ACACİA NİLOTİCA (L.) METANOLİK YAPRAK EKSTRAKTININ ANTİ-KANSER POTANSİYELİNİN A549 VE H1299 HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI.

Abdelaziz ASSOUYOUTI

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ACACİA NİLOTİCA (L.) METANOLİK YAPRAK EKSTRAKTININ ANTİ-KANSER POTANSİYELİNİN A549 VE H1299 HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI.

Abdelaziz ASSOUYOUTI
0000-0003-1225-1504

Doç. Dr. Özgür VATAN
0000-0002-7687-3284
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ACACİA NİLOTİCA (L.) METANOLİK YAPRAK EKSTRAKTININ ANTİ-KANSER POTANSİYELİNİN A549 VE H1299 HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI.

Abdelaziz ASSOUYOUTI

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özgür VATAN

Kanser, dünyanın birçok ülkesinde önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmakla birlikte yaşam süresinin artmasının önünde önemli bir engel olarak yer almaktadır. Günümüzde, kanser gibi hastalıklara karşı yeni ilaçlar geliştirmek için çeşitli bitkisel ürünlerin araştırılması artarak devam etmektedir. Son yıllarda, çeşitli bitkisel ürünlerin farklı kanserlere karşı umut verici anti-kanser etkinliği gösterilmiştir. Bu bağlamda tez çalışmasında, özellikle subtropik coğrafyada halk arasında tıbbi amaçlar için kullanımı yaygın olan, *Acacia nilotica* (L) bitkisinin yapraklarından elde edilen metanolik ekstraktlarının anti-kanser potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, Akciğer kanseri hücre hatları olan A549 ve H1299 hücrelerinde sitotoksisitenin belirlenebilmesi için XTT ve Klononjenik testler, hücre ölüm modunun belirlenebilmesi için Annexin-V, DNA hasarlarının belirlenebilmesi için Komet yöntemi ve DNA hasar etmenlerinin belirlenebilmesi için hücre içi ROS testleri uygulanmıştır.

XTT testi sonucunda *A. nilotica* yaprak metanolik ekstraktlarının A549 ve H1299 hücreler hatlarındaki IC50 değerleri sırasıyla 616,66 ± 11,71 µg/ml ve 198,05 ± 14,48 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Klonojenik testte ise bu değerler A549 ve H1299 hücreleri için sırasıyla 212,66 µg/ml ve 56,06 µg/ml olarak belirlenmiştir. Komet testinde ise XTT testinden elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerlerinde maruz bırakılan A549 ve H1299 hücre hatlarında kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti hesaplanmış ve elde edilen sonuçlarda DNA iplik kırıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir. ROS testi sonuçları ise *A. nilotica* yaprak metanolik ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarına maruz bırakılan A549 ve H1299 hücrelerinde ekstraktların, hücre içi ROS düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistikî olarak anlamlı artışlara yol açtığı belirlenmiştir. Annexın-V testin sonuçları ise *A. nilotica* ekstraktın $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerlerine 24 saat maruz bırakılan A549 ve H1299 hücrelerinde *A. nilotica* ekstraktının hücreleri apoptoza götürmediğini ve doğrudan nekroza sebep olduğunu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Acacia nilotica* (L), Akciğer kanseri, anti-kanser, A549, H1299, Klononjenik testi, Komet testi, ROS testi, XTT testi
2022, viii + 59 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF ANTI-CANCER POTENTIAL OF *ACACIA NILOTICA* (L.) METHANOLIC LEAF EXTRACT IN A549 AND H1299 CELL LINES.

Abdelaziz ASSOUYOUTI

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

Supervisor: Assoc.Prof. Özgür VATAN

Cancer is a leading cause of death and a significant obstacle to increasing life expectancy in every country in the world. Today, research into various plant-based products is ongoing to develop new drugs for diseases such as cancer.
In recent years, various herbal products have shown promising anticancer activity against different cancers. In this context, the thesis study is aimed to investigate the anticancer potential of methanolic extracts obtained from the leaves of the *Acacia nilotica* (L) plant, which is widely used for medicinal purposes, especially in subtropical geography For this purpose, XTT and Clonogenic assay were used to assess cytotoxicity in lung cancer cell lines A549 and H1299 cells, Annexin-V to determine the cell death mode, Comet assay to determine DNA damages, and intracellular ROS assay to determine DNA damage factors.

As a result of the XTT assay, IC50 values in A549 and H1299 cell lines obtained from *A. nilotica* leaf methanolic extract are calculated as 616.66 ± 11.71 µg/ml and 198.05 ± 14.48 µg/ml, respectively. The clonogenic test determined these values as 212.66 µg/ml and 56.06 µg/ml for A549 and H1299 cell lines, respectively. In the comet assay, tail length, tail % DNA, and olive tail moment are calculated in A549 and H1299 cell lines after exposure to IC12.5, IC25, IC50 and IC75 values obtained from the XTT test. The results indicated a statistically significant increase in DNA strand breaks compared to the control group. The results of the ROS assay showed that methanolic extract of *A. nilotica* leaves induced statistically significant increases in intracellular ROS levels in A549 and H1299 cell lines exposed to IC12.5, IC25, IC50 and IC75 concentrations compared to the control groups. The results of the Annexin-V assay showed that *A. nilotica* extract did not induce apoptosis and directly induced necrosis in A549 and H1299 cell lines exposed to IC12.5, IC25, IC50, and IC75 concentrations for 24 hours.

Keywords: *Acacia nilotica* (L), Annexin-V assay, Anticancer, A549, Clonogenic assay, Comet assay, H1299, Lung cancer, ROS assay, XTT assay
2022, viii + 59 pages.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren danışmanım sayın Doç. Dr. Özgür VATAN'a,

Bu süreçte ilgisi ve güzel enerjisiyle desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILINÇ'a ve Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Tez çalışmamın her bir aşamasında lisansüstü tecrübeleriyle beni destekleyen, yardımlarını esirgemeyen, beni doğru yönde yönlendiren ve samimiyetini her zaman hissettiren yüksek lisans öğrencisi kıymetli arkadaşım Zehra Nur DÜZEN'e,

Tez çalışmam sırasında öneri ve eleştirilerini paylaşarak bana bu yolda içtenlikle destek olan, daima hoşgörü ve anlayış gösteren doktora öğrencisi arkadaşlarım Akoua Aurelie Carine ALLOUNAN'a ve Huzeyfe HURİYET'e,

Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarında tam bir ekip ruhu oluşturan tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Bu çalışmada kullanılan H1299 hücre hattı, laboratuvarından temin edilen Prof. Dr. Ferda ARI'ya,

A. nilotica bitki yapraklarının temin edilmesinde yardımcı olan abiyim Younis ASSOUYOUTI 'ye ve arkadaşım Abdelhalim Abderaman SOURAJ'a

Yüksek lisans eğitimimi alabilmem için yardımcı olan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na,

Bursa Uludağ Üniversitesinde yüksek lisans süresince bana aile ortamı sağlayan iyi günde kötü günde yanımda duran her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen İpekyolu Uluslararası Öğrenci Derneği'ne,

Tüm hayatım boyu beni her koşulda sonsuz sevgi ve hoşgörüyle karşılayan, maddi ve manevi tüm imkanlarını karşılıksız sunarak beni destekleyen, vatana hayırlı evlat yetiştirme sorumluluğuyla beni bugünlere getirmiş olan aileme ve tüm sevdiklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Abdelaziz ASSOUYOUTI
31/01/2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... İ
ABSTRACT ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ V
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... Vİ
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... Vİİİ
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kanser 3
2.2. Akciğer Kanseri 3
2.3. Afrika'nın Şifalı Bitkileri ve Geleneksel Tıp 5
2.4.Tez Çalışmasında Kullanılan Bitki Türü 6
2.4.2. Kimyasal bileşenler 9
2.4.3. Etnofarmakoloji 9
2.4.4. Farmakodinamik çalışmalar ve potansiyel uygulamalar 10
3. MATERYAL VE YÖNTEM 16
3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler 16
3.2. Kullanılan Hücre Hatları 18
3.3. Kullanılan Bitki Ekstraktının Elde Edilmesi 21
3.4. XTT Testi 21
3.5. Klonojenik Testi 23
3.6. Komet Testi 23
3.7. Annexin-V Testi ile Apoptozun Belirlenmesi 24
3.8. ROS Testi 25
3.9. İstatistiksel Analiz 26
4. BULGULAR 27
4.1. XTT Test Bulguları 27
4.1.1. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitkisinden elde edilen XTT bulguları 27
4.1.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitkisinden elde edilen XTT bulguları 27
4.2. Klonojenik Test Bulguları 28
4.2.1. A549 hücre hattında *A. nilotica* için elde edilen klonojenik test bulguları 30
4.2.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* için elde edilen klonojenik test bulguları 30
4.3. Komet Testi Bulguları 31
4.3.1. Kuyruk uzunluğu bulguları 32
4.3.2. Kuyruk % DNA bulguları 34
4.3.3. Olive kuyruk momenti bulguları 36
4.4. Annexin-V Testi Apoptoz Bulguları 38
4.4.1. A549 hücre hattında *nilotica* için elde edilen Annexin-V testin bulgular 41
4.4.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Annexin-Vtestin 41
4.5. ROS testin bulguları 42
4.5.1. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen ROS test bulguları 43
4.5.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen ROS test bulguları 44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 46
KAYNAKLAR 52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
^0C	Celcius
dk	Dakika
Na_2HPO_4	Disodyum Fosfat
dH_2O	Distile su
P	Fosfat
H_3PO_4	Fosforik asit
gr	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
Ca	Kalsiyum
CO_2	Karbondioksit
kg	Kilogram
L	Litre
Mg	Magnezyum
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mA	Mili Amper
mg	Miligram
mL	Mililitre
$NaHPO_4$	Monosodyum fosfat
nM	Nanomolar
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklama
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
A.nilotica	*Acacia nilotica*
A549	Akciğer kanseri epitelyum hücre hattı
BSA	Bovine serum albumin
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DCFH	Dichlorodihydrofluorescin
DMSO	Dimetil sülfoksid
EAC	Ehrlich ascites carcinoma
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal bovine serum
HCT-8	İnsan ileoçekal koleraktal adenokasinoma hücre hattı
CaCo-2	İnsan kolon kolorektal kanseri
HT29	İnsan kolorektal karsinoma
HELA	İnsan serviks adeno karsinoma hücre hattı
H1299	Metastatik Akciğer Kanseri Epitelyum Hücre Hattı
B.W	Vücut Ağırlığı
IARC	International agency for research on cancer (Uluslararası kanser araştırmaları ajansı)

IC	İnhibisyon konsantrasyon
K562	İnsan kronik miyolojen lösemi hücre hattı
KB	İnsan ağız içi epidermal karsinoma hücre hattı
L1210	Mus musculus lenfotik lösemi hücre hattı
LMA	Low melting agoroz (Düşük sıcaklıkta eriyen agaroz)
MCF7	İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı
MIC	Maksimum inhibisyon konsantrasyon
Na2EDTA	Sodyum etilendiamin tetra asetik asit
NSCLC	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
PBS	Fosfat buffer serum
RNA	Ribonukleik asit
ROS	Serbest reaktif oksijen
RFU	Relative fluorescence units
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. *Acacia nilotica* bitkisi 8
Şekil 2.2. *Acacia nilotica* bitki yaprakları 8
Şekil 3.1. A549 hücre hattı ("ATCC", t.y.) 20
Şekil 3.2. H1299 hücre hattı ("ATCC", t.y.) 20
Şekil 3.3. Canlı hücrelerde XTT metobolizasyonu sonucunda suda çözünebilen formu 22
Şekil 4.1. *A.nilotica* bitki ekstraktın A549 ve H1299 hücre hatlarında IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 değerleri; Hata çubuklarında standart sapmaları belirtilmiştir 28
Şekil 4.2. *A.nilotica* bitki ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları 29
Şekil 4.3. *A.nilotica* bitki ekstraktına maruz bırakılan H1299 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları 29
Şekil 4.4. *A.nilotica* bitki ekstraktın maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları 30
Şekil 4.5. *A.nilotica* bitki ekstraktına maruz bırakılan H1299 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları 31
Şekil 4.6. Komet testi sonunda A549 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için çeşitli konsantrasyonlardaki floresan mikroskop görüntüleri 31
Şekil 4.7.Komet testi sonunda H1299 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için çeşitli konsantrasyonlardaki floresan mikroskop görüntüleri 32
Şekil 4.8. A549 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri 33
Şekil 4.9. H1299 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri 34
Şekil 4.10.A549 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk % DNA verileri 35
Şekil 4.11. H1299 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk % DNA verileri; 36
Şekil 4.12. A549 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Olive Kuyruk Momenti verileri 37
Şekil 4.13. H1299 hücre hattında *A.nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Olive Kuyruk Momenti verileri 38
Şekil 4.14. A549 hücrelerinde *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi 39
Şekil 4.15. H1299 hücrelerinde *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi 39
Şekil 4.16. A549 hücre hattın *A.nilotica* bitkisi ile muamelesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi 41
Şekil 4.17. H1299 hücrelerinin *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi 42
Şekil 4.18. A549 hücre hattın *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri 44
Şekil 4.19. H1299 hücre hattın *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. *Acacia nilotica*'nın taksonomi sınıflandırılması 7
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar 17
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler 18
Çizelge 3.3. H1299 ve A549 hücre hatların karakterizasyonları 19
Çizelge 4.1. *A.nilotica* bitki ekstraktın A549 ve H1299 hücre hatlarında IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 değerleri, ... 28
Çizelge 4.2. A549 ve H1299 hücre hatlarında *A.nilotica* bitki ekstraktı için Kuyruk uzunluğu sonuçları. 32
Çizelge 4.3.A549 ve H1299 hücre hatlarında *A.nilotica* bitki ekstraktı için Kuyruk %DNA sonuçları. 34
Çizelge 4.4. A549 ve H1299 hücre hatlarında *A.nilotica* bitki ekstraktı için Olive kuyruk momenti bulguları. 36
Çizelge 4.5. A549 hücre hattı *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri.. 40
Çizelge 4.6. H1299 hücre hattı *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri.... 40
Çizelge 4.7. A549 hücre hattın *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri 42
Çizelge 4.8. H1299 hücre hattın *A.nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri 43

1. GİRİŞ

Kanser, dünyanın birçok ülkesinde önde gelen bir ölüm nedeni ve yaşam süresinin artmasının önünde önemli bir engel olarak yer almaktadır (Siddiqui ve diğerleri, 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 tahminlerine göre kanser 183 ülkenin 112'sinde 70 yaşından önce birinci veya ikinci ölüm nedenidir ve 23 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Bray ve diğerleri, 2021; Sung ve diğerleri, 2021).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yapılan istatistiklerine göre, 2020 yılında dünya çapında 19,3 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 18,1 milyon) ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü (9,9 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) meydana gelmiştir. Tahmini 2,2 milyon yeni kanser vakası ve 1,8 milyon ölüm ile akciğer kanseri, 2020'de en sık teşhis edilen ikinci kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir; teşhis edilen kanserlerin yaklaşık onda birini (%11,4) ve ölümlerin beşte birini (%18,0) oluşturmaktadır (Sung ve diğerleri, 2021). Akciğer kanseri, erkeklerde kanser morbiditesi ve mortalitesinin önde gelen nedenidir, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserden sonra görülme sıklığı açısından üçüncü, ölüm oranı ise meme kanserinden sonra ikinci sıradadır (Commar ve diğerleri, 2018).

