-298.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Bitting, T. H. (1978). Drugs—Federal drug Administration ban on Laetrile treatments for terminally ill cancer patients is arbitrary and capricious. *Tulsa Law Journal*, 14, 222–225.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661-673.
- Blaheta, R. A., Nelson, K., Haferkamp, A., and Juengel, E. (2016). Amygdalin, quackery or cure?. *Phytomedicine*, 23(4), 367-376.
- Bolarinwa, I. F., Oke, M. O., Olaniyan, S. A., and Ajala, A. S. (2016). A review of cyanogenic glycosides in edible plants. In S. Soloneski and M. L. Larramendy (Eds.), *Toxicology-new aspects to this scientific conundrum*. InTech, Croatia: Rijeka, 179-191.
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., and Morgan, M. R. (2014). Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry*, 152, 133-139.
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., and Morgan, M. R. (2015). Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry*, 170, 437-442.
- Bolognesi, C., Bonassi, S., Knasmueller, S., Fenech, M., Bruzzone, M., Lando, C., and Ceppi, M. (2015). Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 20-31.

- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., and Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93-100.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A. H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E, and Norppa, H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60(6), 1619-1625.
- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E., Lazutka, J., Rossner, P., Sram, R. J., and Boffetta, P. (2008). Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, 29(6), 1178-1183.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H., and Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.
- Borges, A., Abreu, A. C., Dias, C., Saavedra, M. J., Borges, F., and Simões, M. (2016). New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*, 21(7), 877-918.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851.
- Bozkurt, G., Abay, E., Ateş, I., Karaboğaz, G., Ture, M., Savran, F. O., Palandüze, S., Temoçin, K., and Algüneş, C. (2004). Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 558(1), 137-144.
- Bromley, J., Hughes, B. G., Leong, D. C., and Buckley, N. A. (2005). Life-threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C. *Annals of Pharmacotherapy*, 39(9), 1566-1569.
- Bucheli, T. D. (2014). Phytotoxins: environmental micropollutants of concern?. *Environmental Science & Technology*, 48(22), 13027-13033.
- Burlinson, B. (2012). The *in vitro* and *in vivo* comet assays. In Parry, J. M., and Parry, E. M. (Eds.) *Genetic toxicology: principles and methods* Springer, NY: Humana Press, 143-163.
- Burns, A. E., Bradbury, J. H., Cavagnaro, T. R., and Gleadow, R. M. (2012). Total cyanide content of cassava food products in Australia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 79-82.

- Burrell, R. A., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M. C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S. M., Gronroos, E., Chew, S. K., Rowan, A. J., Schenk, A., Sheffer, M., Howell, M., Kschischo, M., Behrens, A., Helleday, T., Bartek, J., Tomlinso, I. P., and Swanton, C. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*, 494(7438), 492-496.
- Cai, Y., Li, Y. M., and Zhong, L. (2003). Effect of amygdalin on gastric ulcer in experimental models. *Journal-China Pharmaceutical University*, 34(3), 254-256.
- Carter, J. H., McLafferty, M. A., and Goldman, P. (1980). Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin (laetrile)-induced cyanide toxicity. *Biochemical Pharmacology*, 29(3), 301-304.
- Cartus, A., and Schrenk, D. (2017). Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 574-582.
- Çelik, M. ve Yıldırım, M. (2017). Amigdalın ve Özellikleri. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6(1), 28-37.
- Çelik, S. A. ve Ayran, İ. (2020). Antioksidan kaynağı olarak bazı tıbbi ve aromatik bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 13(2), 115-125.
- Ceriello, A., Russo, P., Amstad, P., and Cerutti, P. (1996). High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture: evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*, 45(4), 471-477.
- Chacón, C. F., González, E. C. L., and Poletta, G. L. (2021). Biomarkers of geno-and cytotoxicity in the native broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*): Chromosomal aberrations and mitotic index. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 867, 1-6.
- Chahar, A., Chahar, N., Kabirai, A., and Gupta, J. (2020). Chemical carcinogenesis: a brief review on mechanism & metabolism. *Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology*, 6(3), 120-124.
- Chandler, R. F., Anderson, L. A., and Phillipson, J. D. (1984). Laetrile in perspective. *Canadian Pharmacists Journal*, 117(11), 517-520.
- Chang, H. K., Shin, M. S., Yang, H. Y., Lee, J. W., Kim, Y. S., Lee, M. H., Kim, J., Kim, K. H., and Kim, C. J. (2006). Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(8), 1597-1602.
- Chaouali, N., Gana, I., Dorra, A., Khelifi, F., Nouioui, A., Masri, W., Belwaer, I., Ghorbel, H., and Hedhili, A. (2013). Potential toxic levels of cyanide in almonds (*Prunus amygdalus*), apricot kernels (*Prunus armeniaca*), and almond syrup. *International Scholarly Research Notices Toxicology*, 1-6.

- Chen, H., Singh, H., Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Khatri, M., Kim, K. H., and Peng, W. (2020). An exploration on the toxicity mechanisms of phytotoxins and their potential utilities. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-41.
- Chen, J., Hu, Y., Mou, X., Wang, H., and Xie, Z. (2021). Amygdalin alleviates renal injury by suppressing inflammation, oxidative stress and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 265, 1-10.
- Chen, Y., Ma, J., Wang, F., Hu, J., Cui, A., Wei, C., Yang, Q., and Li, F. (2013). Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35(1), 43-51.
- Cheng, Y., Yang, C., Zhao, J., Tse, H. F., and Rong, J. (2015). Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neuritogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(2), 146-154.
- Chitnis, M. P., Adwankar, M. K., and Amonkar, A. J. (1985). Studies on high-dose chemotherapy of amygdalin in murine P388 lymphocytic leukaemia and P815 mast cell leukaemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 109(3), 208-209.
- Chitrangi, S., Nair, P., and Khanna, A. (2017). 3D engineered *in vitro* hepatospheroids for studying drug toxicity and metabolism. *Toxicology in Vitro*, 38, 8-18.
- Clark, I. A., Cowden, W. B., and Hunt, N. H. (1985). Free radical-induced pathology. *Medicinal Research Reviews*, 5(3), 297-332.
- Clifford, D. P., and Repine, J. E. (1982). Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 49(3), 143-149.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., and Bonassi, S. (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 759, 27-39.
- CONTAM (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., Del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Vleminckx, C., Wallace, H., Benford, D., Brimer, L., Mancini, F. R., Metzler, M., Viviani, B., Altieri, A., Arcella, D., Steinkellner, H., and Schwerdtle, T. (2019). Evaluation of the health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in foods other than raw apricot kernels. *EFSA Journal*, 17(4), 5662-5740.
- Cordelli, E., Bignami, M., and Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10 (1), 68-78.
- Cox, J. A., Fellows, M. D., Hashizume, T., and White, P. A. (2016). The utility of metabolic activation mixtures containing human hepatic post-mitochondrial supernatant (S9) for *in vitro* genetic toxicity assessment. *Mutagenesis*, 31(2), 117-130.

- Cressey, P., and Reeve, J. (2019). Metabolism of cyanogenic glycosides: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 225-232.
- Curlej, J., Halenar, M., Kolesarova, A., Curlejova, E., and Chrenek, P. (2016). Effect of amygdalin on aneuploidy incidence in rabbit. *Slovak Journal of Animal Science*, 49(3), 99-103.
- Curran, W. J. (1980). Laetrile for the terminally ill: supreme court stops the nonsense. *The New England Journal of Medicine*, 302, 619-621.
- David, R. (2020). The promise of toxicogenomics for genetic toxicology: past, present and future. *Mutagenesis*, 35(2), 153-159.
- Davignon, J. P., Trissel, L. A., and Kleinman, L. M. (1978). Pharmaceutical assessment of amygdalin (Laetrile) products. *Cancer Treatment Reports*, 62(1), 99-104.
- De Flora, S. (1981). Study of 106 organic and inorganic compounds in the Salmonella/microsome test. *Carcinogenesis*, 2(4), 283-298.
- De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 151-158.
- De Flora, S., and Ferguson, L. R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 8-15.
- De Flora, S., and Ramel, C. (1988). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 202(2), 285-306.
- Deng, P., Cui, B., Zhu, H., Phommakoun, B., Zhang, D., Li, Y., Zhao, F., and Zhao, Z. (2021). Accumulation pattern of amygdalin and prunasin and its correlation with fruit and kernel agronomic characteristics during apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel development. *Foods*, 10(2), 397-416.
- Dhillon, V. S., Deo, P., Bonassi, S., and Fenech, M. (2021). Lymphocyte micronuclei frequencies in skin, haematological, prostate, colorectal and esophageal cancer cases: a systematic review and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 1-10.
- Dhillon, V. S., Thomas, P., Iarmarcovai, G., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., and Fenech, M. (2011). Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 33-42.
- Di Mauro, M. D., Ferrito, V., Scifo, C., Renis, M., and Tomasello, B. (2017). Effectiveness of natural compounds on DNA damage in *Coris julis* (Linnaeus 1758) from a polluted marine area. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(6), 228.