Günümüzde, kanser gibi hastalıklara karşı yeni ilaçlar geliştirmek için çeşitli bitkisel ürünlerin araştırılması artan bir şekilde devam etmektedir. Bu anlamda bitkiler zengin bir içeriğe sahiptir ve potansiyel anti-kanser bileşikleri içermeleri olasıdır. Tıbbi bitkilerden elde edilen fitokimyasallar hem kanser tedavisinde hem de kemoterapi, radyoterapi gibi tedavilerin yan etkileri azaltabilmek için kullanılmaktadır. Son yıllarda, çeşitli bitkisel ürünlerin farklı kanserlere karşı umut verici anti-kanser etkinliği göstermiştir.

Bu bağlamda tez çalışmasında, özellikle subtropik çoğrafyada halk arasında tıbbi amaçlar için kullanımı yaygın olan, *Acacia nilotica* (L) bitkisinin yapraklarından elde edilen metanolik ekstraktlarının anti-kanser potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaca yönelik olarak, Akciğer kanseri hücre hatları olan A549 ve H1299 hücrelerinde sitotoksisitenin belirlenebilmesi için XTT ve Klononjenik testler, hücre ölüm şeklinin belirlenebilmesi için Annexin-V, DNA hasarlarının belirlenebilmesi için Komet yöntemi ve DNA hasar etmenlerinin belirlenebilmesi için hücre içi ROS testleri uygulanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre kanser, dünya çapındaki ölümlerin %63'ünden sorumlu olan bulaşıcı olmayan hastalıkları temsil etmektedir. Batı ülkelerinde ikinci ölüm nedeni olarak nitelendirilmektedir (Alwan ve diğerleri, 2010; Kashfi, 2013). Kanser gelişimine neden olan temel anormallik, kanser hücrelerinin sürekli düzensiz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, normal hücre davranışını kontrol eden sinyallere uygun şekilde yanıt vermek yerine, kontrolsüz bir şekilde büyür ve bölünür, normal doku ve organları işgal eder ve sonunda tüm vücuda yayılabilmektedir (Cooper, 2000).

Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda hemen hemen her yerde başlayabilmektedir. Normalde insan hücreleri, yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürler ve yerlerini yeni hücrelere bırakırlar. Bazen bu düzenli süreç bozulur ve anormal veya hasarlı hücreler büyümemeleri gerekirken büyür ve çoğalır. Bu hücreler, doku topakları olarak da tanımlanabilecek olan tümörleri oluşturabilmektedir. Tümörler, iyi huylu ve kötü huylu olmak üzeri iki gruba ayrılmaktadır. Kötü huylu tümörler yakın dokulara yayılır veya yakındaki dokuları istila eder ve vücutta uzak yerlere göç ederek yeni tümörler oluşturabilmekte yani metastaz yapabilmektedir. Kanserli tümörler malign tümörler olarak da adlandırılabilmektedir. Birçok kanser katı tümörler oluşturur, ancak lösemiler gibi kan kanserleri genellikle katı tümörler oluşturmaz. İyi huylu tümörler yakındaki dokulara yayılmaz veya istila etmez. İyi huylu tümörler, çıkarıldığında genellikle tekrar büyümezken, kanserli tümörler bazen büyümektedir. Ancak iyi huylu tümörler bazen oldukça büyük olabilir. Bazıları, beyindeki iyi huylu tümörler gibi ciddi semptomlara neden olabilir veya yaşamı tehdit edebilir ("Ulusal Kanser Enstitüsü", 2007).

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri şu anda dünya çapında en yüksek ölüm oranına sahip kötü huylu tümördür, çünkü genellikle hastalık önemli ölçüde ilerlemeden ve hastanın yaşam kalitesinde önemli bir düşüşe yol açana kadar tespit edilememektedir (Ford ve diğerleri, 2013). Akciğer kanseri

erkeklerde kanser morbiditesi ve mortalitesinin önde gelen nedeni iken, kadınlarda meme ve kolorektal kanserden sonra insidans açısından üçüncü, ölüm oranı açısından meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. İnsidans ve ölüm oranları, erkeklerde kadınlara göre kabaca 2 kat daha yüksektir, ancak erkek-kadın oranı, Kuzey Amerika'da 1,2'den Kuzey Afrika'da 5,6'ya kadar, bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Erkekler arasında akciğer kanseri 36 ülkede en sık teşhis edilen kanser iken, 93 ülkede kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Afrika'da insidans oranları genellikle düşük kalmaktadır, ancak Güney ve Kuzey bölgelerinde orta ile yüksek arasında değişmektedir. Kadınlar arasında akciğer kanseri, Kuzey Amerika, Okyanusya ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde 25 ülkede kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (Commar ve diğerleri, 2018; Mu ve diğeerleri, 2013). Akciğer kanserinin olası nedenleri olarak aktif sigara içimi, pasif içicilik, pipo ve puro içimi, iç ve dış hava kirliliğine maruz kalma, radyasyona maruz kalma, asbest, nikel, krom ve arsenik gibi ajanlara maruz kalma gibi farklı faktörler gösterilmektedir. En önemli risk faktörü sigaradır (Alberg ve diğerleri, 2013).

Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyasyon, hormonlar ve immünoterapi ana yaklaşımlardır (Tan ve diğerleri, 2011). Bitkilerin kanser tedavisinde uzun bir kullanım geçmişi vardır ve önemli bir yeni ilaç kaynağı olmaya devam etmektedir (Cragg ve Newman, 2013). Bitkisel ilaçlar, geleneksel ajanları hassaslaştırmada, hasta sağkalım süresini uzatmada, kemoterapinin yan etkilerini önlemede ve akciğer kanseri hastalarında yaşam kalitesini iyileştirmede yararlı ve etkili olduklarını kanıtladıkları için akciğer kanseri tedavisi için çekici yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmiştir (Jeong ve diğerleri, 2011). 453 kanser hastası ile yapılan bir çalışmada, geleneksel kemoterapi ile bitkisel ilaçları kullanan hastaların yüzdesinin yaklaşık %77 olduğunu ortaya koymuştur (Richardson ve White, 2000). Bu durumlarda, akciğer kanseri tedavisi için tamamlayıcı bir tedavi olarak doğal ürünler, temel olarak toksisiteyi azaltmak, kansere bağlı semptomları hafifletmek, bağışıklık sistemini uyarmak ve hatta doğrudan anti-kanser etkilerine sahip olmak amacıyla kullanılmıştır (Gerber ve diğerleri, 2006).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya çapında birçok tıbbi amaçla kullanılan 21.000'den fazla bitkiyi listelemiştir (Wolfgang, 2005).

Yüzlerce yıldan beri, şifalı bitki minerallerinden ve organik maddelerden elde edilen bitkisel ilaçlar, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde pazarlanan ve popülerlik kazanan sağlık hizmetleri için dünya nüfusunun yaklaşık %75-80'inin hâlâ temel dayanak noktasıdır. Bitkiler, alkaloidler, uçucu yağlar, glikozitler, reçineler, oleoresinler, steroidler, tanenler, terpenler ve fenoller gibi farklı aktif ikincil metaloitlerin varlığından dolayı tıbbi özelliklere sahiptir. Son birkaç yılda, doğal olmaları, kolay bulunabilirliği, etkinliği, güvenilirliği. Hafıza kaybı, osteoporoz, bağışıklık bozuklukları gibi yaşa bağlı bozuklukları tedavi etmede etkili olmaları nedeniyle ve daha az yan etkileri nedeniyle bitkisel tıp alanında üstel bir büyüme vardır (Malviya ve diğerleri, 2011).

2.3. Afrika'nın Şifalı Bitkileri ve Geleneksel Tıp

Afrika, geleneksel tıbba dayalı yeni ilaçların geliştirilmesinde büyük öneme sahip olan bitkisel ve kültürel çeşitliliğe sahiptir (Light ve diğerleri, 2005). Afrika kıtası sahip olduğu çeşitli ekosistemler sayesinde benzersiz şekilde tür çeşitliliğine sahiptir. Afrika'da, en yüksek tür çeşitliliğinin merkezi tropik bölgede olduğu geniş uzunlamasına bölgelerde görülebilmektedir. Afrika bitkilerinden izole edilen biyoyararlanımı ve ilaca benzerliği açısından ilginç olan bileşiklerin sayısı, bitkilerin toplandığı coğrafi bölgeye göre gruplandırılmıştır (Kuete ve diğerleri, 2015). Biyolojik öneme sahip bileşiklerin çoğu, Orta Afrika'dan (%35), ardından Güney Afrika (%23), Doğu Afrika (%21) ve son olarak Kuzey Afrika'dan toplanan bitkilerden izole edilmiştir (Ntie-Kang ve diğerleri, 2013). Dünya çapında, gıda, yakıt, kozmetik ve ilaç sağlamak için bitkileri kullanmanın uzun bir geçmişi vardır. Afrika nüfusunun %90'ının hala geleneksel tıbba bağımlı olduğu tahmin edilmektedir (Benzie ve Wachtel-Galor, 2011). Güney Afrika'nın uzun yıllardır alternatif ilaç olarak kullanılan çok sayıda yerli bitkisel ilaçlara sahip olduğu bildirilmiştir (Van Wyk, 2015).

Tüm antikanser ilaçlarının yaklaşık %65'i, bitkiler ve deniz organizmaları gibi kaynaklardan izole edilen doğal bileşiklerin türevleridir (Balunas ve Kinghorn, 2005). Bitki türevleri ikincil metabolitler olarak bilinir ve bitkinin büyümesine yardımcı olabilmektedir. İkincil metabolitler, flavonoidler, terpenoidler ve azot içeren alkaloidler ve kükürt içeren bileşikler olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Binlerce Afrika bitkisi ve ürünleri kanser tedavisi için

taranmıştır. Anti-kanser ajanları olarak çok aktif olduğu bildirilen Afrika bitkilerinden çok çeşitli ikincil metabolitler izole edilmiştir. Bunlara benzofenonlar, flavonoidler, pterokarpan, izoflavonoidler, naftokinon, akridon alkaloidleri ve ksanton dahildir. Bitki türevlerinin hem kanser hem de çoklu ilaca dirençli kanser (MDR) tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir (Kuete ve diğerleri, 2015). Bu bitkisel ürünlerin bazıları diğerlerinden daha etkili olduğu kanıtlanmıştır ve halihazırda antikanser ajanları olarak klinik kullanımdadır. Bunlara, tümü orijinal olarak Madagaskar deniz salyangozundan (*Catharanthus roseus*) izole edilmiş olan vinka alkaloidleri, vinblastin ve vinkristin dahildir (Cragg, Grothaus ve Newman, 2009). Afrika'daki şifalı bitkiler daha çok geleneksel şifacılar tarafından insanları iyileştirmek için ağızdan veya yaralara uygulanarak Afrika toplumlarında görülen birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Afrika popülasyonları, Batı ilaçlarını karşılayamadıkları veya Batı tıbbının etkinliğinden şüphe duydukları ve doğal ürünlerin modern ilaçlardan daha iyi çalıştığına inandıkları için tıbbi bitkileri ana tıbbi tedavi kaynağı olarak kullanma eğilimindedir (Mbele, Hull ve Dlamini, 2017).

2.4.Tez Çalışmasında Kullanılan Bitki Türü

Acacia nilotica, orta büyüklükte dik bir ağaçtır ve Fabaceae familyasına aittir. Genç ağaçlarda, kabuk yeşildir ve olgun olanlarda, boyuna çatlaklarla karakterize neredeyse siyahtır. Ağacın yaprakları ince ve düz olup yaklaşık 1,3- 3,8 cm uzunluğundadır. Olgun ağaçlar genellikle diken içermez. Ağacın çiçekleri altın sarısı renkte, küresel başlı ve yaklaşık 1,2-1,5 cm çapındadır. Dalların ucunda bulunmaktadır. Meyveler 7-15cm uzunluğunda, olgunlaşmadan önce yeşil, olgunlaştığında yeşilimsi-siyahtır. Baklalardaki tohumlar arasında büzülmeler vardır ve bu büzülmeler, kolye görünümü vermektedir. Her bakla yaklaşık 8-12 tohum içermektedir. Tohumlar parlak, oval, sıkıştırılmış ve koyu kahverengi renktedir (Bargali ve Bargali,2009). *A.nilotica*, aşırı sıcaklıklara (>50 °C) ve nem stresine dayanabilmesi nedeniyle hem nemli hem de kurak bölgelerde yetiştirilebilmektedir (Dhabhai ve Batra, 2012). Mikro üreme ve rizobium ve mikorizal mantarlarla simbiyotik ilişki, onu toprak verimliliğini artırmak için önemli türlerden biri yapmaktadır. Tohumların çimlenmesi ve düğüm eksplantlarından yardımcı tomurcuk indüksiyonu yoluyla yayılmaktadır (Jangade, Nagargoje, ve Shirote, 2014; Vengadesan ve diğerleri, 2002). Bitkinin taksonomi

sınıflandırması Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bitkiye ait görseller şekil 2.1 ve şekil 2. 2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *Acacia nilotica'nın* taksonomi sınıflandırılması (Aslam ve diğerleri, 2014)

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Super division	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Rosidae
Order	Fabales
Family	Fabaceae
Genus	*Acacia*
Species	*Acacia nilotica*



Şekil 2.1. *Acacia nilotica* bitkisi



Şekil 2.2. *Acacia nilotica* bitki yaprakları

2.4.2. Kimyasal bileşenler

A. nilotica, tanenler terpenoidler, ham protein kaempferol, alkaloidler, fenoller, uçucu yağ, steroidler, oleozinler, terpenler, reçineler saponinler, steroidler, triterpenoid ve flavonoidler içermektedir. Bitki flavonoidler ve fenolik asitler açısından oldukça zengindir. *A. nilotica* kabuğunun etanolik özü, kateşin, gallik, kafeik ve ellagik asitler, kersetin, alkaloidler, glikozitler, tanenler ve diğer farklı polifenolleri içermektedir. Bitkinin yaprakları tanenler ve proteinler açısından zengindir. Bitkinin yapraklarının fitokimyasal analizi, kloroformik özütünün polifenoller, fitosteroller, sabit yağlar ve katı yağlar içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Sulu ekstrakt, saponinler, fenolik asitler ve flavonoidler içerirken, etanol ekstraktı, sulu ekstraktın tüm bileşenlerine ek olarak sabit yağlar içermektedir (Aslam ve diğerleri, 2014).

2.4.3. Etnofarmakoloji

Bitkiler, antik çağlardan beri umut verici ilaç kaynakları olarak bilinmektedir ve Ayurvedik, Unani, Çin ve diğer tıp sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Şimdiye kadar tanımlanan zengin şifalı bitkiler arasında *Acacia nilotica*'nın bakteriyel, fungal, viral, amebik, lökodermal hastalıklar, kanama yığınları, hipertansiyon, hemoroid, kanser, tıkanıklık, menstrüel problem ve kulak ağrısı gibi çeşitli rahatsızlıklara/hastalıklara karşı dikkate değer bir terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Singh ve diğerleri, 2009).