- Di Stasi, L. C., Oliveira, G. P., Carvalhaes, M. A., Queiroz-Junior, M., Tien, O. S., Kakinami, S. H., and Reis, M. S. (2002). Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, 73(1), 69-91.
- DiGiovanni, J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics*, 54(1), 63-128.
- Doak, S. H., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., and Singh, N. (2012). *In vitro* genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1), 104-111.
- Doğan, B., Abuaf, Ö. K., ve Karabacak, E. (2012). Tamamlayıcı/Alternatif Tıp ve Dermatoloji. *Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi*, 46(2), 62-66.
- Doğan, Ğ., Yar, A. S., Ergin, V., Menevşe, S., Menevşe, A., ve Ekmekçi, A. (2013). L929 Fibroblast Hücre Hattında Topoizomeraz İnhibisyonunun DNA Onarımı ve Apoptozis Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 38(2), 229-237.
- Doğru, H. Y., İşgüder, Ç. K., Arıcı, A., Özsoy, A. Z., Delibaş, İ. B., and Çakmak, B. (2017). Effect of amygdalin on the treatment and recurrence of endometriosis in an experimental rat study. *Periodicum Biologorum*, 119(3), 173-180.
- Dorr, R. T., and Paxinos, J. (1978). The current status of laetrile. *Annals of Internal Medicine*, 89(3), 389-397.
- Drevet, J. R. and Aitken, R. J. (2020). Oxidation of sperm nucleus in mammals: a physiological necessity to some extent with adverse impacts on oocyte and offspring. *Antioxidants*, 9(2), 95-104.
- Dumontet, C., Drai, J., Thieblemont, C., Hequet, O., Espinouse, D., Bouafia, F., Salles, G., Coiffier, B. (2001). The superoxide dismutase content in erythrocytes predicts short-term toxicity of high-dose cyclophosphamide. *British Journal of Haematology*, 112(2), 405-409.
- Đuračka, M., Tvrdá, E., Halenár, M., Zbyňovská, K., Kolesár, E., Lukáč, N., and Kolesárová, A. (2016). The impact of amygdalin on the oxidative profile of rabbit testicular tissue. *Mendelnet*, 770-775.
- Durante, M., Bedford, J. S., Chen, D. J., Conrad, S., Cornforth, M. N., Natarajan, A. T., Gent, D. C. V. and Obe, G. (2013). From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 756(1-2), 5-13.
- Düzen, K. Ö. ve Korkmaz, M. (2015). Kanser Hastalarında, Semptom Kontrolü ve Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Kullanımı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*, 8(2), 67-76.

- Elangovan, N., Chiou, T. J., Tzeng, W. F., and Chu, S. T. (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*, 222(1-2), 60-70.
- El-Desouky, M. A., Fahmi, A. A., Abdelkader, I. Y., and Nasraddin, K. M. (2020). Anticancer effect of amygdalin (vitamin B-17) on hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) in the presence and absence of zinc. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 20(4), 486-494.
- Ellison, N. M., Byar, D. P., and Newell, G. R. (1978). Special report on laetrile: the NCI laetrile review: results of the national cancer institute's retrospective laetrile analysis. *New England Journal of Medicine*, 299(10), 549-552.
- Elmas, O., ve Elmas, S. (2020). Eritrositlerde oksidatif stres oluşumunda rol oynayan özgül mekanizmalar ve koruyucu antioksidan sistemler. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi*, 7(3), 170-179.
- El-Masry, T. A., Al-Shaalan, N. H., Tousson, E., Buabeid, M., and Alyousef, A. M. (2019). The therapeutic and antineoplastic effects of vitamin B17 against the growth of solid-form ehrlich tumours and the associated changes in oxidative stress, DNA damage, apoptosis and proliferation in mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(6), 2801-2810.
- El-Masry, T., Al-Shaalan, N., Tousson, E., Buabeid, M., and Al-Ghadeer, A. (2020). Potential therapy of vitamin B17 against ehrlich solid tumor induced changes in interferon gamma, nuclear factor kappa B, DNA fragmentation, p53, Bcl2, survivin, VEGF and TNF- α expressions in mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(1), 393-401.
- Elsaed, W. M. (2019). Amygdalin (vitamin B17) pretreatment attenuates experimentally induced acute autoimmune hepatitis through reduction of CD4⁺ cell infiltration. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 224, 124-132.
- Enciso, J. M., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Olsen, A. K., López de Cerain, A., and Azqueta, A. (2018). Standardisation of the *in vitro* comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. *Mutagenesis*, 33(1), 25-30.
- Epel, D. (1963). The effects of carbon monoxide inhibition on ATP level and the rate of mitosis in the sea urchin egg. *The Journal of Cell Biology*, 17(2), 315-319.
- Erkurt, M. A., Kuku, İ., Kaya, E., ve Aydoğdu, İ. (2009). Kanser kemoterapisi ve böbrek. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 16(1), 63-68.
- European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee. (2011). Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 2379.

- Evans, H. J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Amsterdam, Elsevier Sciences, 405–427.
- FAO/WHO (Food and Agricultural Organization & World Health Organization). (2012). Safety evaluation of certain food additives and contaminants prepared by the seventy-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Food Additives Series*, 65, 1–833.
- Farber, E., and Cameron, R. (1980). The sequential analysis of cancer development. *Advances in Cancer Research*, 31, 125–226.
- Farooq, N., Abbas, T., Tanveer, A., and Jabran, K. (2020). Allelopathy for weed management. In J. M. Merillon and K. Ramawat (Eds.), *Co-evolution of secondary metabolites*. Springer, Switzerland, 505–519.
- Farshori, N. N., Saquib, Q., Siddiqui, M. A., Al-Oqail, M. M., Al-Sheddi, E. S., Al-Massarani, S. M., and Al-Khedhairi, A. A. (2021). Protective effects of *Nigella sativa* extract against H₂O₂-induced cell death through the inhibition of DNA damage and cell cycle arrest in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Journal of Applied Toxicology*, 41(5), 820–831.
- Femenia, A., Rossello, C., Mulet, A., and Canellas, J. (1995). Chemical composition of bitter and sweet apricot kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 356–361.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81–95.
- Fenech, M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physics*, 98(2), 234–243.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., and Brown, S. (1999). Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 14(6), 605–612.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Rossnerova, A., Sram, R., Romm, H., Bolognesi, C., Ramakumar, A., Soussaline, F., Schunck, C., Elhajouji, A., Anwar, W., and Bonassi, S. (2013). HUMN project initiative and review of validation, quality control and prospects for further development of automated micronucleus assays using image cytometry systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(5), 541–552.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Holland, N., Bonassi, S., and Kirsch-Volders, M. (2020). Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 786, 108342.

- Fenselau, C., Pallante, S., Batzinger, R. P., Benson, W. R., Barron, R. P., Sheinin, E. B., and Maienthal, M. (1977). Mandelonitrile beta-glucuronide: synthesis and characterization. *Science*, 198(4317), 625-627.
- Ferguson, L. R., Bronzetti, G., and De Flora, S. (2005). Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 3-7.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Freese, A., Brady, R. O., and Gal, A. E. (1980). A β -glucosidase in feline kidney that hydrolyzes amygdalin (Laetrile). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(2), 363-368.
- George, V. C., Dellaire, G., and Rupasinghe, H. V. (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45, 1-14.
- Ghebretinsae, A. H., Faes, C., Molenberghs, G., De Boeck, M., and Geys, H. (2013). A Bayesian, generalized frailty model for comet assays. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 23(3), 618-636.
- Ghoshal, N., Sharma, S., Banerjee, A., Kurkalang, S., Raghavan, S. C., and Chatterjee, A. (2017). Influence of reduced glutathione on end-joining of DNA double-strand breaks: cytogenetical and molecular approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 795, 1-9.
- Gostissa, M., Alt, F. W., and Chiarle, R. (2011). Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 29, 319-350.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Guengerich, F. P. (1997). Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions*, 106(3), 161-182.
- Guengerich, F. P. (2000). Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 21(3), 345-351.
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J. F., Siddiqui, K. S., Hernández-Sotomayor, S. M. T., and Faisal, M. (2018). Production of plant secondary metabolites: examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309.
- Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M., and Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2227-2238.

- Gündoğan, K., Dönmez-Altuntaş, H., Hamurcu, Z., Akbudak, I. H., Sungur, M., Bitgen, N., Başkol, G., and Bayram, F. (2018). Evaluation of chromosomal DNA damage, cytotoxicity, cytostasis, oxidative DNA damage and their relationship with endocrine hormones in patients with acute organophosphate poisoning. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 825, 1-7.
- Guo, J. Q., Sheng, M. X., Wang, L. J., Tan, J. M., Wu, W. Z., and Yang, S. L. (2008). Inhibitory effect of amygdalin on human renal fibroblast proliferation. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 12(18), 3575-8.
- Guo, J., Wu, W., Sheng, M., Yang, S., and Tan, J. (2013). Amygdalin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease. *Molecular Medicine Reports*, 7(5), 1453-1457.
- Guo, X., Seo, J. E., Li, X., and Mei, N. (2020). Genetic toxicity assessment using liver cell models: Past, present, and future. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 23(1), 27-50.
- Gupta, P. K. (2020). *Genetic toxicology. in problem solving questions in toxicology: a study guide for the board and other examinations*. Cham: Springer, 129-135
- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., and Clement, M. V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457-465.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., and Reuterwall, C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Research*, 58(18), 4117-4121.
- Hagmar, L., Strömberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E., Lindholm, C., and Norppa, H. (2004). Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Research*, 64(6), 2258-2263.
- Hagmar, L., Strömberg, U., Tinnerberg, H., and Mikoczy, Z. (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204(1), 43-47.
- Halenar, M., Medvedova, M., Maruniakova, N., and Kolesarova, A. (2015). Assessment of a potential preventive ability of amygdalin in mycotoxin-induced ovarian toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(6), 411-416.
- Halenár, M., Medveďová, M., Maruniaková, N., Packová, D., and Kolesárová, A. (2014). Dose-response of porcine ovarian granulosa cells to amygdalin treatment combined with deoxynivalenol. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(1), 77-79.
- Halliwell, B. (1996). Commentary oxidative stress, nutrition and health. experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25(1), 57-74.

- Hamzeh, M., Hosseinimehr, S. J., Khalatbary, A. R., Mohammadi, H. R., Dashti, A., and Amiri, F. T. (2018). Atorvastatin mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity via suppression of oxidative stress and apoptosis in rat model. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(5), 440-449.
- Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H. J., Monien, B., Rietjens, I. M. C. M., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P., and Eisenbrand, G. (2020). Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology*, 94(6), 1787-1877.
- He, X. Y., Wu, L. J., Wang, W. X., Xie, P. J., Chen, Y. H., and Wang, F. (2020). Amygdalin-a pharmacological and toxicological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 254, 1-11.
- Heikkila, R. E., and Cabbat, F. S. (1980). The prevention of alloxan-induced diabetes by amygdalin. *Life Sciences*, 27(8), 659-662.
- Helleday, T. (2010). Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*, 31(6), 955-960.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews: Cancer*, 8(3), 193-204.
- Hellman, B., Vaghef, H., and Boström, B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/DNA Repair*, 336(2), 123-131.
- Hemachandra, C. K., and Pathiratne, A. (2016). Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 54-64.
- Hemminki, K., and Kallama, S. (1986). Reactions of nitrogen mustards with DNA. *IARC Scientific Publications*, (78), 55-70.
- Hemminki, K., Rachakonda, S., Musak, L., Vymetalkova, V., Halasova, E., Försti, A., Vodickova, L., Buchancova, J., Vodicka, P., and Kumar, R. (2014). Telomere length in circulating lymphocytes: Association with chromosomal aberrations. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 54(3), 194-196.
- Herceg, Z., Lambert, M. P., Van Veldhoven, K., Demetriou, C., Vineis, P., Smith, M. T., Straif, K., and Wild, C. P. (2013). Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis*, 34(9), 1955-1967.
- Hernández, L. G., Steeg, H., Luijten, M., and Benthem, J. (2009). Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(2-3), 94-109.

- Herrera, L. A., Tittelbach, H., Gebhart, E., and Ostrosky-Wegman, P. (1991). Changes in the proliferation of human lymphocytes induced by several cytostatics and revealed by the premature chromosome condensation technique. *Mutation Research Letters*, 263(2), 101-106.
- Hidalgo, D., Sanchez, R., Lalaleo, L., Bonfill, M., Corchete, P., and Palazon, J. (2018). Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures. *Current Medicinal Chemistry*, 25(30), 3577-3596.
- Hill, G. J., Shine, T. E., Hill, H. Z., and Miller, C. (1976). Failure of amygdalin to arrest B16 melanoma and BW5147 AKR leukemia. *Cancer Research*, 36(6), 2102-2107.
- Hill, H. Z., Backer, R., and Hill, G. J. (1980). Blood cyanide levels in mice after administration of amygdalin. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 1(4), 211-220.
- Hoffmann, G. R., Shorter, R. A., Quaranta, J. L., and McMaster, P. D. (1999). Two mechanisms of antimutagenicity of the aminothiols cysteamine and WR-1065 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 13(1), 1-9.
- Holzbecher, M. D., Moss, M. A., and Ellenberger, H. A. (1984). The cyanide content of laetrile preparations, apricot, peach and apple seeds. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 22(4), 341-347.
- Huebner, J., Prott, F. J., Micke, O., Muecke, R., Senf, B., Dennert, G., and Muenstedt, K. (2014). Online survey of cancer patients on complementary and alternative medicine. *Oncology Research and Treatment*, 37(6), 304-308.
- Hussain, S. P., Hollstein, M. H., and Harris, C. C. (2000). p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and human risk assessment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 919(1), 79-85.
- Hwang, H. J., Kim, P., Kim, C. J., Lee, H. J., Shim, I., Yin, C. S., Yang, Y., and Hahm, D. H. (2008). Antinociceptive effect of amygdalin isolated from *Prunus armeniaca* on formalin-induced pain in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(8), 1559-1564.
- Ijaz, S., Akhtar, N., Khan, M. S., Hameed, A., Irfan, M., Arshad, M. A., Ali, S., and Asrar, M. (2018). Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1643-1651.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Harmonised Tripartite Guideline (2011). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). *ICH Expert Working Group*, 1-25.
- İnternet: National Centre for Complementary and Integrative Health-NCCIH (2021). Complementary, Alternative, or Integrative Health: What's In a Name?. Web: <https://www.nccih.nih.gov/health/complementary-alternative-or-integrative-health-whats-in-a-name> 27 Haziran 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: Nyirenda, K. K. (2020). Toxicity Potential of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants, In P. Erkekoglu and T. Ogawa, Medical Toxicology. InTechOpen DOI: 10.5772/intechopen.91408. Web: <https://www.intechopen.com/chapters/71290> 16 Nisan 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2021). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788 29 Mayıs 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: PubChem (2021a). Amygdalin'ın kimyasal yapısı ve özellikleri, Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65651620> Nisan 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: PubChem (2021b). Prunasin, Benzaldehit, Mandelonitril ve Siyanür'ün kimyasal yapıları, Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> 20 Nisan 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: PubChem (2021c). Laetrile'ın kimyasal yapısı ve özellikleri, Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5484354> 20 Nisan 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: PubChem (2021d). Hydrogen peroxide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-peroxide#section=Structures> 20 Nisan 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: Sigma-Aldrich (2021a). Amygdalin'ın kimyasal yapısı ve özellikleri, Web: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/a6005?context=product> 21 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: Sigma-Aldrich (2021b). Mitomisin C kimyasal yapısı ve özellikleri, Web: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search/mitomycin-c-from-streptomyces-caespitosus?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=Mitomycin%20C%20from%20Streptomyces%20caespitosus&type=product> 21 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: Sigma-Aldrich (2021c). Siklofosfamid'in kimyasal yapısı ve özellikleri, Web: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/substance/cyclophosphamidemonohydrate279106055192> 21 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

İnternet: World Health Organization (WHO) (2021). Cancer. Web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> 21 Mart 2021 tarihinde alınmıştır.

Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., and Belpomme, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(10), 640-658.

Iriti, M., and Faoro, F. (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3371-3399.

- Isozaki, T., Matano, Y., Yamamoto, K., Kosaka, N., and Tani, T. (2001). Quantitative determination of amygdalin epimers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 923(1-2), 249-254.
- Itoh, S., Hattori, C., Nagata, M., and Sanbuissho, A. (2012). Structural and numerical chromosome aberration inducers in liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(1), 98-103.
- Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., SánchezGutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Sosa-Delgado, S. M., Sumaya-Martínez, M. T., Morales-González, A., Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., and Madrigal-Santillán, E. (2017). Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients*, 9(2), 102-129.
- Jacobs, M. N., Colacci, A., Corvi, R., Vaccari, M., Aguila, M. C., Corvaro, M., Delrue, N., Desaulniers, D., Ertych, N., Jacobs, A., Luijten, M., Madia, F., Nishikawa, A., Ogawa, K., Ohmori, K., Paparella, M., Sharma, A. K., and Vasseur, P. (2020). Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology*, 94(8), 2899-2923.
- Jain A. K., Singh D., Dubey K., Maurya R., Pandey A. K. (2018a). Chromosomal aberrations. In A. Kumar, V. N. Dobrovolsky, A. Dhawan and R. Shanker (Eds.), *Mutagenicity: Assays and Applications*. London. Academic Press, 69-92.
- Jain A. K., Singh D., Dubey K., Maurya R., Mittal S., Pandey A. K. (2018b). Models and Methods for *In Vitro* Toxicity. In A. Dhawan and S. Kwon (Eds.), *In Vitro Toxicology*. London. Academic Press, 45-65.
- Jain, A. K. and Sorbhoy R. K. (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks. *Cytologia*, 53(3), 427-436.
- James, D., Devaraj, S., Bellur, P., Lakkanna, S., Vicini, J., and Boddupalli, S. (2012). Novel concepts of broccoli sulforaphanes and disease: induction of phase II antioxidant and detoxification enzymes by enhanced-glucoraphanin broccoli. *Nutrition Reviews*, 70(11), 654-665.
- Janda, K., Taukin, A., Kałduńska, J., and Jakubczyk, K. (2019). Chemopreventive mechanisms and other properties of glucosinolates. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 64(4), 78-82.
- Jang, J. S., Choi, Y. Y., Lee, W. K., Choi, J. E., Cha, S. I., Kim, Y. J., Kim, J. H., Kam, S., Jung, T. H., and Park, J. Y. (2008). Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer Science*, 99(7), 1385-1389.
- Jaswal, V., Palanivelu, J., and Ramalingam, C. (2018). Effects of the gut microbiota on amygdalin and its use as an anti-cancer therapy: substantial review on the key components involved in altering dose efficacy and toxicity. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14, 125-132.

- Jeelani, R., Khan, S. N., Shaeib, F., Kohan-Ghadr, H. R., Aldhaheeri, S. R., Najafi, T., Thakura, M., Morris, R., and Abu-Soud, H. M. (2017). Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 11-18.
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., and Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), 22.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.
- Jiagang, D., Li, C., Wang, H., Hao, E., Du, Z., Bao, C., Lv, J., and Wang, Y. (2011). Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(3), 523-529.
- Jin, J., Liu, B., Zhang, H., Tian, X., Cai, Y., and Gao, P. (2009). Mutagenicity of chinese traditional medicine semen armeniacae amarum by two modified Ames tests. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 43-51.
- Jones, C. H., Pepper, C., and Baird, D. M. (2012). Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *British Journal of Haematology*, 156(5), 573-587.
- Joseph, L. J., Bhartiya, U. S., Raut, Y. S., Kand, P., Hawaldar, R. W., and Nair, N. (2009). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of thyroid cancer patients after radioiodine therapy and its relationship with metastasis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 675(1-2), 35-40.
- Juengel, E., Thomas, A., Rutz, J., Makarevic, J., Tsaar, I., Nelson, K., Haferkamp, A., and Blaheta, R. A. (2016). Amygdalin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells *in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(2), 526-532.
- Jumaa, A. H. (2018). The cytotoxic effect of vincristine-amygdalin combination on human cervical cancer cell line (Hela cancer cell line). *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*, 9(2), 150-161.
- Kada, T., Inoute, T., and Maniki, M. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. In: Kleokowsky, E.J. (Eds.), *Environmental mutagenesis and plant biology*. Praeger, NewYork, 1013-1025.
- Kafi, L. A., Hussein, S. M., and Jumaa, A. H. (2015). Study the *in vitro* effect of alcoholic extract of Prunus aremasia kernels, methotrexate, amygdalin and the combination between them on Hela cancer cell line. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*, 8(2), 101-108.
- Kakehashi, A., Wei, M., Fukushima, S., and Wanibuchi, H. (2013). Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers*, 5(4), 1332-1354.
- Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.