Geleneksel olarak, ağız, kemik ve cilt kanserinin birçok türünü tedavi etmek için kullanılmıştır. Batı Afrika'da *A.nilotica* bitki parçaları kulak, göz ve testis tümörleri/kanserleri, tüberküloz (kökler), çiçek hastalığı (odun), ülserler (yapraklar) ve karaciğer ve dalak (kabuk ve sakız) sertleşmesinin tedavisinde kullanılmıştır (Kalaivani ve Mathew, 2010). Güney Mısır'daki Nubyalılar, kan şekeri düzeylerini düzenlemede etkili olduklarından ve şeker hastalığını tedavi etmek için halk hekimliğinde kullanımını kanıtladıklarından, şeker hastalarının toz haline getirilmiş *A. nilotica* kapsülleri ile tedavi edilebileceğine inanmaktadır. Meyve özü kaynatma, Nijerya'nın Katsina eyaletinde doğum sonrası yara iyileşmesi için kullanılmaktadır (Kankara ve diğerleri, 2015). Yemen'in Yerel Tıbbında yapraklar, yaraların iyileştirilmesinde, farenjit, bronşit ve diyabet tedavisinde kullanılmıştır (Ali ve diğerleri, 2012).

2.4.4. Farmakodinamik çalışmalar ve potansiyel uygulamalar

- Antioksidan aktivite

A. nilotica'nın farklı bileşiklerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Metanol ekstraktından elde edilen Kaempferolün *in-vitro* testinden elde edilen sonuçlar, DPPH testi için 1–50 µg/ml ve deoksiriboz bozunma testi için 1–100 µg/ml konsantrasyon aralığında güçlü doza bağlı olarak antioksidan aktivitesi göstermiştir (Singh ve diğerleri, 2008). Kök kabuğu özünden elde edilen Umbelliferon, daha yüksek konsantrasyonlarda aktivitede daha fazla artış olmadan doza bağlı bir şekilde 100 µg/ml'lik bir konsantrasyona kadar antioksidan etkiler göstermiştir (Singh ve diğerleri, 2010). Singh ve diğerlerinin (2009) yaptığı çalışmada, sekiz farklı yeşil meyve ekstraktının etkin ve güçlü *in-vitro* ve *in-vivo* ağır metal kaldırma işlemi ve ayrıca serbest radikal süpürme aktivitesi için değerlendirilmiştir. Ekstraktlarda bulunan polifenoller, genel antioksidan potansiyellerinden sorumlu tutulmuştur. Son zamanlarda, *A.nilotica* yaprak özütü ile oksidatif strese karşı *in-vitro* DNA koruması çalışmasından elde edilen sonuçlar, bir gram yaprak özütünün süpürme potansiyeli açısından 20 mg etil galata eşdeğer olduğunu göstermiştir (Mohan ve diğerleri, 2014). *A.nilotica*'nın etanol yaprak tozu ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Aslam ve diğerleri, 2014). Ekstraktın fraksiyonlanmasıyla ekstraktın süpürme aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca, genç yaprak ve ağaç kabuğu ekstrelerinin *in-vitro* antioksidan aktivitesi (β karoten-linoleat modeli ve DPPH yöntemi) ve toplam fenolik içeriği (Folin Ciocalteu yöntemi) değerlendirilmiştir. Ekstraktlar arasında hem yaprak hem de kabuğun aseton ekstraktının en yüksek aktiviteyi sergilediği ve tannik asit ile karşılaştırılabilir olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, antioksidan aktivitenin toplam fenolik içerik miktarı ile uyumlu olduğunu göstermiştir (Sundaram ve Mitra, 2007). Son zamanlarda meyve ekstraktın antioksidan potansiyeli Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi açısından araştırılmış ve toplam polifenol içeriğine uygun bulunmuştur (Abuelgassim, 2013). Abdel-Farid, Sheded, ve Mohamed (2014) yaptığı çalışmalarında yaprak, çiçek ve meyvenin metanolik ekstraktları, 100 mg/ml'lik bir doz seviyesinde DPPH serbest radikal süpürme ve indirgeme gücü açısından güçlü antioksidan aktivite göstermiş ve en yüksek aktivitenin yaprak ve meyve ekstraktlarında sırasıyla %65,86 ve %63,86 ile gösterilmiştir. Aynı

çalışmada çeşitli ekstraktlar arasında 76,14 mg/ml ve 78,18 mg/ml olan en düşük IC50 değerleri yaprak ve meyve ekstraktlarında bulunmuştur (Abdel-Farid, Sheded, ve Mohamed 2014).

- Anti-kanser ve anti-mutajenik özellikler

A. nilotica'nın bileşikleri ve özleri antikanser/antimutajenik etkilere sahiptir. Ana etkili bileşenlerin *Acacia* sakızları ve çiçek özleri olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmada, sakız, çiçek ve yaprakların sulu ekstraktlarının antikanser aktivitesine 7,12-dimetilbenz(a) antrasen (DMBA) kaynaklı cilt papilloma oluşumu üzerinde erişilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, oral gavaj yoluyla sulu ekstrakt ile tedavi edilen farelerde toplam kromozomal anormalliklerde (kromatid kırılmalar, merkezli halkalar, disentrikler, asentrik parçalar ve değişim) bir azalma ile mikroçekirdek sıklığında önemli bir azalma gözlenmiştir (Meena ve diğerleri, 2006). Bir başka çalışmada, Kabuk ekstraktının kemopreventif aktivitesi, haftalık CCl_4 subkutan enjeksiyonları (3 ml/kg. b.w. 6 hafta) ile indüklenen Hepatoselüler Karsinom (HCC) ile tek intraperitoneal N-nitrosodietilamin (NDEA, 200 mg/kg) enjeksiyonuna karşı sıçan modellerinde incelenmiştir. Sonuçlardan, *A. nilotica* kabuk ekstraktının lipid peroksidasyonunu önlediği ve N-nitrosodietilamin kaynaklı hepatokarsinogenez sırasında enzimik ve enzimik olmayan antioksidan savunma sistemini desteklediği gösterilmiştir (Singh ve diğerleri, 2009). Bir başka çalışmada ise, meme ve akciğer kanseri hücre hatlarında yaprak ekstraktından elde edilen γ-Sitosterolün hücre büyümesi, hücre parçalanması ve hücre döngüsü durması üzerindeki inhibitör etkileri, MCF-7 ve A549 hücrelerinde incelenmiştir ve sırasıyla 493,3 ± 15,2 ve 696,6 ± 11,5 μg/ml IC50 değerleri belirlenmiştir (Sundarraj ve diğerleri, 2012).

- Anti-platelet toplayıcı ve anti-diyabetik aktivitesi

Shah ve diğerlerin (1997) yaptığı çalışmalarında *A. nilotica* metanol meyve ekstraktlarının, trombosit agonistleri (araşidonik asit, ADP, trombosit aktive edici faktör ve kollajen) ve Ca^{+2} iyonoforunun aracılık ettiği trombosit agregasyonunun doza bağlı bir şekilde (0,21–1,4 mg/ml) bloke edildiğini göstermişlerdir. Yukarıdaki çalışmanın sonuçları, aktivitenin esas olarak Ca^{+2}+ giriş blokajına bağlı olduğunu göstermektedir, ancak kanıtlar, protein kinaz C'nin katılımını da göstermektedir. Ayrıca, streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda *A.nilotica* sulu metanol yaprağı ekstresi, gliburid gibi hipoglisemik ve anti-trombosit agregasyon aktivitesi ile sonuçlanmıştır (Jeong ve diğerleri, 2011). Çalışmada *A.nilotica* uygulaması ile diyabetik hayvan modellerinde kan şekeri seviyesinin 132,23 ± 26,68'den 106,17 ± 10,92'ye düştüğü gözlemlenmiştir (Kumari, Jain ve Dave, 2014). Yetişkin erkek albino sıçan modellerinde α-amilaz inhibisyon tekniği kullanılarak *A. nilotica* sıcak su ekstraktı fraksiyonlarının hipoglisemik etkilerinin *in-vitro* koşullarından elde edilen sonuçlar, bitki ekstraktının α-amilazı inhibe etmediğini göstermiştir ve bu da hipoglisemik aktivitenin amilaz inhibisyonundan kaynaklanmadığını doğrulamıştır. Çalışmada sulu meyve özütünün oral yoldan verilmesinden sonra plazma glukoz seviyesinde %70'lik bir düşüş görülmüştür (Rather ve Mohammad, 2015). Ham metanol yaprak ekstraktı ve sulu fraksiyonlarının (500 ve 1000 mg/kg) alloksan ile indüklenen diyabetik wistar sıçanlarının karaciğer enzimleri ve lipid profilleri üzerindeki etkisinin araştırılmasından elde edilen deneysel sonuçlarda, serum toplam kolesterol düzeyi 61,30 ± 4,69 mg/dl, serum triaçilgliserol seviyesi 133,60 ± 8,21 mg/dl ve serum yüksek yoğunluklu lipoprotein seviyesi 91,70 ± 1,80 mg/dl olarak belirlenmiştir, bu parametreler diyabetik kontrol grubunda ise sırasıyla, 84,17 ± 2,77, 169,7 ± 8,54 ve 62,90 ± 5,89 mg/dl şeklindedir (Tanko ve diğerleri, 2014). Başka bir çalışmada, sulu meyve ekstraktının (400-800 mg/kg) ve fraksiyonlarmış kısımlarının (800 mg/kg etil asetat ve N-butanol) hipoglisemik etkileri wistar albino sıçan modellerinde incelenmiştir. Deneysel sonuçlar, hipoglisemik etkinin flavonoidlerin ve saponinlerin varlığından kaynaklanabileceğini göstermiştir (Abbassy, Ibrahim, ve Gab Alla, 2018).

- Anti-inflamatuar aktivitesi

Eldeen, Van Heerden ve Van Staden (2010) yaptığı çalışmada, *A. nilotica* kabuğu etil asetat ekstraktından elde edilen bir kassan diterpen nilotikanın siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2'ye (COX-2) karşı anti-inflamatuar etkisini incelemiş ve sırasıyla 28 ve 210 μM IC50 değerleri ile seçici ve zayıf inhibitör etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bununla birlikte standart anti-inflamatuar ilaç İndometasin'in IC50 değerleri, COX1 için 3,6 μM ve COX-2 için 189 μM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, doza bağlı anti-inflamatuar aktivite, 3-β Acetoxy-17-β-hidroksiandrost-5-ene tarafından, TPA-indüklenen fare kulak ödemi'ne karşı spektral ve X-Ray kırınım teknikleri ile karakterize edilen bitkinin hava kısımlarından izole edilen bir anti-inflamatuar etkisi aktif androsten ile gösterilmiştir (Dongmo, Nguelefack, ve Lacaille-Dubois, 2005). *A.nilotica* sulu ekstraktının 100 mg/kg canlı ağırlık doz seviyesinde sıçan modellerinde carrageenan kaynaklı pençe ödemi ve maya kaynaklı pireksi üzerine ön tedavisinin inhibitör etkilerinin sonuçları, pençe ödeminde (%20) bir azalma olduğunu göstermiş bu da 1 mL sulu aspirin solüsyonu (%47) tarafından üretilenden daha az olduğu belirlenmiştir (Dafallah ve Al-Mustafa, 1996). Sulu meyve ekstraktlarının 50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı doz seviyelerinde işlenmesinden sonra, sıçanlarda karagenan kaynaklı pençe ödemi ve pamuk pelet kaynaklı granülom modellerinde değerlendirilmiştir. Sırasıyla %64,41 ve %25,62'lik maksimum inhibisyonu, 100 mg/kg ile olduğu gösterilmiştir (Rather ve Mohammad, 2015).

- Anti-diyare ve antelmintik aktivite

İsviçre albino fare modelinde baryum klorür kaynaklı peristaltik hareketleri ve hint yağı, magnezyum sülfat kaynaklı diyareye neden olan yaygın mikroorganizmalara karşı *in-vitro* anti-mikrobiyal aktiviteyi tedavi etmek için metanolik kabuk ekstraktı kullanılmıştır (Misar, Bhagat, ve Mujumdar, 2007). Agunu ve diğerleri (2005) tarafından yapılan çalışmada, farelerde perfüze izole edilmiş tavşan jejunumu ve hint yağı ile indüklenen diyare modellerinde aktivitenin, yaygın olarak kullanılan standart bir ishal önleyici ilaç olan loperamid ile karşılaştırılabilir olduğunu bulmuştur. *A.nilotica*'nın metanolik meyve ekstraktı, solucanlarda yumurtadan çıkmayı ve larva gelişimini engelleyerek doza ve zamana

bağlı antelmintik (IC50=512,86 ve 194,98 μg/ml) etkiler göstermiştir (Bachaya ve diğerleri, 2009).

- Antihipertansif ve antispazmodik aktivite

Bir çalışmada, *A. nilotica'nın* meyve ekstraktının kobay kalp kulakçıklarında, kuvvet ve spontan kasılmaların hızı üzerinde doza bağlı (0,3–3,0 mg/mL) inhibitör etki oluşturduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde konsantrasyona bağlı (0,1-3,0 mg/mL) olarak tavşan jejenumunda K^+ ile indüklenen kasılmaları da inhibe ettiği için, meyve ekstraktının aktivitesine kalsiyum kanal blokajının aracılık ettiği öne sürülmüştür. Ekstraktın potansiyelini incelemek için atropin ve fentolamin kullanılmıştır. Fentolamin, norepinefrinin (NE) vazokonstriktör etkisini ortadan kaldırırken, ekstraktın hayvan modellerinde uygulanması ile muskarinik reseptör stimülasyonu veya adrenoseptör blokajının rolünü ortadan kaldırarak NE yanıtını değiştirmediği gözlenmiştir (Gilani ve diğerleri, 1999).

- Anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivite

A.nilotica, birçok kimyasal bileşik ve özütün antimikrobiyal aktivite için değerlendirilmesinden ve kayda değer sonuçlar bulunmasından dolayı potansiyel bir antimikrobiyal ajan kaynağı olabilmektedir (Abbas ve Elhag, 2015). Kökün etil asetat fraksiyonu, 500 μg/mL konsantrasyonu ile saf antibiyotikten daha fazla antibakteriyel bileşen içeriyor gibi görünmektedir (Banso, 2009). Metanol kabuğu, yaprağı ve tohum özütü, çok çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite açısından değerlendirilmiştir. Dev De ve Singh (2014) yaptığı çalışmasında, tohum ve yaprak özütünden 5 mL MIC değeri *E. coli* üzerinde uygulandığında sırasıyla 12 ve 15,30 mm inhibisyon bölgesi vermiştir. Ek olarak, *A. nilotica* bitkisinin metanol ve sulu ekstreleri, çoklu ilaca dirençli *Salmonella typhi*'ye karşı orta düzeyde antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Rani ve Khullar, 2004). Metanol yaprak ekstresinin anti-tifo özellikleri, Widal test titre yöntemi ile farelerde *S. Typhi'ye* karşı değerlendirilmiştir. Ekstrakt ile tedavi edilen hayvanlarda Widal test titre değeri 1/40 olarak kaydedilirken, tedavi edilmeyen hayvanlarda 1/160 değeri ile ekstraktın anti-tifo ajanı olarak etkinliği kanıtlanmıştır (Rather ve Mohammad, 2015). Sulu Metanol

ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa, E.coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinliğini incelemek için *in-vitro* time kill-kinetik antibakteriyel tahlili yapılmış ve MIC değeri 0,5- 1,0 mg aralığında olan bakteriyel azalma yüzdesi olarak belirlenmiştir (Oladosu ve diğerleri, 2013).