- Kasali, F. M., Mtewa, A. G., and Tabakam, G. (2021). Poisonous plants as sources of anticancer and other drugs. In A. G. Mtewa, C. Egbuna and G. M. N. Rao (Eds.), *Poisonous plants and phytochemicals in drug discovery*, Wiley, USA: Hoboken, 31-77.
- Keene, M. R., Heslop, I. M., Sabesan, S. S., and Glass, B. D. (2019). Complementary and alternative medicine use in cancer: A systematic review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 35, 33-47.
- Kende, H. (1989). Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology*, 91(1), 1-4.
- Kern, J. C., and Kehrer, J. P. (2002). Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chemico-Biological Interactions*, 139(1), 79-95.
- Khodeer, D. M., Mehanna, E. T., Abushouk, A. I., and Abdel-Daim, M. M. (2020). Protective effects of evening primrose oil against cyclophosphamide-induced biochemical, histopathological, and genotoxic alterations in mice. *Pathogens*, 9(2), 98-110.
- Kirkland, D., Pfuhler, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwelli, P., Hayashij, M., Kasper, P., Kirchnerl, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J. R., Muller, L., Nohynek, G., Parry, J., Parry, E., Thybaud, V., Tice, R., Benthem, J. R., Vanpary, P., and White, P. (2007). How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(1), 31-55.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., and Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 137-148.
- Klaunig, J. E., and Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116-121.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., and Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38(1), 96-109.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., and Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology*, 19(10), 543-555.
- Kligler, B., Maizes, V., Schachter, S., Park, C. M., Gaudet, T., Benn, R., Lee, R. and Remen, R. N. (2004). Core competencies in integrative medicine for medical school curricula: a proposal. *Academic Medicine*, 79(6), 521-531.
- Kocaman, A. Y., and Asfuroğlu, K. (2021). The genotoxic effects of perchloroethylene in human peripheral blood lymphocytes and the possible ameliorative role of α -tocopherol. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

- Koeffler, H. P., Lowe, L., and Golde, D. W. (1980). Amygdalin (laetrile): effect on clonogenic cells from human myeloid leukemia cell lines and normal human marrow. *Cancer Treatment Reports*, 64(1), 105-9.
- Kolesár, E., Halenár, M., Kolesárová, A., and Massányi, P. (2015). Natural plant toxicant—cyanogenic glycoside amygdalin: characteristic, metabolism and the effect on animal reproduction. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(5), 49-50.
- Kolesar, E., Tvrda, E., Halenar, M., Schneidgenova, M., Chrastinova, L., Ondruska, L., Jurcik, R., Kovacik, A., Kovacikova, E., Massanyi, P., and Kolesarova, A. (2018). Assessment of rabbit spermatozoa characteristics after amygdalin and apricot seeds exposure *in vivo*. *Toxicology Reports*, 5, 679-686.
- Komiyama, T., Kikuchi, T., and Sugiura, Y. (1982). Generation of hydroxyl radical by anticancer quinone drugs, carbazilquinone, mitomycin C, aclacinomycin A and adriamycin, in the presence of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochemical Pharmacology*, 31(22), 3651-3656.
- Koo, J. Y., Hwang, E. Y., Cho, S., Lee, J. H., Lee, Y. M., and Hong, S. P. (2005). Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniaca seed by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 814(1), 69-73.
- Koppen, G., De Prins, S., Jacobs, A., Nelen, V., Schoeters, G., and Langie, S. A. (2018). The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. *Mutagenesis*, 33(1), 41-47.
- Kotanoğlu, M. S., Kadioğlu, E., Emerce, E., Kaymak, C., Özcan, A., and Başar, H. (2020). Antioxidant effects of dexmedetomidine against hydrogen peroxide-induced DNA damage *in vitro* by alkaline Comet assay. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(5), 1393-1398.
- Kotecha, R., Takami, A., and Espinoza, J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, 7(32), 52517-52529.
- Kour, J., Ali, M. N., Ganaie, H. A., and Tabassum, N. (2017). Amelioration of the cyclophosphamide induced genotoxic damage in mice by the ethanolic extract of *Equisetum arvense*. *Toxicology Reports*, 4, 226-233.
- Krepler, C., Xiao, M., Sproesser, K., Brafford, P. A., Shannan, B., Beqiri, M., Liu, Q., Xu, W., Garman, B., Nathanson, K. I., Xu, X., Karakousis, G. C., Mills, G. B., Lu, Y., Ahmed, T. A., Poulikakos, P. I., Caponigro, G., Boehm, M., Peters, M., Schuchter, L. M., Weeraratna, A. T., and Herlyn, M. (2016). Personalized preclinical trials in BRAF inhibitor-resistant patient-derived xenograft models identify second-line combination therapies. *Clinical Cancer Research*, 22(7), 1592-1602.
- Krishna, M. C., DeGraff, W., Tamura, S., Gonzalez, F. J., Samuni, A., Russo, A., and Mitchell, J. B. (1991). Mechanisms of hypoxic and aerobic cytotoxicity of mitomycin C in Chinese hamster V79 cells. *Cancer Research*, 51(24), 6622-6628.

- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., and Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 193-201.
- Ku, W. W., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, P. J., Hakura, A., Honma, M., Martus, H. J., Obach, S., and Roberts, S. (2007). Strategy for genotoxicity testing—metabolic considerations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), 59-77.
- Kumar, S., Vishwakarma, V., Yadav, B., Gupta, R., Aggarwal, N., and Yadav, A. (2020). Antigenotoxic Effects of Epigallocatechin Gallate against Hair Dye Induced Genotoxicity in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 10(2), 141-152.
- Kuo, C. C., Chen, H. H., and Chiang, W. (2012). Adlay (薏苡 yì yǐ; “soft-shelled job's tears”; the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) is a potential cancer chemopreventive agent toward multistage carcinogenesis processes. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(4), 267-275.
- Kuroda, Y., Jain, A. K., Tezuka, H., and Kada, T. (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 267(2), 201-209.
- Kushi, A., Matsumoto, T., and Yoshida, D. (1983). Mutagen from the gaseous phase of protein pyrolyzate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(9), 1979-1982.
- Kwon, H. J., Lee, J. H., and Hong, S. P. (2010). Improvement of the extraction efficiency of d-amygdalin from armeniacaee semen powder through inactivating emulsin and suppressing the epimerization of d-amygdalin. *Archives of Pharmacal Research*, 33(1), 81-86.
- Kwon, H. Y., Hong, S., P., Hahn, D. H., and Kim, J. H. (2003). Apoptosis induction of persicae semen extract in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Archives of Pharmacal Research*, 26(2), 157-161.
- Laham, H. Z., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., and Sadiq, M. F. (2019). Enalapril protect human lymphocytes from genotoxicity of Hydrochlorothiazide. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(6), 2667-2671.
- Lande, Y., Fisch, B., Tsur, A., Farhi, J., Prag-Rosenberg, R., Ben-Haroush, A., Kessler-Icekson, G., Zhalka, M. A., Ludeman, S. M., and Abir, R. (2017). Short-term exposure of human ovarian follicles to cyclophosphamide metabolites seems to promote follicular activation *in vitro*. *Reproductive Biomedicine Online*, 34(1), 104-114.
- Laster Jr, W. R., and Schabel Jr, F. M. (1975). Experimental studies of the antitumor activity of amygdalin MF (NSC-15780) alone and in combination with beta-glucosidase (NSC-128056). *Cancer Chemotherapy Reports*, 59(5), 951-965.
- Latif, S., Chiapusio, G., and Weston, L. A. (2017). Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. *Advances in Botanical Research*, 82, 19-54.

- Lazutka, J. R., and Margolin, B. H. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17(3), 188-195.
- Lee, H. M., and Moon, A. (2016). Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(1), 62-66.
- Lee, S. J., Yum, Y. N., Kim, S. C., Kim, Y., Lim, J., Lee, W. J., Koo, K. H., Kim, J. H., Kim, Lee, W. S., Sohn, S. J., Park, S. N., Park, J. H., Lee, J., and Kwon, S. W. (2013). Distinguishing between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by gene expression profiling and bioinformatic pathway analysis. *Scientific Reports*, 3(1), 1-9.
- Lepri, S., Ceccarelli, M., Milani, N., Tortorella, S., Cucco, A., Valeri, A., ... and Cruciani, G. (2017). Structure–metabolism relationships in human-AOX: Chemical insights from a large database of aza-aromatic and amide compounds. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 114(16), 3178-3187.
- Li, H., Hilmarsen, H. T., Hossain, M. B., Björk, J., Hansteen, I. L., Albin, M., Skjelbred, C. F., and Broberg, K. (2013). Telomere length and LINE1 methylation is associated with chromosomal aberrations in peripheral blood. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 52(1), 1-10.
- Li, R., Jia, Z., and Trush, M. A. (2016). Defining ROS in biology and medicine. *Reactive Oxygen Species (Apex, NC)*, 1(1), 9-21.
- Li, X., Shi, F., Gu, P., Liu, L., He, H., and Ding, L. (2014). A sensitive LC–MS/MS method for simultaneous determination of amygdalin and paeoniflorin in human plasma and its application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 92, 160-164.
- Liczbiński, P., and Bukowska, B. (2018). Molecular mechanism of amygdalin action *in vitro*: review of the latest research. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(3), 212-218.
- Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J. P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M., and Holzhütter, H. G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 28(3), 371-401.
- Liskova, A., Stefanicka, P., Samec, M., Smejkal, K., Zubor, P., Bielik, T., Biskupska-Bodova, K., Kwon, T. K., Danko, J., Büsselberg, D., Adamek, M., Rodrigo, L., Kruzliak, P., Shleikin, A., and Kubatka, P. (2020). Dietary phytochemicals as the potential protectors against carcinogenesis and their role in cancer chemoprevention. *Clinical and Experimental Medicine*, 20(2), 173-190.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C. C., Kandaswamy, E., Zhou, T., and Zuo, L. (2018). Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in Physiology*, 9(477), 1-14.