A. nilotica, uzun süredir ağız hijyeni adjuvanı olarak kullanılmaktadır, ancak yine de *A. nilotica*'nın çoğu yaygın ağız mantarı üzerindeki anti-fungal özelliği üzerine çalışmalar eksiktir. Antifungal etkinliği araştırılan birkaç çalışmada doğrudan yaprak kullanımı ile hayvanlar üzerinde gösterilmiştir. *A. nilotica'nın* sulu ekstraktının, test edilen tüm mantarlara karşı %50 inhibisyon ile çeşitli *Aspergillus* türlerine karşı önemli antifungal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sulu ekstreler, Blitox ve Dithane M-45'e kıyaslandığında *Aspergillus niger*'in misel büyümesinde oldukça önemli inhibisyon göstermiştir (Alwan ve diğerleri, 2010). Ancak günümüzde, ağacın kabuğu, özellikle tanenler ve polifenoller olmak üzere daha yüksek miktarlarda antimikrobiyal ajanların varlığından dolayı kullanılmaktadır (Runyoro, 2006).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında, *Acacia nilotica* (L) bitkisinin yapraklarının metanolik ekstraktlarının antikanser potansiyellerinin belirlenebilmesi için, sitotoksite testi olarak XTT ve Klonojenik testi, hücre ölüm modunun belirlenebilmesi için Annexin-V, DNA hasarlarının belirlenebilmesi için Komet yöntemi ve DNA hasar etmenlerinin belirlenebilmesi için hücre içi ROS testleri uygulanmıştır.

3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1 de, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

Ekipman	**Marka/Model**
Soğutmalı santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	ELEKTRO.MAG-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80'i
Işık mikroskobu	NIKON-ECLİPSE E100
Komet yazılımı	KAMERAM 21
Elektroforez güç kaynağı	PEQLAB-REQPOWER 300
Elektroforez tankı	CLEAVER SCİENTİFİC
Mikroplaka okuyucu	BİO TEK, ELX800 U.S. A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
Manyetik Karıştırıcı	ISOTEX
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Fluoroskan Ascent FL Microplaka Florometre ve Luminometre	THERMO SCİENTİFİC
Muse cell analyzer	LUMİNEX/0500-3115
Co_2 inkübatörü	PANASONİC/MCO-18UVS3-PA

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

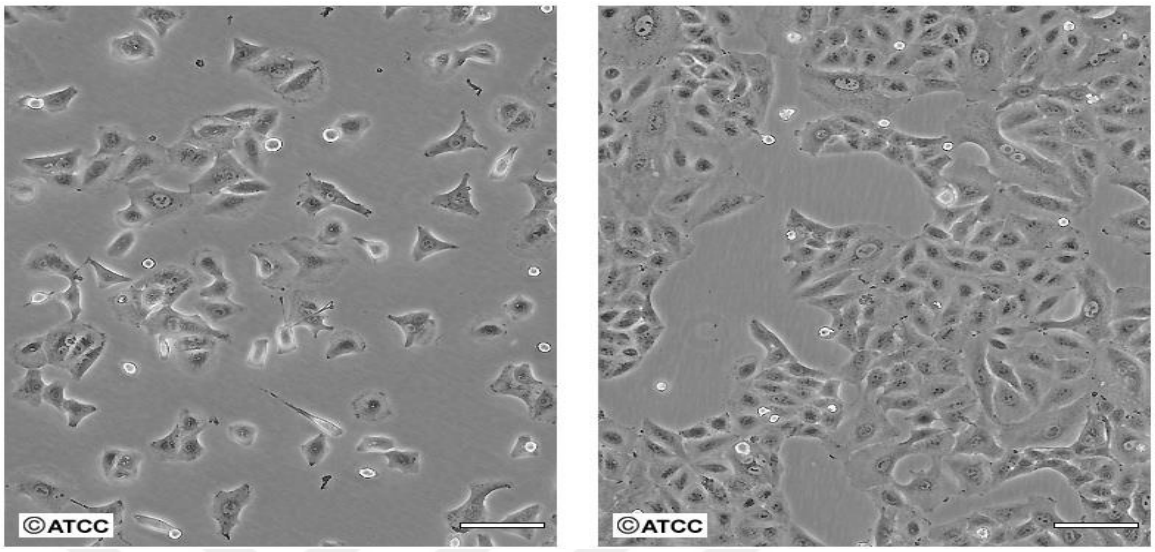
Sarf Malzeme	**Firma/ Katalog No**
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/ DRAGON MED LEVO PLUS
Steril 15 ml'lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting Agaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA	SİGMA/4091-99-0
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576
Cosmasie Brillant blue G-250	7815 SIGMA BRİLLİANT BLUE G 250

3.2. Kullanılan Hücre Hatları

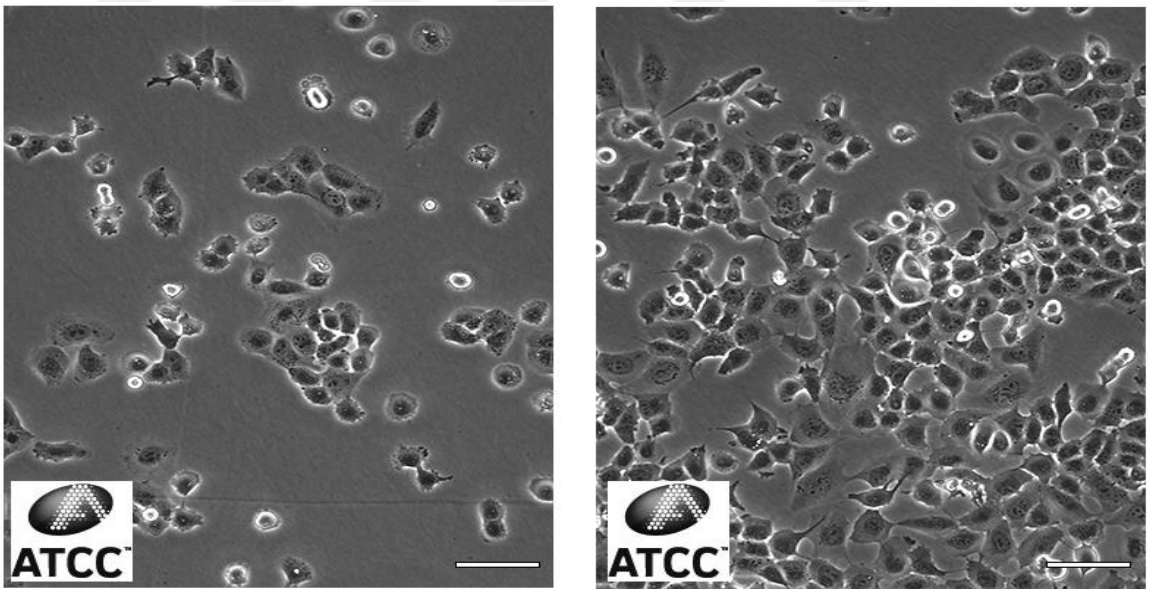
Çalışmada, İnsan akciğer kanser hücre hatları A549 (ATCC® CCL-185™) ve NCL-H1299 (CRL-5803^{TM}) (Şekil 3.1 ve 3.2.) kullanılmıştır. Hücreler havalandırmalı T75 flasklar içinde 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübe edilmiştir. Besiyeri içeriği: 500 ml RPMI Medium + 60 ml FBS (fetal bovine serum) + 3 ml L- glutamine, 6 ml penisilin-streptomisin, 6 ml sodyum pirüvattan oluşmaktadır. Hücrelerin karakterizasyonları Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. H1299 ve A549 hücre hatların karakterizasyonları ("American Type Culture Collection" [ATCC], t.y.)

Hücrelerin özellikleri	H1299	A549
Büyüme özellikleri	Yapışık	Yapışık
Türetme	Hücre hattı, daha önce radyasyon tedavisi almış bir hastadan alınan akciğerin lenf nodu metastazından oluşturulmuştur.	Bu hücre hattı 1972 yılında D.J. Giard ve arkadaşları tarafından eksplant kültürü yoluyla akciğer kanserli olan hastanın akciğer dokusundan üretilmiştir.
Morfoloji	Epitel	Epitel
Yaş	43 yıl	58 yıl
Etnik köken	Beyaz	Beyaz
Cinsiyet	Erkek	Erkek
Metastatik	Lenf düğümü	Yok
Gen ekspresyonu	P53 proteininin ekspresyonundan yoksundur.	P53 proteininin ekspresyonu aktiftir
Hastalık	Karsinom; Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	Karsinom; Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
Yorumlar	Hücreler, p53 proteininin homozigot kısmi delesyonuna sahiptir ve p53 proteininin ekspresyonundan yoksundur.	



Şekil 3.1. A549 hücre hattı (“ATCC”, t.y.)



Şekil 3.2. H1299 hücre hattı (“ATCC”, t.y.)

- Hücrelerin pasajlanma prosedürü

Flasklardaki besiyeri uzaklaştırılır. Bu işlem esnasında hücreler flask yüzeyine yapışık olduklarından hücreler flask tabanından ayrılmazlar. Daha sonra hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanıp PBS, flasktan uzaklaştırılır. Bu işlemden sonra flasklara tripsin eklenerek inkübatöre de 2- 3 dk bekletilir, bu işlem flask tabanına yapışmış hücrelerin flasktan ayrılmasını yardımcı olur. Tripsin etkileşiminin durdurulması için eklenilen tripsin miktarı kadar besiyeri eklenir ve hücreler 15 ml'lik tüplere toplanarak +4 ^{0}C'de 2500 rpm de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj edildikten sonra tüpteki süpernatant atılarak hücreler süspanse edilir. Besiyerleri yeni flasklara eklenmesinden sonra hücre süspansiyonundan alınan hücreler flasklara aktarılır.

3.3. Kullanılan Bitki Ekstraktının Elde Edilmesi

Acacia nilotica (L.) bitkisinin yaprakları ÇAD Cumhuriyeti, Vadday Bölgesi, Abbeşe İlinde bulunan aktarlardan Ekim 2020 yılanda satın alınmıştır.

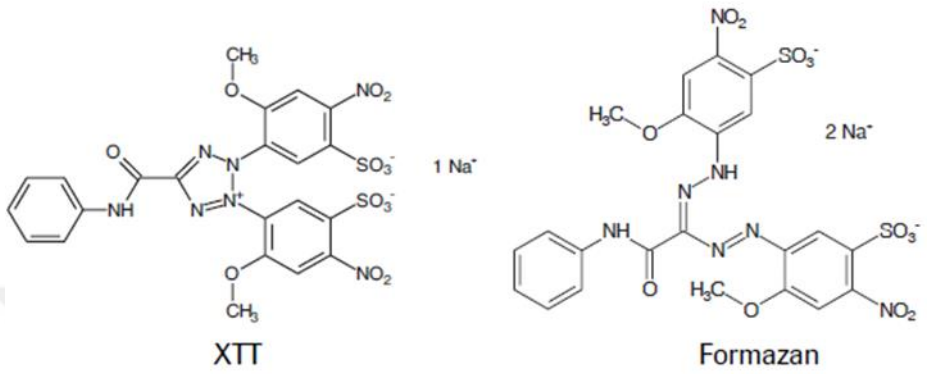
- Bitki ekstraktının hazırlanması:

Acacia nilotica (L.) bitkisinin yapraklarını havada kurutulduktan sonra (8,18 g) saf metanol (200 mL) kullanılarak Soxhlet cihazı ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Muamele sonunda elde edilen ekstraktlardan alkolün fazlası döner evaporatör ile uzaklaştırmıştır, kalan ekstraktlar desikatör içerisinde kurutulduktan sonra %2,5 DMSO çözücü ile çözünerek kullanılmıştır.

3.4. XTT Testi

Hücresel çoğalma ve canlılığın belirlenmesi için çok çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. XTT test yöntemi sarı renkli XXT (2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilit tuzu) tetrozolyum tuzunun (XTT) metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından portakal renkli formazan boyasına ayrılmasına dayanmaktadır. Bu transformasyon sadece canlı hücrelerde oluşur. Sulu çözeltilerde formazan boyalar çözünebilir ve doğrudan

spektrofotometre tarafından ölçülebilmektedir. Bu şekilde ortamdaki canlı hücre miktarı belirlenebilmektedir (Scudiero ve diğerleri, 1988; Roehm ve diğerleri, 1991).



Şekil 3.3. Canlı hücrelerde XTT metobolizasyonu sonucunda suda çözünebilen formozan oluşumu ("Merck", t.y.)

- XTT Testi Protokolü;

Yöntem, XTT hücre proliferasyon kit (Biological Industries, BI) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kültüre edilen hücreler flasklarda %80 doluluğa ulaştığında 96 kuyucuklu platelere 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 37 °C ve %5 CO_2 ortamlı inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra besi yeri değiştirilecek. *Acacia nilotica* ekstiraktlarından 100 ile 800 µg/mL arasında değişen farklı konsantrasyonları ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırarak PBS ile yıkanmış ve 100'er µL yeni besiyeri eklenmiştir. Her bir kuyucuğa aktive edilmiş XTT solüsyonu eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikroplaka okuyucu ile 450nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir.

% hücre canlılığı = (1- Absorbans (muamele grubu) / Absorbans (kontrol grubu)) x100

Formülü kullanılarak % hücre canlılığı hesaplanmış ve proliferasyon eğrisi çizilmiştir. Proliferasyon eğrisinin denkleminden IC50 değerleri hesaplanmıştır.

3.5. Klonojenik Testi

Klonojenik test, bir hücrenin koloni oluşturacak şekilde çoğalma ve sürekli bölünme yeteneğinin korunmasına dayanmaktadır. Bu şekilde çoğalan hücreler klonojenik hücre denir. Klonojenik testi, ilk kez radyasyon etkilerini incelemek amacıyla geliştirilmiş olsa da günümüzde yaygın olarak farklı tür ajanların etkilerini denetlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Bu testte yeterince bölünmeyen hücreler ölü olarak kabul edilir. Bunun için koloni sayımı yapılırken 50 hücreden daha az sayıda hücre içeren koloniler sayımlara dahil edilmemiştir (Munshi ve diğerleri, 2005; Franken ve diğerleri, 2006).

- Klonojenik test protokolü:

Flasklarda kültüre edilmiş hücrelerin %80 doluluğa ulaştığında 50000 hücre/ T25 flasklara deney gruplarını oluşturacak şekilde aktarılmıştır. 48 saat inkubasyona bırakılan hücreler süre sonunda *Acacia nilotica* ekstraktlarının 100 ile 800µg/ml farklı konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir deney grubundan ayrı ayrı 4 tane 60 mm'lik petriye 500 canlı hücre aktarılmıştır. Ardından petriler 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip olan inkübatörde inkübe edilmiştir. Petrilerdeki hücrelerin koloni oluşturulmasına kadar her gün petriler invert mikroskopta kontrol edilmiş petri kaplarındaki koloniler belirli bir büyüklüğe ulaştığında (yaklaşık 7-8 gün sonunda) petrilerden besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında hücrelere saf etil alkol ile 5 dakika muamele edilerek petri kaplarına fikse edilmiştir. Ardından kristal viyole boyası ile boyama işlemini gerçekleştirilmiştir. Her bir petrideki koloniler sayılmıştır. Yüzde hayatta kalma oranı aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

% canlılık = Petri başına ortalama koloni sayısı / Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı x 100

IC50 Değeri, XTT testinde benzer şekilde elde edilen grafikten hesaplanmıştır.

3.6. Komet Testi

Komet testi, hücrelerde oluşabilecek DNA hasarını belirlemek için kullanılmıştır. Yöntemin temel prensibi, elektroforetik alanda agaroz jeldeki tek hücreli DNA'nın migrasyonuna dayanmaktadır. Bu sebeple ilk önceleri, tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel

Electrophoresis SCGE) olarak adlandırılan yöntem fragmente olmuş DNA'nın non fragmente DNA'dan ayrılmasına izin vermektedir. Bu sayede birçok çeşit DNA hasar ürününün yöntem ile belirlenmesi mümkündür. Mikroskop görüntüsü, çekirdeği içeren büyük bir kafa ve DNA parçaları içeren bir kuyruktan oluşması bakımından bir kuyruklu yıldıza benzemektir onun için Komet yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Collins ve diğerleri, 2008; Çavaş ve Könen, 2008; Piperakis, 2009)

- Komet testi protokolü:

Hücreler 25cm^{2}lik flasklarda 25000 hücre / flask olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat inkübe edilmiştir. Süre bittiğinde PBS ile yıkanmış ve yeni besiyeri eklenmiş flasklarda her bir hücre hattı için ayrı ayrı, XTT testi ile belirlenmiş olan IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 konsantrasyonlarındaki *Acacia nilotica* ekstraktları ile 24 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda her bir flasktan hazırlanmış hücre süspansiyonları düşük erime sıcaklıklı agaroz (LMA) ile karıştırılmıştır ve önceden agaroz ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. LMA'nın polimerleşmesi beklendikten sonra agaroz katmanları içerisindeki hücreler bir gece lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10mM Tris base, pH 10, 1% Triton X ve %10 DMSO) inkübe edilmiştir. Süre bittiğinde lamlar karanlık ortamda, 4^{o}C' de alkali elektroforez tamponu (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH≥13) içinde 30 dakika bekletilmiş ardından, 25V, 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi bittiğinde lamlar 5 dakika süre ile nötralizasyon tamponunda nötralize edilmiştir (0.5 M Tris–HCl, pH 7.5). Kurutulan lamlar %70 lik etanol ile fikse edilmiş ardından etidyum bromür (20 µg/ml) ile boyanmış ve floresan mikroskop (Nikon eclipse i80 marka) ile her bir deney grubu için 100'er adet komet görüntüsünün fotoğrafı çekilmiştir. Bu fotoğraflar, mikrosistem komet yazılımı kullanılarak, komet çalışmalarında değerlendirilmesi önerilen üç parametre olan; Olive Kuyruk Momenti (OTM), Tail DNA (Kuyruk DNA%) ve Tail length (Kuyruk uzunluğu (µm)) parametreleri değerlendirilerek DNA hasar miktarı belirlenmiştir.

3.7. Annexin-V Testi ile Apoptozun Belirlenmesi

Apoptoz esnasında meydana gelen hücresel değişikliklerden biri, fosfatidilserinin dış zar yüzeyine yer değiştirmesidir. Apoptozisin ilk aşamalarında meydana gelen bu translokasyon

daha sonra membran bütünlüğünü bozmaktadır. Membran dışına yer değiştirmiş olan fosfotidil serine yüksek afinite göstererek bağlanabilen aynı zamanda FITC gibi floresans madde ile işaretlenebilen Annexin – V apoptozisin tayin etmesinde sıklıkla kullanılan bir moleküldür (Martin ve diğerleri, 1995; Rudin ve Thompson, 1997; Gatti ve diğerleri, 1998; Overbeeke, 1998; Tesarik ve diğerleri, 1998). 7-Aminoaktinomisin-D (7-AAD) aktinomisinden kökenlenmiş DNA'da GC bölgelerine bağlanmış olan floresans özellikli bir moleküldür. Erken apoptotik hücrelerde hücre zarının geçirgenliği geç apoptotik hücrelere göre daha düşük olduğundan, geç apoptotik hücrelerde DNA'ya bağlanan 7-AAD miktarı daha yüksektir (Zembruski ve diğerleri, 2012).

- Annexin-V test Protokolü:

Hücre ölüm mekanizmasının apoptotik yolak ile olup olmadığının belirlenebilmesi için Muse Annexin V & Dead Cell Kiti (Millipore, Almanya) kullanılmıştır. Bu kit temelde, hücrelerdeki Annexin-V ve 7-AAD ile işaretleme yapılmış moleküllerin floresans olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Böylece erken ve geç apoptotik hücreler normal hücrelerden ayırt edilebilmektedir.

Deney setlerini oluştururken hücreler 25000 hücre/flask olacak şekilde 25cm^2 lik flasklara ekilmiştir ve 24 saat inkübe edilmiştir. Süre bittiğinde her bir hücre hattı ayrı ayrı, *Acacia nilotica* ekstlarının XTT testi ile belirlenmiş ortalama IC50, IC75 ve IC90 değerleri ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Sürenin sonunda deney gruplarından 500 hücre/µl olacak şekilde süspanse edilmiştir bu süspansiyon 1:1 oranında 1 Annexin V & Dead Cell Assay kit çözeltisi ile karıştırılmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında ve ışık görmeyen ortamda bekletilmiştir ve Muse Cell Muse® Cell Analyzer (Millipore, Almanya) kullanılarak hayatta kalan hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve ölü hücre yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.8. ROS Testi

Önemli DNA hasar etmenlerinden biri hücrenin içinde oluşan Reaktif Oksijen Türleridir (ROS). *Acacia nilotica* ekstraktların hücre içi ROS oluşturma potansiyelleri Hücre içi ROS

testi olarak adlandırılan yöntem ile araştırılmıştır. Yöntemde; 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)'nın hücre içerisine girerek hücresel esterazların etkisi ile 2',7'-dichlorodihydrofluorescin (DCFH)'e dönüştürülür DCFH hücre içerisindeki ROS varlığına bağlı olarak çok hızlı bir şekilde oksitlenir ve 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) ye dönüşmektedir. DCF'nin yüksek derecede floresan özelliği bulunmaktadır. Hücrelerdeki floresans miktarı ROS miktarı ile orantılıdır. Bu nedenle floresans miktarı belirlendiğinde hücre içerisindeki ROS miktarı da belirlenmiş olacaktır (Pogue ve diğerleri, 2012).

- ROS Testi Protokolü:

Kültürlenen hücreler, 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu siyah platelere ekilmiş ve 37 °C ve %5 CO2 ortama sahip olan bir inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda besiyeri değiştirerek hücreleri 2 kez PBS ile yıkanmıştır. 0,5 mM DCFH-DA stok çözeltisi DCFH-DA 'nın RPMI' da çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Bu stoktan 1:9 oranında seyreltme yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100'er µL eklenmiş ve 37 C'de 120 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edildikten sonra hücreler 2 kez PBS ile tekrar yıkanmıştır böylece hücre içerisine girmemiş olan DCFH-DA ortamdan uzaklaştırılmıştır. DCFH-DA yüklenmiş hücreler, *A. nilotica* ekstraktlarının XTT testi ile belirlenen IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Platelerde floresans miktarı 480 nm/530 nm'de florometrik plaka okuyucuda 24 saat belirli aralıklarla kinetik olarak okunmuştur. Elde edilen RFU (Relative fluorescence units) değerleri ekstraktlarımızın ROS oluşturma potansiyeli yansıtmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrar olarak gerçekleştirilmiştir sonuçlarda bu verilerin ortalama değerleri ve standart sapma değerleri verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 23 paket programıyla gerçekleştirilmiştir. Analizlerde One way ANOVA ardından Tukey, Tamhane veya Mann Whitney U testlerinden uygun olalar verilerin normal dağlım gösterip göstermemesine ve/veya varyansların homojenliğine bağlı olarak seçilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. XTT Test Bulguları

Tez çalışmasında kullanılan *A. nilotica* bitki metanolik yaprak ekstraktın sitotoksik etkisini belirlenmesi için XTT testi uygulanmıştır. *A. nilotica* metanolik ekstraktının 100 µg/ml ve 800 µg/ml arasında değişen konsantrasyonları 24 saat süre ile A549 ve H1299 hücrelerine uygulanmıştır. Ekstraktların bu hücre hatlarındaki $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri hesaplanmıştır. Deneylerin ortalama değerlerinden elde edilen IC değerleri Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

4.1.1. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitkisinden elde edilen XTT bulguları

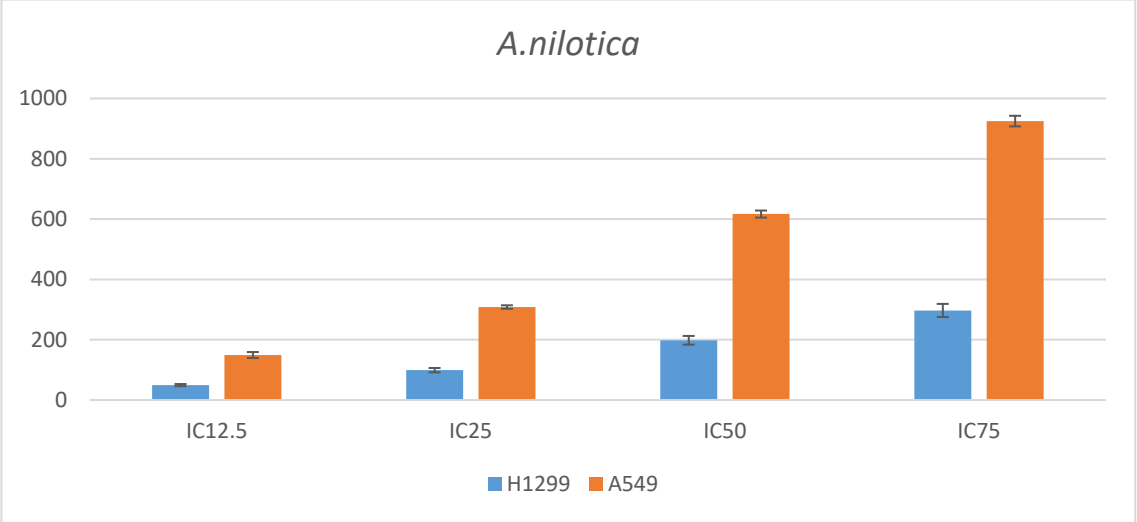
A549 hücre hattının *A. nilotica* bitki ekstraktı ile 24 saat muamele sonucundan elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla; 149,33 ± 9,77 µg/mL, 308,33 ± 5,85 µg/mL, 616,67 ± 11,71893 µg/mL ve 925 ± 17,57 µg/mL olarak hesaplanmıştır. A549 hücre hattının *A. nilotica* bitkisinde elde edilen XTT bulguları Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

4.1.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitkisinden elde edilen XTT bulguları

H1299 hücre hattının *A. nilotica* bitki ekstraktı ile 24 saat muamele sonucundan elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla; 49,5 ± 3,62 µg/mL, 99,02 ± 7,24 µg/mL, 198,05 ± 14,48 µg/mL ve 297,06 ± 21,73 µg/mL olarak hesaplanmıştır. H1299 hücre hattının *A. nilotica* bitkisinde elde edilen XTT bulguları Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. A. *nilotica* bitki ekstraktın A549 ve H1299 hücre hatlarında IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 değerleri, ± standart sapmayı ifade etmektedir

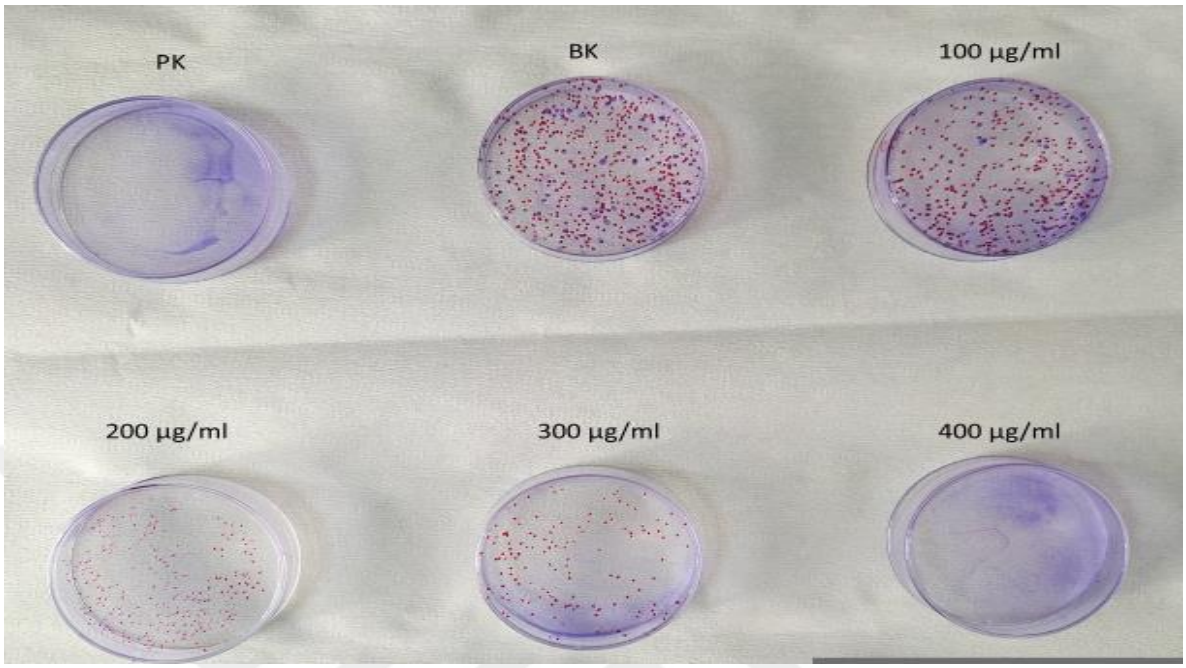
Dozlar	H1299	A549
IC12.5	49,5 ± 3,62 µg/ml	149,33 ± 9,77 µg/ml
IC25	99,02 ± 7,24 µg/ml	308,33 ± 5,85 µg/ml
IC50	198,05 ± 14,48 µg/ml	616,66 ± 11,71 µg/ml
IC75	297,06 ± 21,73 µg/ml	925 ± 17,57 µg/ml



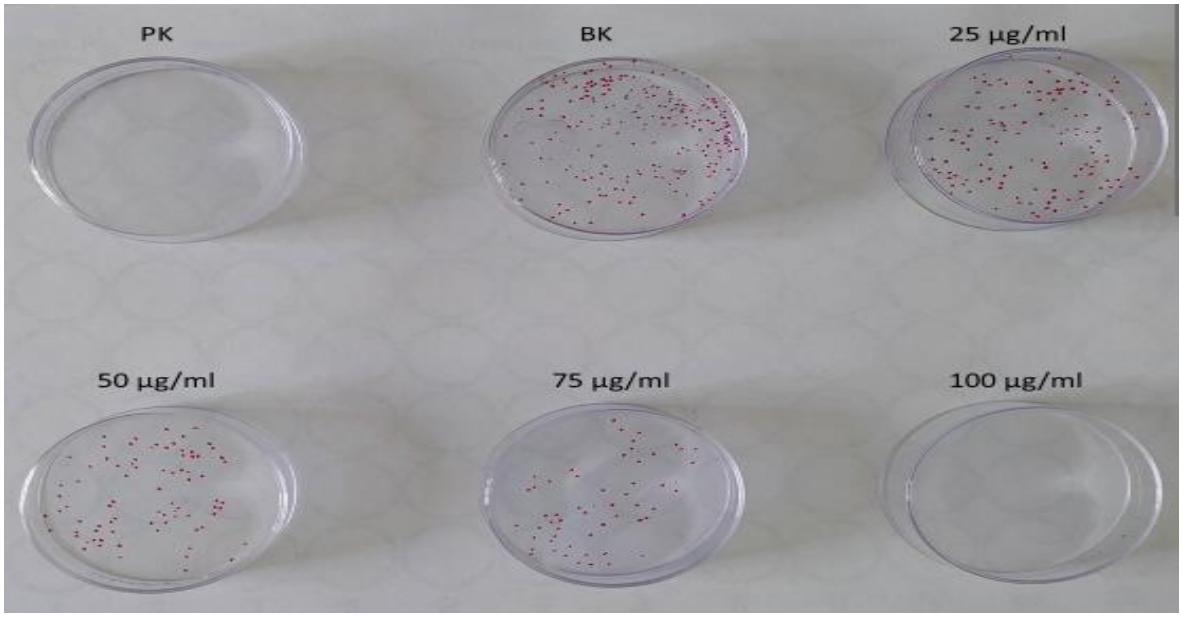
Şekil 4.1. *A. nilotica* bitki ekstraktın A549 ve H1299 hücre hatlarında IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 değerleri; Hata çubuklarında standart sapmaları belirtilmiştir

4.2. Klonojenik Test Bulguları

Klonojenik test sonucu elde edilen bulgular için örnek petri görüntüleri şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.