- Lockwood, A., Brocchini, S., and Khaw, P. T. (2013). New developments in the pharmacological modulation of wound healing after glaucoma filtration surgery. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(1), 65-71.
- López-Romero, D., Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro-Cevallos, G., Sánchez-Gutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Alvarez-Gonzalez, I., Morales-González, A., and Madrigal-Santillán, E. (2018). Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients*, 10(12), 1954.
- Lowy, D. R., and Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 851-891.
- Lu, Y., Liu, Y., and Yang, C. (2017). Evaluating *in vitro* DNA damage using comet assay. Journal of visualized experiments. *Journal of Visualized Experiments*, 128, 1-6.
- Luca, V. S., Miron, A., and Aprotosoia, A. C. (2016). The antigenotoxic potential of dietary flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 15(4), 591-625.
- Lv, W. F., Ding, M. Y., and Zheng, R. (2005). Isolation and quantitation of amygdalin in Apricot-kernel and *Prunus Tomentosa* Thunb. by HPLC with solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 43(7), 383-387.
- Ma, L., Zhang, M., Zhao, R., Wang, D., Ma, Y., and Li, A. (2021). Plant Natural Products: Promising Resources for Cancer Chemoprevention. *Molecules*, 26(4), 933-956.
- Maatouk, M., Mustapha, N., Mokdad-Bzeouich, I., Chaaban, H., Ioannou, I., Ghedira, K., Ghouli, M., and Chekir-Ghedira, L. (2018). Heated naringin mitigate the genotoxicity effect of Mitomycin C in BALB/c mice through enhancing the antioxidant status. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1417-1423.
- Maciejowski, J., and De Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(3), 175-186.
- Makarević, J., Rutz, J., Juengel, E., Kaulfuss, S., Reiter, M., Tsaour, I., Bartsch, G., Haferkamp, A., and Blaheta, R. A. (2014). Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and cdk2. *Plos One*, 9(8), 1-9.
- Makarević, J., Tsaour, I., Juengel, E., Borgmann, H., Nelson, K., Thomas, C., Bartsch, G., Haferkamp, A., and Blaheta, R. A. (2016). Amygdalin delays cell cycle progression and blocks growth of prostate cancer cells *in vitro*. *Life Sciences*, 147, 137-142.
- Malacarne, I. T., De Souza, D. V., Rosario, B. D. A., Viana, M. D. B., Pereira, C. D. S., Estadella, D., Santos, J. N., and Ribeiro, D. A. (2021). Genotoxicity, oxidative stress, and inflammatory response induced by crack-cocaine: relevance to carcinogenesis. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 14285-14292.

- Mani, J., Rutz, J., Maxeiner, S., Juengel, E., Bon, D., Roos, F., Chun, F. K., and Blaheta, R. A. (2019). Cyanide and lactate levels in patients during chronic oral amygdalin intake followed by intravenous amygdalin administration. *Complementary Therapies in Medicine*, 43, 295-299.
- Mannervik, B. (1987). The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochemical Society Transactions*, 15(4), 717-718.
- Mark, H. F., Naram, R., Pham, T., Shah, K., Cousens, L. P., Wiersch, C., Airall, E., Samy, M., Zolnierz, K., Mark, R., Santoro, K., Beauregard, L., and Mark, R. (1994). A practical cytogenetic protocol for *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity testing. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 24(5), 387-395.
- Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.
- Maru, G. B., Hudlikar, R. R., Kumar, G., Gandhi, K., and Mahimkar, M. B. (2016). Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 88-89.
- Mateuca, R. A., Decordier, I., and Kirsch-Volders, M. (2012). Cytogenetic methods in human biomonitoring: principles and uses. *Genetic Toxicology*, 305-334.
- McCarroll, N., Keshava, N., Cimino, M., Chu, M., Dearfield, K., Keshava, C., Kligerman, A., Owen, R., Protzel, A., Putzrathand, R., and Schoeny, R. (2008). An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study: Cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(2), 117-131.
- Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M., Monfared, A. B., Sohrabvandi, S., and Meybodi, F. A. (2017). Phytochemicals in cancer prevention: a review of the evidence. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 10(1), 7219-7227.
- Milazzo, S., and Horneber, M. (2015). Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Database Systematic Review*, 2015 (4), 1-15.
- Milazzo, S., Lejeune, S., and Ernst, E. (2007). Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence. *Supportive Care in Cancer*, 15(6), 583-595.
- Milić, M., and Kopjar, N. (2004). Evaluation of *in vitro* genotoxic activity of bleomycin and mitomycin C in human lymphocytes using the alkaline comet assay. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 55(4), 249-259.

- Milić, M., Ceppi, M., Bruzzzone, M., Azqueta, A., Brunborg, G., Godschalk, R., Koppen, G., Langie, S., Møller, P., Teixeira, J. P., Alija, A., Anderson, D., Andrade, V., Andreolim, C., Asllani, F., Bangkoglun, E. E., Barancoková, M., Basaran, N., Boutet-Robinet, E., Buschini, A., Cavallos, D., Pereirai, C. C., Costai, C., Costai, S., Da Silva, J., Del Bo, C., Srećković, V. D., Djelić, N., Dobrzyńska, M., Duracková, Z., Dvorská, M., Gajská, G., Galatiz, S., Lima, O. G., Giovannelli, L., Goroshinskaya, I. A., Grindelad, A., Gutzkove, K. B., Hernández, A., Hernández, C., Holvena, K. B., Ibero-Baraibarai, I., Ottestadah, I., Kadioglu, E., Kažimirová, A., Kuznetsova, E., Ladeira, C., Laffon, B., Lamonaca, P., Lebailly, P., Louroaq, H., Cardoso, T. M., Marconm, F., Marcosae, R., Moretti, M., Moretti, S., Najafzade, M., Nemeth, Z., Neriao, M., Novotna, B., Orlow, I., Paduchov, Z., Pastor, Z., Perdry, H., Spremo-Potparev, B., Ramadhani, D., Riso, P., Rohr, P., Rojas, E., Rossner, Safar, A., Sardas, S., Silva, M. J., Sirota, N., Smolkova, B., Staruchova, M., Stetina, R., Stopper, H., Surikova, E. I., Ulven, S. M., Ursin, C. L., Valdiglesias, V., Valverde, M., Vodicka, P., Volkovov, K., Wagner, K. H., Živković, L., Dušinská, M., Collins, A. R., and Bonassi, S. (2021). The hCOMET project: International database comparison of results with the comet assay in human biomonitoring. Baseline frequency of DNA damage and effect of main confounders. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 108371.
- Minina, V. I., Sinitsky, M. Y., Druzhinin, V. G., Fucic, A., Bakanova, M. L., Ryzhkova, A. V., Savchenko, Y. A., Timofeeva, A. A., Titov, R. A., Voronina, E. N., Volobaev, V. P., and Titov, V. A. (2018). Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. *European Journal of Cancer Prevention*, 27(1), 6-12.
- Mirmiranpour, H., Khaghani, S., Zandieh, A., Khalilzadeh, O. O., Gerayesh-Nejad, S., Morteza, A., and Esteghamati, A. (2012). Amygdalin inhibits angiogenesis in the cultured endothelial cells of diabetic rats. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(2), 211.
- Mirshahi, A., Lashay, A., Bahar, M. R. M., and Abrishami, M. (2018). Consequences of inadvertent intravitreal Mitomycin C injection. *International Journal of Retina and Vitreous*, 4(1), 7-12.
- Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 233-245.
- Moertel, C. G., Ames, M. M., Kovach, J. S., Moyer, T. P., Rubin, J. R., and Tinker, J. H. (1981). A pharmacologic and toxicological study of amygdalin. *Jama*, 245(6), 591-594.
- Moertel, C. G., Fleming, T. R., Rubin, J., Kvols, L. K., Sarna, G., Koch, R., Currie, V. E., Young, C. W., Jones, S. E., and Davignon, J. P. (1982). A clinical trial of amygdalin (Laetrile) in the treatment of human cancer. *New England Journal of Medicine*, 306(4), 201-206.

- Moon, J. Y., Kim, S. W., Yun, G. M., Lee, H. S., Kim, Y. D., Jeong, G. J., Ullah, I., Rho, G. J., Jeon, B. G. (2015). Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines. *Animal Cells and Systems*, 19(5), 295-304.
- Moradipoodeh, B., Jamalán, M., Zeinali, M., Fereidoon nezhad, M., and Mohammadzadeh, G. (2019). *In vitro* and *in silico* anticancer activity of amygdalin on the SK-BR-3 human breast cancer cell line. *Molecular Biology Reports*, 46(6), 6361-6370.
- Mosayyebi, B., Imani, M., Mohammadi, L., Akbarzadeh, A., Zarghami, N., Edalati, M., Alizadeh, E., and Rahmati, M. (2020). An update on the toxicity of cyanogenic glycosides bioactive compounds: possible clinical application in targeted cancer therapy. *Materials Chemistry and Physics*, 246, 122-841.
- Moslehi, A., Komeili-Movahed, T., and Moslehi, M. (2019). Antioxidant effects of amygdalin on tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in the mice liver: cross talk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 298-302.
- Moss, R. W. (2005). Patient perspectives: Tijuana cancer clinics in the post-NAFTA era. *Integrative Cancer Therapies*, 4(1), 65-86.
- Mouaffak, Y., Zegzouti, F., Boutbaoucht, M., Najib, M., El Adib, A. G., Sbihi, M., and Younous, S. (2013). Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 6(6), 679-680.
- Mourelatos, D. (2016). Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 803, 1-12.
- Mu, J. (2002). Research progress of amygdalin. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 25(5), 367-368.
- Münstedt, K., and Männle, H. (2020). Bee products and their role in cancer prevention and treatment. *Complementary Therapies in Medicine*, 51, 102390-102395.
- Murli, H. (2003). Screening assay for chromosomal aberrations in chinese hamster ovary (CHO) cells with argentin. *Final Report*, 23, 1-15.
- Musa, M., Ponnuraj, K. T., Mohamad, D., and Ab Rahman, I. (2012). Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test. *Nanotechnology*, 24(1), 1-13.
- Mutar, T. F., Tousson, E., Hafez, E., Abo Gazia, M., and Salem, S. B. (2020). Ameliorative effects of vitamin B17 on the kidney against Ehrlich ascites carcinoma induced renal toxicity in mice. *Environmental Toxicology*, 35(4), 528-537.