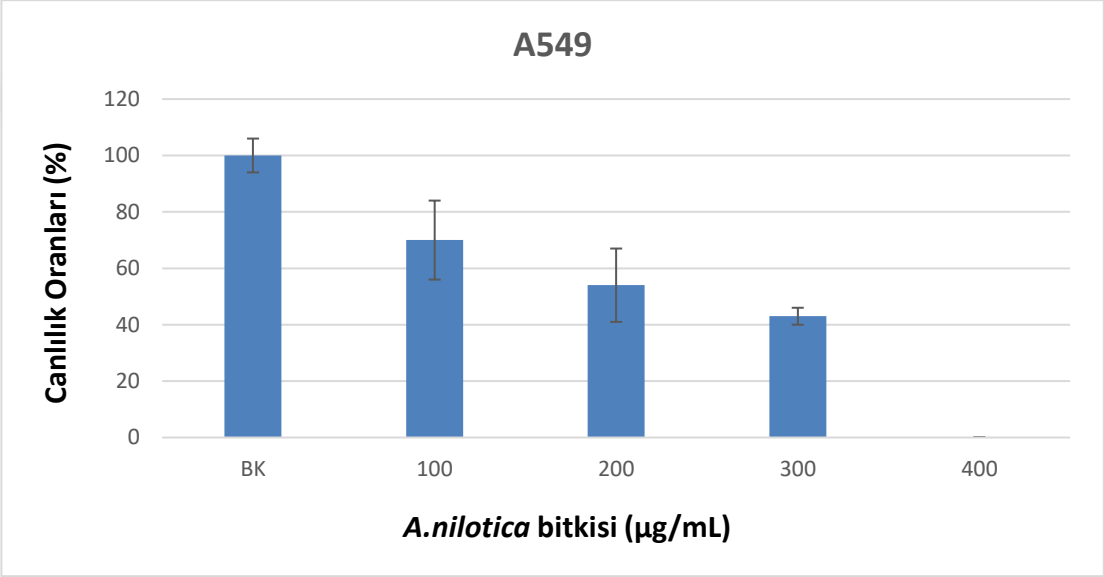
Şekil 4.2. *A. nilotica* bitki ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları



Şekil 4.3. *A. nilotica* bitki ekstraktına maruz bırakılan H1299 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları

4.2.1. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen klonojenik test bulguları

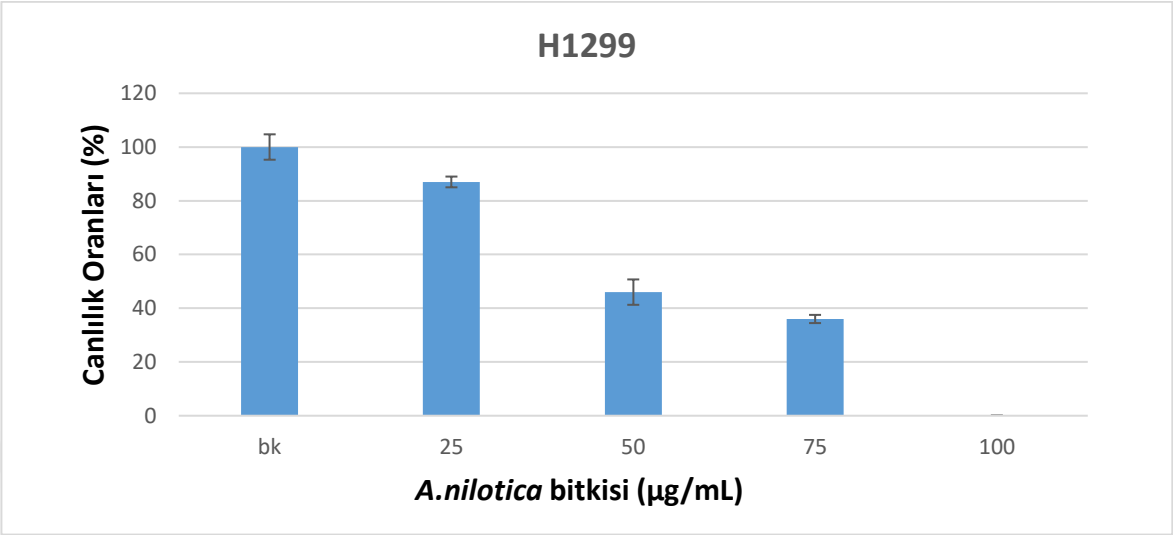
A549 hücre hattı *A. nilotica* bitki ekstraktının 100 µg/mL ve 800 µg/mL arasında farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Muamele sonucunda elde edilen IC50 değeri 212,66 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Canlılık yüzdesi ve standart sapmaları Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *A. nilotica* bitki ekstraktın maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları

4.2.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen klonojenik test bulguları

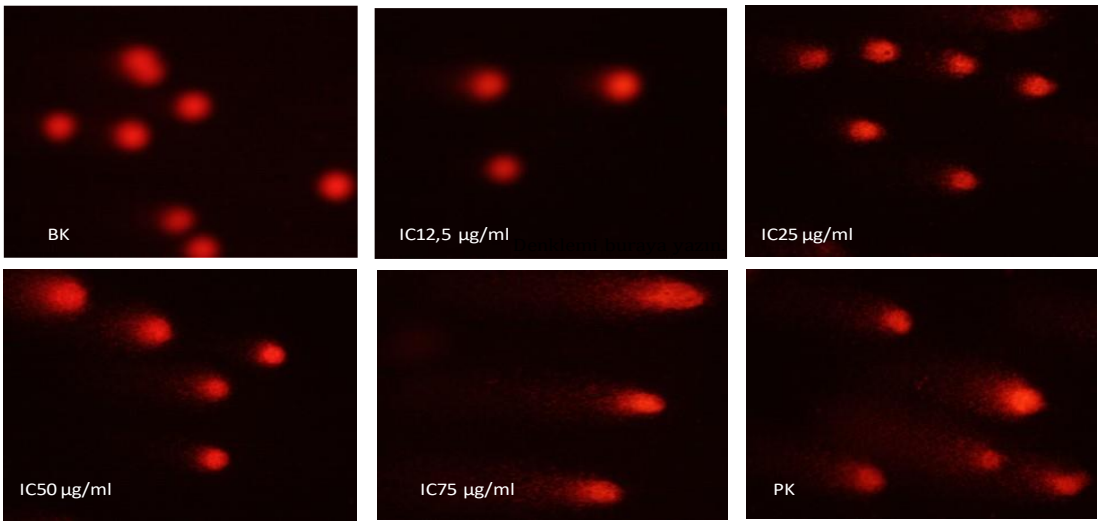
H1299 hücre hattı *A. nilotica* bitkisinin 25 µg/mL ve 100 µg/mL arasında farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Muamele sonucunda elde edilen IC50 değeri 56,06 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Canlılık yüzdesi ve standart sapmaları Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



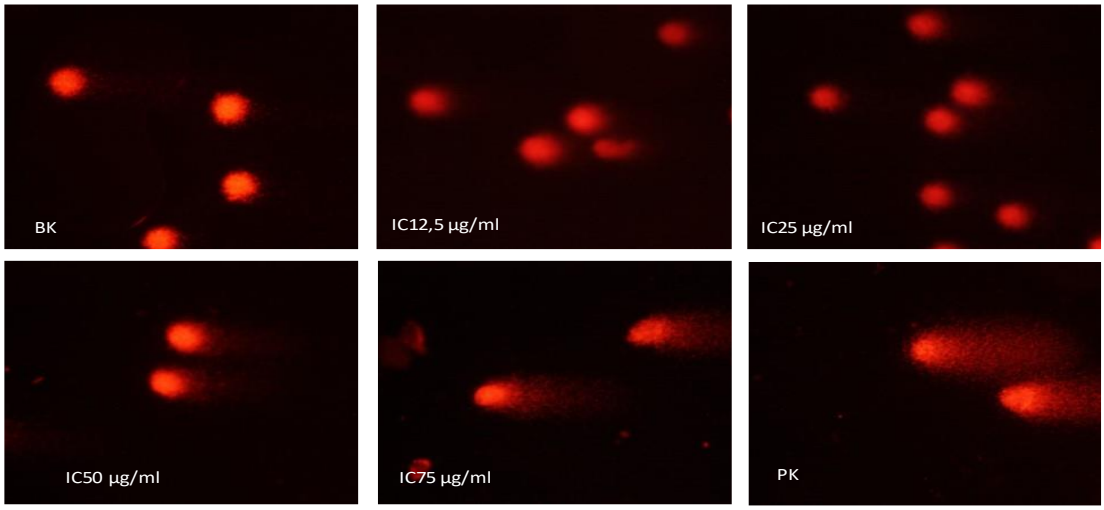
Şekil 4.5. A. *nilotica* bitki ekstraktına maruz bırakılan H1299 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları

4.3. Komet Testi Bulguları

Komet testi sonucunda elde edilen örnek görüntüler Şekil 4.6 ve 4.7 de verilmiştir. Komet testinde elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.



Şekil 4.6. Komet testi sonunda A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için çeşitli konsantrasyonlardaki floresan mikroskop görüntüleri



Şekil 4.7.Komet testi sonunda H1299 hücre hattında A. *nilotica* bitki ekstraktı için çeşitli konsantrasyonlardaki floresan mikroskop görüntüleri

4.3.1. Kuyruk uzunluğu bulguları

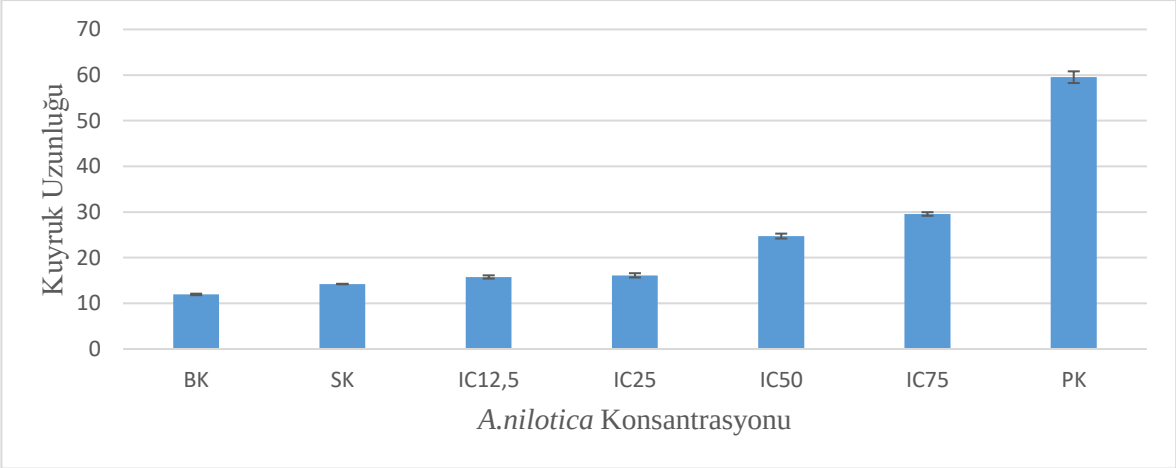
A549 ve H1299 hücre hatlarının, *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. A549 ve H1299 hücre hatlarında A. *nilotica* bitki ekstraktı için Kuyruk uzunluğu sonuçları. (Karşılaştırmalar aynı hücrelerin solvent kontrol grupları ile gerçekleştirilmiştir. *; p<0,05; **p≤0,01; ***p≤ 0,001)

Kuyruk Uzunluğu (µm)	A549	H1299
BK	11,95 ± 0,16 µm	13,348 ± 0,38 µm
SK	14,23 ± 0,05 µm	13,46 ± 0,26 µm
$IC_{12,5}$	15,77 ± 0,35 µm***	15,02 ± 0,31 µm***
IC_{25}	16,13 ± 0,46 µm**	17,61 ± 0,36 µm***
IC_{50}	24,73 ± 0,54 µm***	48,15 ± 0,86 µm***
IC_{75}	29,56 ± 0,39 µm***	72,71 ± 1,32 µm***
PK	59,53 ± 1,28 µm***	104,34 ± 1,44 µm***

- A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları

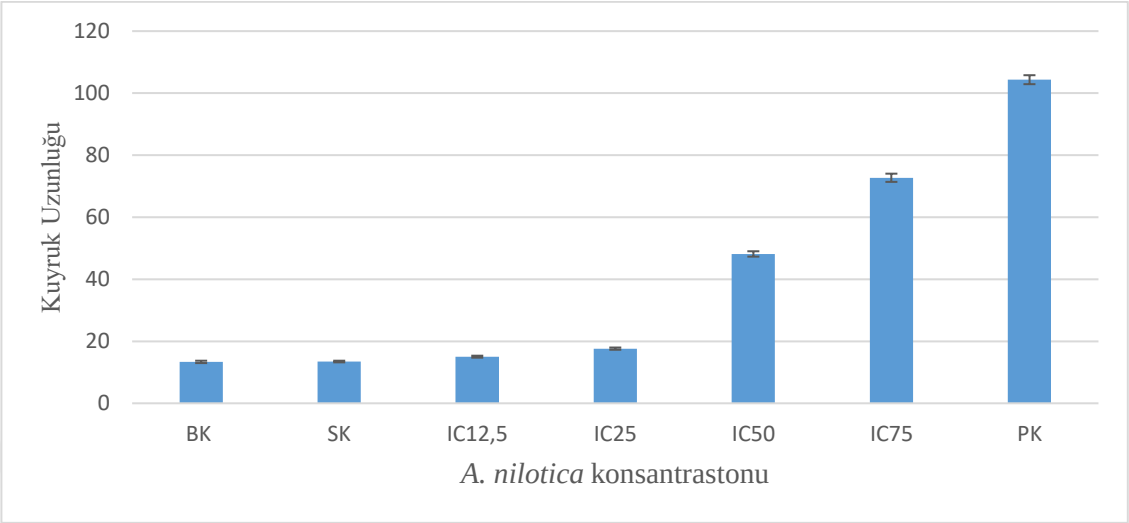
A549 hücrelerinin *A. nilotica* bitki ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu sırasıyla, 15,77 ±3,56 µm, 16,13 ±4,63 µm, 24,73 ±5,40 µm ve 29,56 ± 3,93 µm olarak hesaplanmıştır. Büyüme kontrol (BK), Solvent kontrol (SK) ve Pozitif kontrolün değerleri sırasıyla 11,95± 1,64 µm, 14,23 ± 0,55 µm, 59,53 ± 12,81 µm olarak hesaplanmıştır. A549 hücre hattı *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktı ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları Şekil 4.8. ve Çizelge 4.2. 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri; Hata çubuklarında standart hata değerleri belirtilmiştir

- H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları

H1299 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu sırasıyla, 15,02 ± 3,17 µm, 17,61 ± 3,62 µm, 48,15 ± 8,64 µm ve 72,71 ± 13,22 µm olarak hesaplanmıştır. Büyüme kontrol (BK), Solvent kontrol (SK) ve Pozitif kontrolün değerleri ise, 11,95± 1,64 µm, 14,23 ± 0,55 µm ve 59,53 ± 12,81 µm olarak sırasıyla hesaplanmıştır. H1299 hücre hattı *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktı ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu bulguları Şekil 4.9. ve Çizelge 4.2. 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk uzunluğu verileri; Hata çubuklarında standart hata değerleri belirtilmiştir

4.3.2. Kuyruk % DNA bulguları

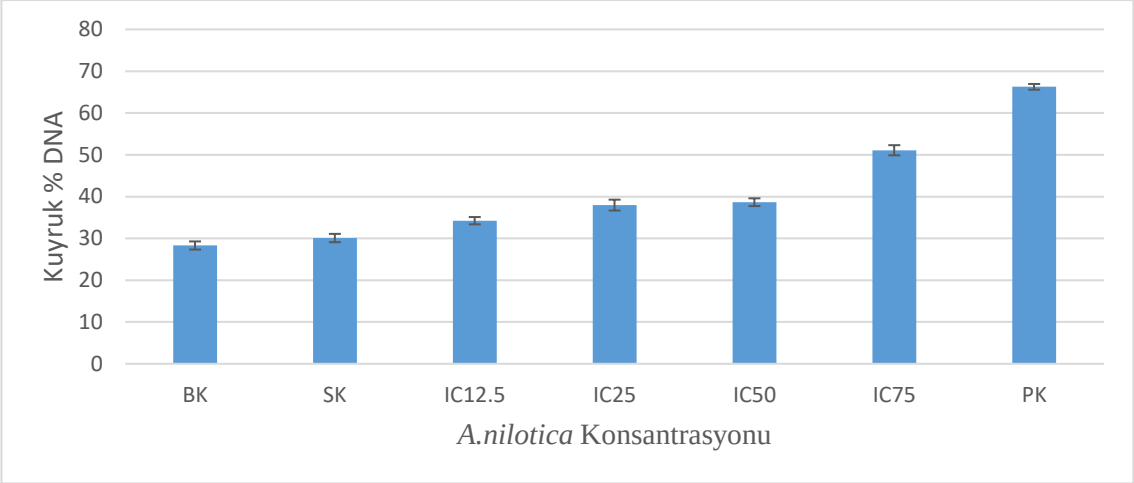
A549 ve H1299 hücre hatlarının, *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. A549 ve H1299 hücre hatlarında *A. nilotica* bitki ekstraktı için Kuyruk %DNA sonuçları. (Karşılaştırmalar aynı hücrelerin solvent kontrol grupları ile gerçekleştirilmiştir. *; p<0,05; **p≤0,01; ***p≤ 0,001)

Kuyruk %DNA	A549	H1299
BK	28,30 ± 0,97	15,08 ± 0,6
SK	30,08 ± 0,99	25,17 ± 1,05
$IC_{12.5}$	34,23 ± 0,87**	33,75 ± 1,04***
IC_{25}	37,97 ± 1,29***	42,93 ± 1,04***
IC_{50}	38,65 ± 0,92***	46,97 ± 1,05***
IC_{75}	51,08 ± 1,21***	57,15 ± 1,14***
PK	66,25 ± 0,68***	77,98 ± 0,78***

- A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk % DNA bulguları

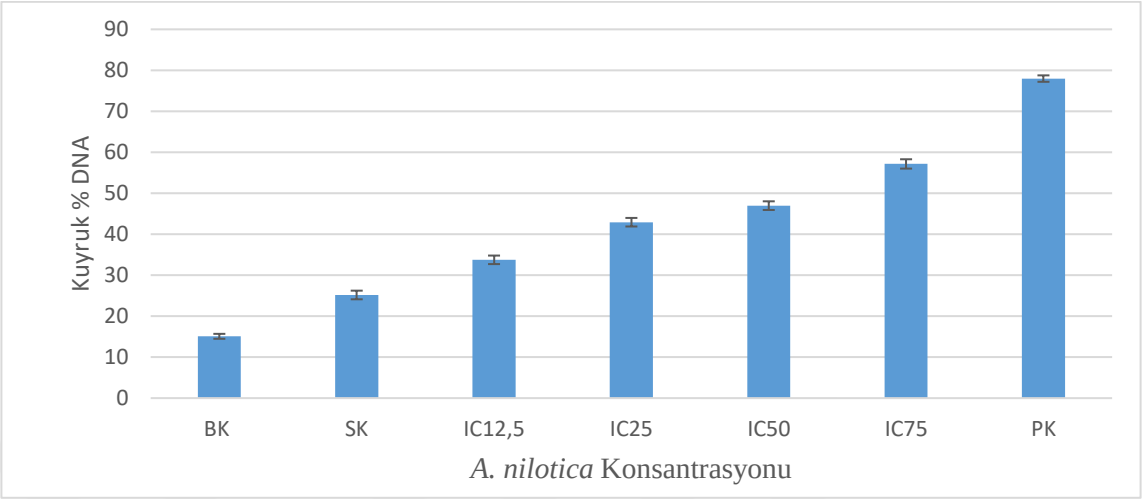
A549 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA sırasıyla, 34,23 ± 8,7, 37,97 ± 12,97, 38,65 ± 9,25 ve 51,08 ± 12,12 olarak hesaplanmıştır. Büyüme kontrol (BK), Solvent kontrol (SK) ve Pozitif kontrolü (PK) değerleri sırasıyla, 28,30 ± 9,72, 30,08 ± 9,92 ve 34,23 ± 8,7 hesaplanmıştır. A549 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktı ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk %DNA bulguları Şekil 4.10. ve Çizelge 4.3. 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10.A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk % DNA verileri; Hata çubuklarında standart sapmaları belirtilmiştir

- H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk % DNA bulguları

H1299 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA bulguları sırasıyla, 33,75 ± 10,42, 42,93 ± 10,44, 46,97 ± 10,57 ve 57,15 ± 11,4 olarak hesaplanmıştır. Büyüme kontrol (BK), Solvent kontrol (SK) ve Pozitif kontrolü (PK) değerleri sırasıyla, 15,08 ± 6,01, 25,17 ± 10,53 ve 77,98 ± 7,84 hesaplanmıştır. H1299 hücre hattı *A. nilotica* bitki ekstraktı ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk %DNA bulguları Şekil 4.11. ve Çizelge 4.3. 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.11. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen kuyruk % DNA verileri; Hata çubuklarında standart sapmaları belirtilmiştir

4.3.3. Olive kuyruk momenti bulguları

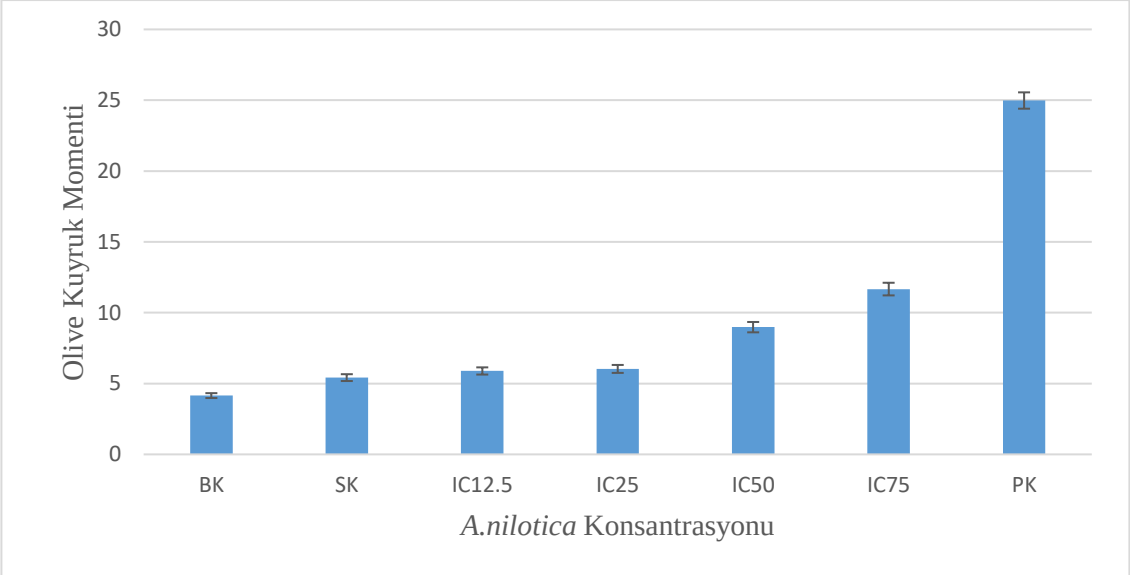
A549 ve H1299 hücre hatlarının, *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen Olive kuyruk momenti sonuçları Çizelge 4.4 da verilmiştir.

Çizelge 4.4. A549 ve H1299 hücre hatlarında *A. nilotica* bitki ekstraktı için Olive kuyruk momenti bulguları (Karşılaştırmalar aynı hücrelerin solvent kontrol grupları ile gerçekleştirilmiştir. *; $p<0,05$; **$p\leq0,01$; ***$p\leq 0,001$)

Olive Kuyruk Momenti	A549	H1299
BK	4,14 ± 0,17	3,2 ± 0,25
SK	5,41 ± 0,24	4,53 ± 0,16
$IC_{12,5}$	5,88 ± 0,25	5,56 ± 0,17***
IC_{25}	6,03 ± 0,28	6,56 ± 0,2**
IC_{50}	8,98 ± 0,36***	14,55 ± 0,64***
IC_{75}	11,66 ± 0,44***	23,15 ± 1,09***
PK	24,97 ± 0,57***	48,11 ± 0,91***

- A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları

A549 hücrelerini *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen Olive Kuyruk Momenti bulguları sırasıyla, 5,88 ± 2,53, 6,03 ± 2,88, 98 ± 3,65 ve 11,66 ± 4,46 olarak hesaplanmıştır. Büyüme kontrol (BK), Solvent kontrol (SK) ve Pozitif kontrolü (PK) değerleri sırasıyla, 4,14 ± 1,72, 5,41 ± 2,4 ve 24,97 ± 5,76 hesaplanmıştır. A549 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktı ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen Olive Kuyruk Momenti bulguları Şekil 4.12. ve Çizelge 4.4. 'da gösterilmiştir.

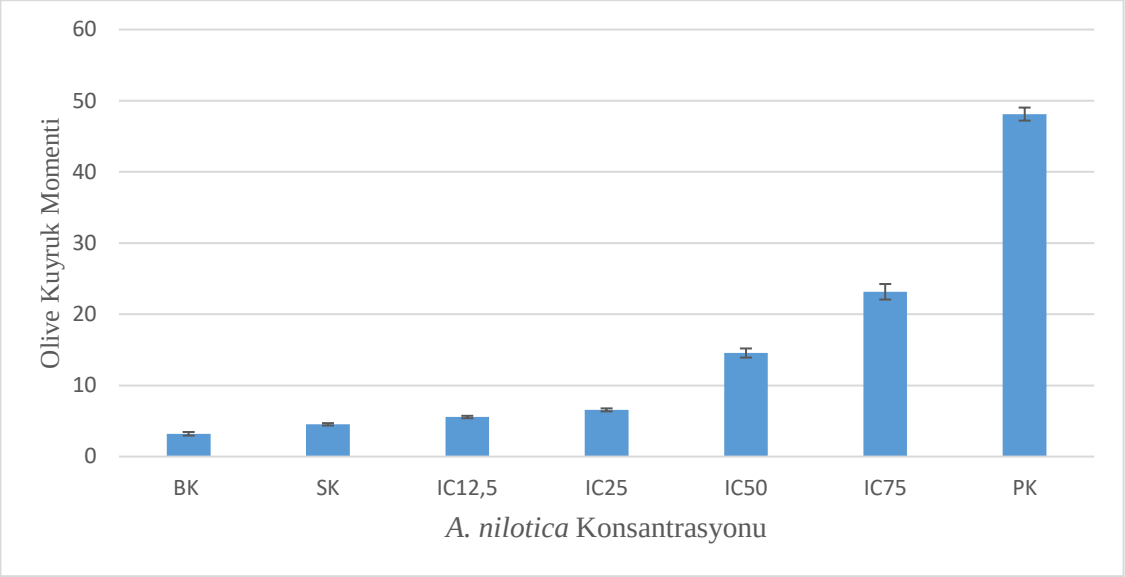


Şekil 4.12. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Olive Kuyruk Momenti verileri; Hata çubuklarında standart sapmaları belirtilmiştir

- H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen olive kuyruk momenti bulguları

H1299 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen Olive Kuyruk Momenti bulguları sırasıyla, 5,56 ± 1,72, 6,56 ± 2,08, 14,55 ± 6,41 ve 23,15 ± 10,9 olarak hesaplanmıştır. Büyüme kontrol (BK), Solvent kontrol (SK) ve Pozitif kontrolü (PK) değerleri sırasıyla, 3,2 ± 2,51, 4,53 ± 1,68 ve 48,11 ± 9,15 hesaplanmıştır. H1299 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi

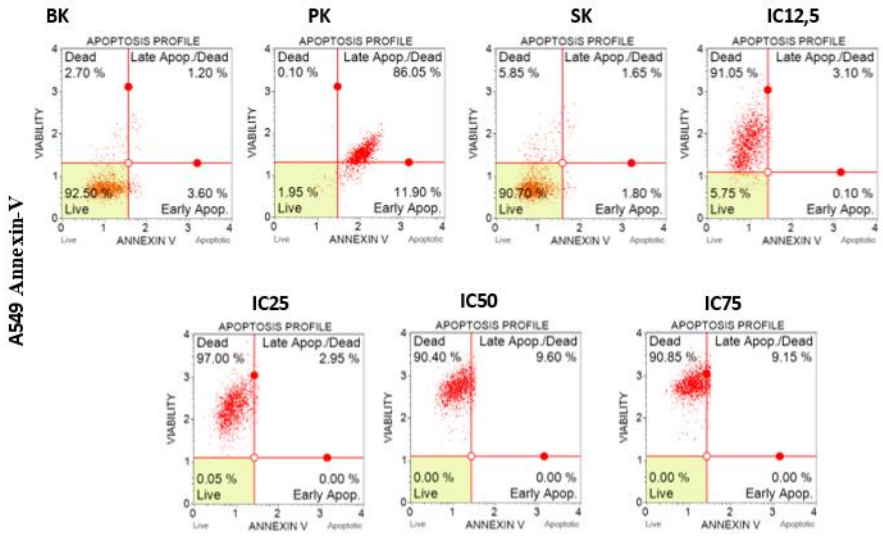
metanolik yaprak ekstraktı ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen Olive Kuyruk Momenti bulguları Şekil 4.13. ve Çizelge 4.4. ‘da gösterilmiştir.