- Natarajan, A. T., and Palitti, F. (2008). DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 657(1), 3-7.
- Ndubuisi, N. D., and Chidiebere, A. C. U. (2018). Cyanide in cassava a review. *International Journal of Genomics and Data Mining*, 2018 (01), 1-10.
- Newmark, J., Brady, R. O., Grimley, P. M., Gal, A. E., Waller, S. G., and Thistlethwaite, J. R. (1981). Amygdalin (Laetrile) and prunasin beta-glucosidases: distribution in germ-free rat and in human tumor tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6513-6516.
- Newton, G. W., Schmidt, E. S., Lewis, J. P., Lawrence, R., and Conn, E. (1981). Amygdalin toxicity studies in rats predict chronic cyanide poisoning in humans. *Western Journal of Medicine*, 134(2), 97-103.
- Ng, J. Y., and Kishimoto, V. (2021). Multiple sclerosis clinical practice guidelines provide few complementary and alternative medicine recommendations: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 56, 102595-102603.
- Niazi, Y., Thomsen, H., Smolkova, B., Vodickova, L., Vodenkova, S., Kroupa, M., Vymetalkova, V., Kazimirova, A., Barancokova, M., Volkovova, K., Staruchova, M., Hoffmann, P., Nöthen, M. M., Dušinská, M., Musak, L., Vodicka, P., Hemminki, K., and Försti, A. (2019). Genetic variation associated with chromosomal aberration frequency: A genome-wide association study. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(1), 17-28.
- Nohmi, T. (2018). Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Toxicological Research*, 34(4), 281-290.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianov, E., Šrám, R. J., Knudsen, L.E., Baralen, R., and Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600 (1-2), 37-45.
- Nowsheen, S., Aziz, K., B Kryston, T., F Ferguson, N., and Georgakilas, A. (2012). The interplay between inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Current Molecular Medicine*, 12(6), 672-680.
- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J. L., and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*, 85(5), 2265-2289.
- Oduwole, I., and Abdelnaser, A. (2020). Amygdalin-Therapeutic Effects and Toxicity. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*, 3(2), 39-49.
- OECD (2014). OECD Test Guidelines For Testing Of Chemicals: Introduction To The Oecd Guidelines On Genetic Toxicology Testing, 1-9.
- Oke, O. L. (1979). Some aspects of the role of cyanogenic glycosides in nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 33, 70-103.

- Okimoto, R. A., and Bivona, T. G. (2014). Recent advances in personalized lung cancer medicine. *Personalized Medicine*, 11(3), 309-321.
- Okuno, Y., Marumoto, S., and Miyazawa, M. (2019). Antimutagenic activity of flavonoids from Sozoku. *Natural Product Research*, 33(6), 862-865.
- Omelka, R., Kovacova, V., Mondockova, V., Grosskopf, B., Kolesarova, A., and Martiniakova, M. (2021). Cyanogenic glycoside amygdalin influences functions of human osteoblasts *in vitro*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 109-116.
- Ostling, O., and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.
- Osuntokun, B. O. (1980). Cassava diet, chronic cyanide intoxication and neuropathy in the Nigerian Africans. *Human Nutrition and Diet*, 36, 141-173.
- Özdamar, F. Ö., Furtana, G. B., Ellialtıoğlu, Ş., and Tıpırdamaz, R. (2016). The Role of the Relationship between Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Plant Tolerance to Abiotic Stresses. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(1), 117-131.
- Palmitelli, M., Stanganelli, C., Stella, F., Krzywinski, A., Bezares, R., González Cid, M., and Slavutsky, I. (2019). Analysis of basal chromosome instability in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Mutagenesis*, 34(3), 245-252.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. T. and Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research*, 540, 19-28.
- Park, H. J., Yoon, S. H., Han, L. S., Zheng, L. T., Jung, K. H., Uhm, Y. K., Lee, J. H., Jeong, J. S., Joo, W. S., Yim, S. V., Chung, J. H., and Hong, S. P. (2005). Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 11(33), 5156-5161.
- Patel, R., Garg, R., Erande, S., and Maru, G. B. (2007). Chemopreventive herbal antioxidants: current status and future perspectives. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40(2), 82-91.
- Pawar, A. A., Vikram, A., Tripathi, D. N., Padmanabhan, S., Ramarao, P., and Jena, G. (2009). Modulation of mitomycin C-induced genotoxicity by acetyl-and thio-analogues of salicylic acid. *In vivo*, 23(2), 303-307.
- Peres, M. T. L. P., Lopes, J. R. R., Silva, C. B. D., Cândido, A. C. S., Simionatto, E., Cabral, M. R. P., Oliveira, R. M., Facco, J. T., Cardoso, C. A. L., and Simas, P. H. (2013). Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 27(4), 836-846.
- Perry, P., and Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen–carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258(5531), 121-125.

- Perry, P., and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251 (5471), 156-158.
- Pogribny, I. P., and Rusyn, I. (2013). Environmental toxicants, epigenetics, and cancer. In: Karpf, A. R. (Eds.), *Epigenetic Alterations in Oncogenesis*. Springer, New York, 215-232.
- Poulton, J. E. (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant Physiology*, 94(2), 401-405.
- Purushothaman, A., Sufiya, P., Meenatchi, P., Sundaram, R., and Saravanan, N. (2020). Antigenotoxic and Antimutagenic Effects of *Andrographis paniculata*, a Traditional Medicinal Herb against Genotoxicity of Cyclophosphamide: An *In Vitro* Study on Human Peripheral Lymphocytes. *Preventive Nutrition and Food Science*, 25(3), 246-253.
- Qadir, M., and Fatima, K. (2017). Review on pharmacological activity of amygdalin. *Archives in Cancer Research*, 5(04), 160-163.
- Qian, Q., Chen, Y., Wang, J. Q., Yang, D. Q., Jiang, C., Sun, J., Dong, J. and Li, G. C. (2021). Use of the alkaline comet assay for monitoring genotoxic effects of arsenic in human populations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 503368-503378.
- Radu, M., Mihalache, M., and Mihalache, C. (2014). Etiopathogenetic Mechanisms of Carcinogenesis. *Acta Medica Transilvanica*, 2(1), 145-147.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., and Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 1-20.
- Rahman, Q. B., Iocca, O., Kufta, K., and Shanti, R. M. (2020). Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, 32(3), 367-375.
- Rao, A. P., and Rao, P. N. (1976). The cause of G2-arrest in Chinese hamster ovary cells treated with anticancer drugs. *Journal of the National Cancer Institute*, 57(5), 1139-1143.
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I., and Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20(12), 522-531.
- Rauws, A. G., Olling, M., and Timmerman, A. (1982). The pharmacokinetics of prunasin, a metabolite of amygdalin. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 19(8), 851-856.
- Razavi-Azarkhiavi, K., Behravan, J., Mosaffa, F., Sehatbakhsh, S., Shirani, K., and Karimi, G. (2014). Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(1), 27-33.

- Razis, A. F. A., De Nicola, G. R., Pagnotta, E., Iori, R., and Ioannides, C. (2012). 4-Methylsulfanyl-3-butenyl isothiocyanate derived from glucoraphasatin is a potent inducer of rat hepatic phase II enzymes and a potential chemopreventive agent. *Archives of Toxicology*, 86(2), 183-194.
- Registre, M., and Proudlock, R. (2016). The In Vitro Chromosome Aberration Test. In Proudlock, R. (Eds.), *Genetic Toxicology Testing*, Elsevier, USA: Academic Press, 207-267.
- Rehman, M. U., Tahir, M., Ali, F., Qamar, W., Lateef, A., Khan, R., Quaiyoom, A., Hamiza, O. O., and Sultana, S. (2012). Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 365(1), 119-127.
- Rencüzoğulları, E., Parlak, S., and İla, H. B. (2008). The effects of food protector biphenyl on sister chromatid exchange, chromosome aberrations, and micronucleus in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 31(2), 263-274.
- Rendic, S., and Guengerich, F. P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1316-1383.
- Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nature Immunology*, 3(12), 1129-1134.
- Rhease, H. J., and Frease, E. (1968). Chemical analysis of DNA alterations. Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by H₂O₂ and hydroxylamine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 155, 476-490.
- Ritchie, C., and Ko, E. Y. (2021). Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. *Andrologia*, 53(1), 13581-13596.
- Rodrigues, M. A., Probst, C. E., Zayats, A., Davidson, B., Riedel, M., Li, Y., and Venkatachalam, V. (2021). The *in vitro* micronucleus assay using imaging flow cytometry and deep learning. *Nature Partner Journals Systems Biology and Applications*, 7(1), 1-12.
- Rojas, E., Herrera, L. A., Sordo, M., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Rodriguez, R., and Ostrosky-Wegman, P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs*, 4(6), 637-640.
- Rojas, E., Montero, R., Herrera, L. A., Sordo, M., Gonsebatt, M. E., Rodriguez, R., and Ostrosky-Wegman, P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?. *Mutation Research Letters*, 282(4), 283-286.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H., and Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5706-5715.

- Roussel, C., Witt, K. L., Shaw, P. B., and Connor, T. H. (2019). Meta-analysis of chromosomal aberrations as a biomarker of exposure in healthcare workers occupationally exposed to antineoplastic drugs. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 207-217.
- Roy, M., Chakrabarty, S., Sinha, D., Bhattacharya, R. K., and Siddiqi, M. (2003). Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 33-41.
- Ruiz, R. B., and Hernández, P. S. (2016). Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas*, 94, 13-19.
- Ruiz-Roca, B., Navarro, M. P., and Seiquer, I. (2008). Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: Relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9056-9063.
- Saghatchian, M., Bihan, C., Chenailler, C., Mazouni, C., Dauchy, S., and Delaloge, S. (2014). Exploring frontiers: use of complementary and alternative medicine among patients with early-stage breast cancer. *The Breast*, 23(3), 279-285.
- Saha, P., and Das, S. (2003). Regulation of hazardous exposure by protective exposure: modulation of phase II detoxification and lipid peroxidation by *Camellia sinensis* and *Swertia chirata*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 23(S1), 313-322.
- Saidu, Y. (2004). Physicochemical features of rhodanese: A review. *African Journal of Biotechnology*, 3(8), 370-374.
- Salah, H. M., Aboul-Ela, E. I., and Swelim, H. H. (2019). Ameliorative Effect of Peach Seed Extract on Cyclophosphamide-Induced Cytogenetic and Histological Effects in Mice. *International Journal of Genetics and Genomics*, 7(4), 136-147.
- Salawu, A., Wright, K., Al-Kathiri, A., Wyld, L., Reed, M., and Sisley, K. (2018). Sister chromatid exchange and genomic instability in soft tissue sarcomas: potential implications for response to DNA-damaging treatments. *Sarcoma*, 2018, 1-9.
- Salk, J. J., and Kennedy, S. R. (2020). Next-generation genotoxicology: Using modern sequencing technologies to assess somatic mutagenesis and cancer risk. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(1), 135-151.
- Samarth, R. M., Khan, T., Srivas, S., Mishra, P. K., and Tiwari, R. R. (2018). Evaluation of cyclophosphamide-induced genotoxicity and cytotoxicity in cultured human lymphocytes. *Journal of Radiation and Cancer Research*, 9(1), 28-32.
- Santos-Pimenta, L. P., Schilthuisen, M., Verpoorte, R., and Choi, Y. H. (2014). Quantitative analysis of amygdalin and prunasin in *Prunus serotina* Ehrh. using ¹H-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 25(2), 122-126.

- Sassi, A., Boubaker, J., Loussaief, A., Jomaa, K., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2021). Protective Effect of Chrysin, a Dietary Flavone against Genotoxic and Oxidative Damage Induced by Mitomycin C in Balb/C Mice. *Nutrition and Cancer*, 73(2), 329-338.
- Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M., and Sofuni, T. (2002). Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 57-65.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.
- Schandry, N., and Becker, C. (2020). Allelopathic plants: models for studying plant–interkingdom interactions. *Trends in Plant Science*, 25(2), 176-185.
- Schottenfeld, D., Beebe-Dimmer, J. L., Buffler, P. A., and Omenn, G. S. (2013). Current perspective on the global and United States cancer burden attributable to lifestyle and environmental risk factors. *Annual Review of Public Health*, 34, 97-117.
- Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., and Bursch, W. (1994). Tumor development and apoptosis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105(4), 363-367.
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., and Schuppler, J. (1983). Promotion of spontaneous preneoplastic cells in rat liver as a possible explanation of tumor production by nonmutagenic compounds. *Cancer Research*, 43(2), 839-844.
- Şekeroğlu, V., Aksoy, M., and Atlı-Şekeroğlu, Z. (2017). Cytogenetic alterations in human lymphocyte cultures following exposure to ofloxacin. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(2), 140-145.
- Seyfried, T. N., and Shelton, L. M. (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutrition and Metabolism*, 7(1), 1-22.
- Shankar, S., Kumar, D., and Srivastava, R. K. (2013). Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 1-17.
- Shao, Y., Schiwy, A., Glauch, L., Henneberger, L., König, M., Mühlenbrink, M., Xiao, H., Thalmann, B., Schlichting, R., Hollert, H., and Escher, B. I. (2020). Optimization of a pre-metabolization procedure using rat liver S9 and cell-extracted S9 in the Ames fluctuation test. *Science of The Total Environment*, 749, 1-9.
- Sharanya, C. S., Sabu, A., and Haridas, M. (2020). Plant Metabolomics: Current Status and Prospects. In S. T. Sukumaran, S. Sugathan and S. Abdulhameed (Eds.) *Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects*. Singapore, Springer, 1-22.

- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Fokou, P. V. T., Azzini, E., Peluso, I., Mishra, A. P., Nigam, Y. E., Rayess, M., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., Setzer, W. N., Calina, D., Cho, W. C., and Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694-715.
- Sharma, P., McClees, S. F., and Afaq, F. (2017). Pomegranate for prevention and treatment of cancer: an update. *Molecules*, 22(1), 177-195.
- Shay, J. W. (2016). Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. *Cancer Discovery*, 6(6), 584-593.
- Shi, J., Chen, Q., Xu, M., Xia, Q., Zheng, T., Teng, J., Li, M., and Fan, L. (2019). Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: A review. *Cancer Medicine*, 8(6), 3004-3011.
- Shishkovsky, K. R. (1980). Administrative law. laetrile and other drugs to be used by the terminally ill are not exempt from the safety and effectiveness requirements of the federal food, drug, and cosmetic act of 1938. *Journal of Urban Law*, 57(2), 364-388.
- Shragg, T. A., Albertson, T. E., and Fisher Jr, C. J. (1982). Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. *Western Journal of Medicine*, 136(1), 65-69.
- Siddique, Y. H., Ara, G., Beg, T., Gupta, J., and Afzal, M. (2010). Assessment of cell viability, lipid peroxidation and quantification of DNA fragmentation after the treatment of anticancerous drug mitomycin C and curcumin in cultured human blood lymphocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(5), 503-508.
- Siddique, Y. H., Beg, T., and Afzal, M. (2008). Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs, *Toxicology In Vitro*, 22(3), 625-631.
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8735-8741.
- Singh, N. P. (2016). The comet assay: reflections on its development, evolution and applications. *Mutation research/Reviews in Mutation Research*, 767, 23-30.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Singh, P., Rao, P., and Bhattacharya, R. (2013). Dose and Time-Dependent Effects of Cyanide on Thiosulfate Sulfurtransferase, 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase, and Cystathionine λ -Lyase Activities. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(12), 499-507.
- Sireesha, D., Reddy, B. S., Reginald, B. A., Samatha, M., and Kamal, F. (2019). Effect of amygdalin on oral cancer cell line: An *In Vitro* Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1), 104-107.

- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., and Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, 55(2), 273-285.
- Soltani, F., Moghadam, O. F., Nadalizadeh, N., Emami, S. A., and Javadi, B. (2021). Anti-genotoxic and cytoprotective effects of a multi-herbal extract against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in HepG2 cells. *South African Journal of Botany*, 140, 11-16.
- Sommer, S., Buraczewska, I., and Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534-1553.
- Song, Q., Gou, W. L., and Zhang, R. (2015). FAM3A protects HT22 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through activation of PI3K/Akt but not MEK/ERK pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(4), 1431-1441.
- Song, Z., and Xu, X. (2014). Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(5), 3-7.
- Sonoda, K. (2016). Molecular biology of gynecological cancer. *Oncology Letters*, 11(1), 16-22.
- Spandidos, D. A. (1986). A unified theory for the development of cancer. *Bioscience Reports*, 6(8), 691-708.
- Spasić, I., Livsey, J., Keane, J. A., and Nenadić, G. (2014). Text mining of cancer-related information: Review of current status and future directions. *International Journal of Medical Informatics*, 83(9), 605-623.
- Speijers, G. (1993). Cyanogenic Glycosides, WHO Food Additives Series:30. *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Naturally Occurring Toxicants. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, Geneva, 299–337.
- Speit, G., and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.
- Speit, G., Schütz, P., and Merk, O. (2000). Induction and repair of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis*, 15(1), 85-90.
- Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Soley, B. S., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., Correr, C. J., and Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289-296.
- Sporn, M. B. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Research*, 36 (7 Part 2), 2699-2702.

- Srivastava, A. K., Mishra, S., Ali, W., and Shukla, Y. (2016). Protective effects of lupeol against mancozeb-induced genotoxicity in cultured human lymphocytes. *Phytomedicine*, 23(7), 714-724.
- Steiblen, G., Benthem, J., and Johnson, G. (2020). Strategies in genotoxicology: acceptance of innovative scientific methods in a regulatory context and from an industrial perspective. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 853, 1-7.
- Stock, C. C., Tarnowski, G. S., Schmid, F. A., Hutchison, D. J., and Teller, M. N. (1978). Antitumor tests of amygdalin in transplantable animal tumor systems. *Journal of Surgical Oncology*, 10(2), 81-88.
- Strugala, G. J., Rauws, A. G., and Elbers, R. (1986). Intestinal first pass metabolism of amygdalin in the rat *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 35(13), 2123-2128.
- Strugala, G. J., Stahl, R., Elsenhans, B., Rauws, A. G., and Forth, W. (1995). Small-intestinal transfer mechanism of prunasin, the primary metabolite of the cyanogenic glycoside amygdalin. *Human & Experimental Toxicology*, 14(11), 895-901.
- Stults, D. M., Killen, M. W. and Pierce, A. J. (2014). The sister chromatid exchange (SCE) assay. *Molecular Toxicology Protocols*. New York: Humana Press, 439-455.
- Sullivan, L. B., and Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer and Metabolism*, 2(1), 1-12.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.
- Suvarna, C., Chaitanya, N. C., Ameer, S., Inamdar, P., Alugubelli, S., and Bhagyanagar, A. (2020). Chemopreventive agents in oral premalignancy: A medical management review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 10(2), 127.
- Swift, L. H., and Golsteyn, R. M. (2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3403-3431.
- Takayama, Y., and Kawai, S. (1984). Study on the Prevention of Racemization of Amygdalin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32(2), 778-781.
- Talalay, P., and Fahey, J. W. (2001). Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *The Journal of Nutrition*, 131(11), 3027-3033.

- Tanaka, R., Nitta, A., and Nagatsu, A. (2014). Application of a quantitative ^1H -NMR method for the determination of amygdalin in *Persicae* semen, *Armeniaca* semen, and *Mume fructus*. *Journal of Natural Medicines*, 68(1), 225-230.
- Tanyıldızı, S., and Bozkurt, T. (2004). *In vitro* effects of linamarin, amygdalin and gossypol acetic acid on hyaluronidase activity, sperm motility and morphological abnormality in bull sperm. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(5), 819-824.
- Tayeb, B. A. (2020). Evaluation of human genomic DNA damage caused by H_2O_2 *in vitro* using single-cell gel electrophoresis. *Toxicology*, 16, 119-125.
- Thybaud, V., Le Fevre, A. C., and Boitier, E. (2007). Application of toxicogenomics to genetic toxicology risk assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 369-379.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., and Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Todorova, A., Pesheva, M., Iliev, I., Bardarov, K., and Todorova, T. (2017). Antimutagenic, Antirecombinogenic, and Antitumor Effect of Amygdalin in a Yeast Cell–Based Test and Mammalian Cell Lines. *Journal of Medicinal Food*, 20(4), 360-366.
- Topaktaş ve Rencüzoğulları (2010). Sitogenetik (İkinci Baskı). Ankara: NOBEL Yayınevi, s. 45-124.
- Topaktaş, M. (2014). Genetik (Birinci Baskı). Ankara: NOBEL Yayın evi, s. 365-376.
- Tousson, E., Hafez, E., Gazia, M. M. A., Salem, S. B., and Mutar, T. F. (2020). Hepatic ameliorative role of vitamin B17 against Ehrlich ascites carcinoma–induced liver toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(9), 9236-9246.
- Tuenter, E., Creylman, J., Verheyen, G., Pieters, L., and Van Miert, S. (2020). Development of a classification model for the antigenotoxic activity of flavonoids. *Bioorganic Chemistry*, 98, 1-7.
- Tumini, E., and Aguilera, A. (2021). The Sister-Chromatid Exchange Assay in Human Cells. In A. Aguilera and A. Carreira, *Homologous Recombination*. Humana, NY: Springer, 383-393.
- Türkez, H., Aydın, E., ve Aslan, A. (2012). *Xanthoria elegans* (Link)(lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64(6), 679-686.
- Ünal, F., Taner, G., Yüzbaşıoğlu, D., and Yılmaz, S. (2013). Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 65(4), 553-565.

- Vakkila, J., and Lotze, M. T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 641-648.
- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., and Farmer, E. E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus" Phytoanticipins". *The Plant Cell*, 6(9), 1191-1192.
- Velickova, N., and Milev, M. (2020). Genotoxicity test methods-a tool for DNA and chromosome damage biomonitoring. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 148 (9-10), 626-630.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., and Altomare, E. (1999). An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 29(2), 49-55.
- Verweij, J., and Pinedo, H. M. (1990). Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs*, 1(1), 5-13.
- Vilar, J. B., Ferreira, F. L., Ferri, P. H., Guillo, L. A., and Chen Chen, L. (2008). Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, 68(1), 141-147.
- Vincent, T. L., and Gatenby, R. A. (2008). An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 32(4), 729-737.
- Vodenkova, S., Polivkova, Z., Musak, L., Smerhovsky, Z., Zoubkova, H., Sytarova, S., Kavcova, E., Halasova, E., Vodickova, L., Jiraskova, K., Svoboda, M., Ambrus, M., Hemminki, K., and Vodicka, P. (2015). Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients. *Mutagenesis*, 30(4), 557-563.
- Vodicka, P., Musak, L., Vodickova, L., Vodenkova, S., Catalano, C., Kroupa, M., Naccaratia, A., Polivkova, Z., Vymetalkova, V., Försti, A., and Hemminki, K. (2018). Genetic variation of acquired structural chromosomal aberrations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 13-21.
- Wachsman, J. T. (1997). DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375(1), 1-8.
- Wahab, M. F., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., Strattan, R., and Berthod, A. (2015). Problems and pitfalls in the analysis of amygdalin and its epimer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8966-8973.
- Wang, P., Sandrock, R. W., and VanEtten, H. D. (1999). Disruption of the cyanide hydratase gene in *Gloeocercospora sorghi* increases its sensitivity to the phytoanticipin cyanide but does not affect its pathogenicity on the cyanogenic plant sorghum. *Fungal Genetics and Biology*, 28(2), 126-134.

- Wang, Y., Gray, J. P., Mishin, V., Heck, D. E., Laskin, D. L., and Laskin, J. D. (2010). Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(6), 1852-1863.
- Wasson, G. R., McKelvey-Martin, V. J., and Downes, C. S. (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*, 23(3), 153-162.
- Wattenberg, L. W. (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, 45(1), 1-8.
- White, J. D. (2020). Complementary and alternative medicine. In J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, J. H. Doroshow, M. B. Kastan and J. E. Tepper (Eds.), *Abeloff's Clinical Oncology* (6th Edition). Philadelphia, Elsevier, 500-511.
- Wienkers, L. C., and Heath, T. G. (2005). Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nature Reviews Drug discovery*, 4(10), 825-833.
- Wietmarschen, N., and Lansdorp, P. M. (2016). Bromodeoxyuridine does not contribute to sister chromatid exchange events in normal or Bloom syndrome cells. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6787-6793.
- Wilde, E. C., Chapman, K. E., Stannard, L. M., Seager, A. L., Brüsehafer, K., Shah, U. K., Tonkin, J. A., Brown, M. R., Verma, J. R., Doherty, A. T., Johnson, G. E., Doak, S. H., and Jenkins, G. J. (2018). A novel, integrated *in vitro* carcinogenicity test to identify genotoxic and non-genotoxic carcinogens using human lymphoblastoid cells. *Archives of Toxicology*, 92(2), 935-951.
- Wilson III, D. M., and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11-23.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Wodinsky, I., and Swiniarski, J. K. (1975). Antitumor activity of amygdalin MF (NSC-15780) as a single agent and with beta-glucosidase (NSC-128056) on a spectrum of transplantable rodent tumors. *Cancer Chemotherapy Reports*, 59(5), 939-950.
- Woźniak, M., Krajewski, R., Makuch, S., and Agrawal, S. (2021). Phytochemicals in Gynecological Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1219-1238.
- Yamamoto, K., Osaki, Y., Kato, T., and Miyazaki, T. (1992). Antimutagenic substances in the *Armeniaca* semen and *Persicae* semen. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 112(12), 934-939.
- Yan, J., Tong, S., Li, J., and Lou, J. (2006). Preparative isolation and purification of amygdalin from *Prunus armeniaca* L. with high recovery by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(9), 1271-1279.

- Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D., and Çelik, M. (2008). Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on allium chromosomes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17, 1029-1037.
- Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.
- Yoon, M., Campbell, J. L., Andersen, M. E., and Clewell, H. J. (2012). Quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation of cell-based toxicity assay results. *Critical Reviews in Toxicology*, 42(8), 633-652.
- Yoshihara, S. I., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K., and Ohta, S. (2004). Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicological Sciences*, 78(1), 50-59.
- Young, K. H., Pyo, H. S., Hoon, H. D., and Hee, K. J. (2003). Apoptosis induction of Persicae Semen extract in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Archives of Pharmacal Research*, 26(2), 157-161.
- Yu, C. (2020). Metabolism and *in vitro* drug–drug interaction assessment of viloxazine. *Xenobiotica*, 50(11), 1285-1300.
- Yulvianti, M., and Zidorn, C. (2021). Chemical Diversity of Plant Cyanogenic Glycosides: An Overview of Reported Natural Products. *Molecules*, 26(3), 719-738.
- Yurt, B., and Çelik, I. (2011). Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 508-513.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1), 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Engüzel-Alperen, C., and Ünal, F. (2018). Investigation of *in vitro* genotoxic effects of an anti-diabetic drug sitagliptin. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 235-241.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., and Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186.
- Zagrobelny, M., Bak, S., Rasmussen, A. V., Jørgensen, B., Naumann, C. M., and Møller, B. L. (2004). Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65(3), 293-306.

- Zaguia, N., Laplagne, E., Colicchio, B., Cariou, O., Al Jawhari, M., Heidingsfelder, L., Hempela, W. M., Jrad, B. B. H., Jeandidier, E., Dieterlen, A., Carde, P., Voisin, P., and M'kacher, R. (2020). A new tool for genotoxic risk assessment: Reevaluation of the cytokinesis-block micronucleus assay using semi-automated scoring following telomere and centromere staining. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 850, 1-8.
- Żakowicz-Miętkiewicz, K. (2021). Primary and secondary prevention of skin cancers. *Aesthetic Cosmetology and Medicine*, 10(1), 3-11.
- Zannoni, G. F., Angelico, G., and Santoro, A. (2020). Aberrant non-canonical WNT pathway as key-driver of high-grade serous ovarian cancer development. *Virchows Archiv*, 477(2), 321-322.
- Zeweil, H. S., Rizk, R. E., Bekhet, G. M., and Ahmed, M. R. (2015). Comparing the effectiveness of egg disinfectants against bacteria and mitotic indices of developing chick embryos. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 70, 1-15.
- Zhang, G. M., and Jin, B. Q. (1986). Pharmacokinetics of amygdalin in rabbits. *Acta Pharmacologica Sinica*, 7(5), 460-462.
- Zhang, X., Hu, J., Zhuo, Y., Cui, L., Li, C., Cui, N., and Zhang, S. (2018). Amygdalin improves microcirculatory disturbance and attenuates pancreatic fibrosis by regulating the expression of endothelin-1 and calcitonin gene-related peptide in rats. *Journal of The Chinese Medical Association*, 81(5), 437-443.
- Zhao, F., and Yang, Z. (2012). Amygdalin attenuates atherosclerosis progress through inhibiting of toll-like receptors expression and activity. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11 (10), 1613-1621.
- Zhao, H., Cai, T. J., Lu, X., Tian, M., and Liu, Q. J. (2021). Effects of radiation quality and dose rate on radiation-induced nucleoplasmic bridges in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 863, 1-6.
- Zheng, Q., Guo, Y., Sun, J., Xie, G., Li, X., and Liao, G. (2009). An experiment of amygdalin induced premature chromosome condensation in human blood T lymphocytes. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 26(6), 572-574.
- Zhou, C., Qian, L., Ma, H., Yu, X., Zhang, Y., Qu, W., Zhang, X., and Xia, W. (2012). Enhancement of amygdalin activated with β -D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 516-523.
- Zubair, H., Azim, S., Ahmad, A., Khan, M. A., Patel, G. K., Singh, S., and Singh, A. P. (2017). Cancer chemoprevention by phytochemicals: nature's healing touch. *Molecules*, 22(3), 309-321.



GAZİ GELECEKTİR...