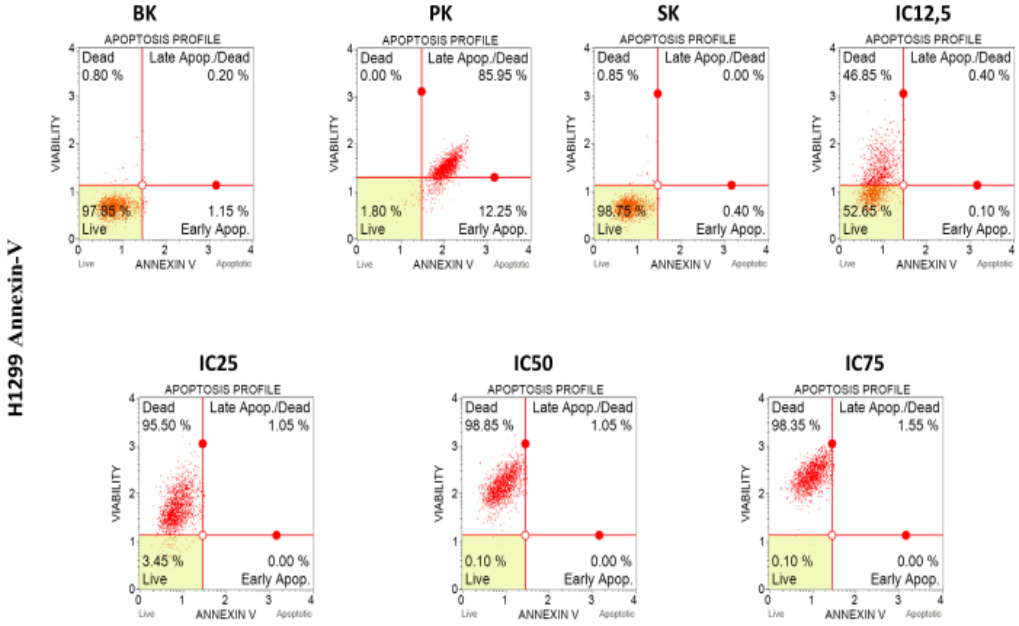
Şekil 4.13. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Olive Kuyruk Momenti verileri; Hata çubuklarında standart sapmaları belirtilmiştir

4.4. Annexin-V Testi Apoptoz Bulguları

A. nilotica bitkisi metanolik yaprak ekstraktının XTT testinden elde edilen IC değerlerinden IC 12,5, 25, 50 ve 75 konsantrasyonları ile 24 saat boyunca muamele edilen A549 ve H1299 hücrelerinden elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, toplam apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6. de verilmiştir. Pozitif kontrolü olarak Hidrojen Peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. Muse cihazından elde edilen görüntüler de Şekil 4.14 ve 4.15’te verilmiştir.



Şekil 4.14. A549 hücrelerinde *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi



Şekil 4.15. H1299 hücrelerinde *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu apoptotik etkilerinin Annexin-V yöntemi ile belirlenmesi

Çizelge 4.5. A549 hücre hattı *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri

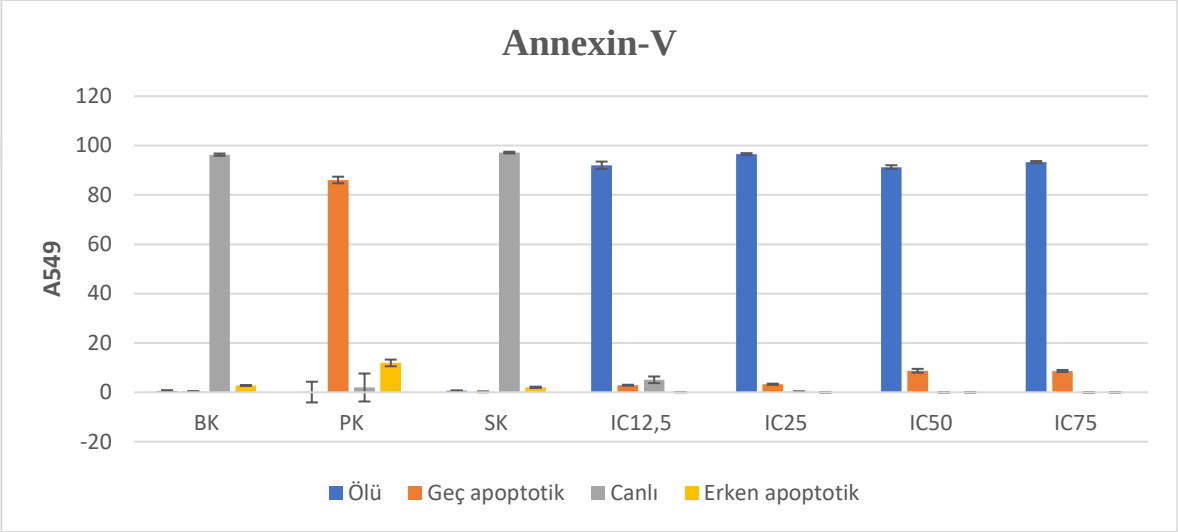
Dozlar	Ölü hücre	Geç apoptotik	Canlı hücre	Erken apoptotik
BK	0,6 ± 0,26	0,3 ± 0	96,33 ± 0,45	2,76 ± 0,2
PK	0,10 ± 4,2	86,05 ± 1,34	1,95 ± 5,67	11,9 ± 1,36
SK	0,66 ± 0,11	0,2 ± 0,17	97,16 ± 0,35	2,03 ± 0,25
$IC_{12,5}$	92,02 ± 1,5	2,86 ± 0,2	5,06 ± 1,35	0,06 ± 0,05
IC_{25}	96,53 ± 0,4	3,26 ± 0,25	0,26 ± 0,15	0 ± 0
IC_{50}	91,26 ±	8,73 ± 0,77	0 ± 0	0 ± 0
IC_{75}	0,46 ±	8,63 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0

Çizelge 4.6. H1299 hücre hattı *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu Annexin-V testi ile elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart sapma (S.S) değerleri

Dozlar	Ölü hücre	Geç apoptotik	Canlı hücre	Erken apoptotik
BK	0,73 ± 0,11	0,2 ± 3,39	97,73 ±0,11	1,33 ± 0,2
PK	0,0 ± 0	85,95 ± 0,65	1,80 ± 1,85	12,25 ± 0
SK	0,56 ± 0,28	0 ± 0	98,96 ± 0,15	0,5 ± 0,1
$IC_{12,5}$	48,7 ± 2	0,5 ± 0,1	50,43± 2,2	0,26 ± 0,15
IC_{25}	96,13 ± 0,56	0,93 ± 0,11	2,93 ± 0,49	0 ± 0
IC_{50}	98,7 ± 0,1	1 ± 0,1	0,23 ± 0,11	0 ± 0
IC_{75}	98,2 ± 0,26	1,66 ± 0,28	0,06 ± 0,05	0 ± 0

4.4.1. A549 hücre hattında *nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Annexin-V testin bulgular

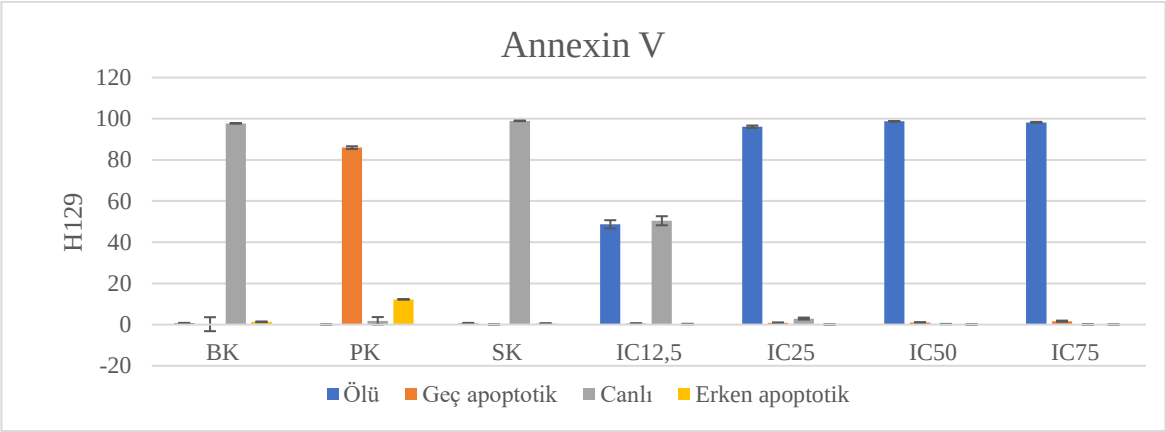
A549 hücrelerinde *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi Şekil 4.16 ve Çizelge 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.16. A549 hücre hattın *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi

4.4.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen Annexin-Vtestin bulguları

H1299 hücrelerinin *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi Şekil 4.17 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.17. H1299 hücrelerinin *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile muamelesi sonucu elde edilen yaşayan hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi

4.5. ROS testin bulguları

A. nilotica bitkisi metanolik yaprak ekstraktının A549 ve H1299 hücre hatlarındaki XTT testi sonuçlarından elde edilen, $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmiş ve bir saat, altı saat, on iki saat ve yirmi dört saat sonraki hücre içi ROS seviyeleri ölçülmüştür. Pozitif kontrolü olarak Hidrojen Peroksit (H2O2) kullanılmıştır. Elde edilen RFU değerleri Çizelge 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. A549 hücre hattın *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri

A549	1'inci saat	6'inci saat	12'nci saat	24'üncü saat
BK	3,31 ± 1,68	3,39 ± 1,97	2,26 ± 0,51	2,6 ± 1,48
SK	2,77 ± 1,23	2,81 ± 1,44	2,87 ± 1,87	2,33 ± 1,34
IC12,5	6,79 ± 0,42	2,05 ± 0,1	2,13 ± 0,38	1,48 ± 0,42
IC25	11,85 ± 3,39	2,96 ± 0,5	2,91 ± 0,92	2,27 ± 0,87
IC50	13,94 ± 1,2	3,7 ± 0,4	2,95 ± 0,44	1,83 ± 0,74
IC75	18,48 ± 1,82	7,05 ± 1,58	8,42 ± 3,03	2,06 ± 1,46
PK	6,8 ± 2,11	6,36 ± 2,02	3,17 ± 1,08	0,15 ± 0,01

Çizelge 4.8. H1299 hücre hattın *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri

H1299	1'inci saat	6'inci saat	12'nci saat	24'üncü saat
BK	2,5 ± 0,16	2,39 ± 0,18	2,36 ± 0,25	0,92 ± 0,47
SK	2,63 ± 0,59	2,66 ± 0,71	2,79 ± 0,99	1,53 ± 0,35
IC12,5	4,73 ± 0,31	2,9 ± 0,19	2,92 ± 0,31	2,11 ± 0,41
IC25	9,49 ± 2,96	2,94 ± 0,22	3,11 ± 0,82	3,96 ± 1,78
IC50	9,7 ± 0,8	4,42 ± 3,0	3,52 ± 1,18	1,65 ± 0,49
IC75	11,65 ± 0,56	4,41 ± 0,7	5,13 ± 1,28	0,83 ± 0,09
PK	16,52 ± 2,65	18,32 ± 2,21	7,7 ± 0,78	0,17 ± 0,02

4.5.1. A549 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen ROS test bulguları

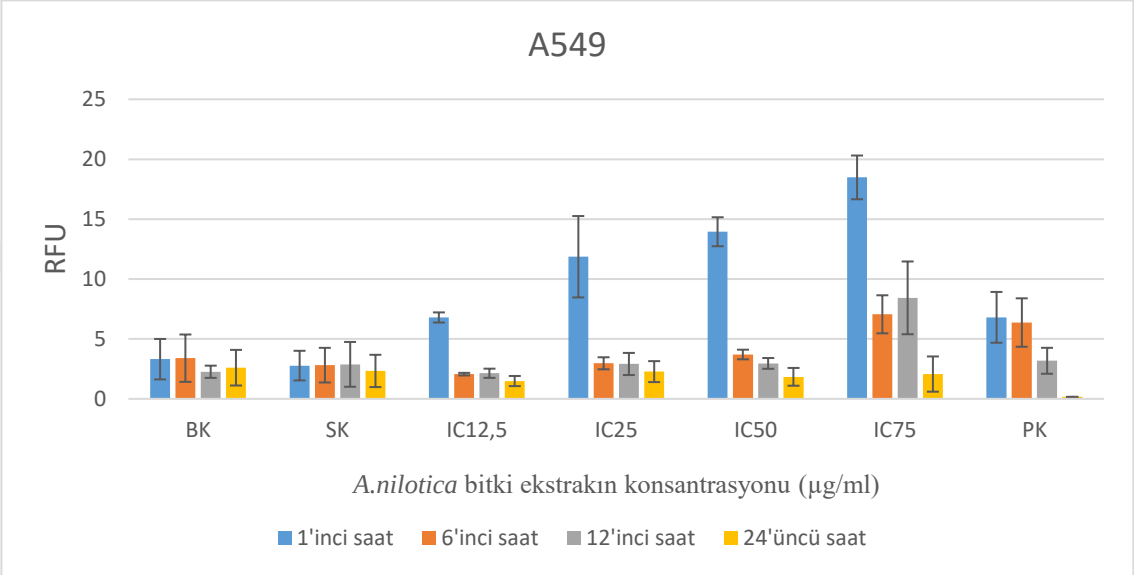
A549 hücre hattının *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının ile bir saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri 3,31 ± 1,68 şeklindedir. $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerlerinin bu hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucunda elde edlilem ortalama ROS değerleri sırasıyla; 6,79 ± 0,42, 11,85 ± 3,39, 13,94 ± 1,2 ve 18,48 ± 1,82 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 6,8 ± 2,11 şeklindedir.

6 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri, 3,39 ± 1,97 şeklindedir. IC değerlerinden elde edilen ROS değeri sırasıyla; 2,05 ± 0,1, 2,96 ± 0,5, 3,7 ± 0,4 ve 7,05 ± 1,58 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 6,36 ± 2,02 şeklindedir.

12 saat muamele edilmesi sonucundan büyüme kontrolünde elde edilen ROS değeri, 2,26 ± 0,51 şeklindedir. IC değerlerinden elde edilen ROS değeri sırasıyla; 2,13 ± 0,38, 2,91 ± 0,92, 2,95 ± 0,44 ve 8,42 ± 3,03 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 3,17 ± 1,08 şeklindedir.

24 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri, 2,6 ± 1,48 şeklindedir. IC değerlerinden elde edilen ROS değeri sırasıyla; 1,48 ± 0,42, 2,27 ± 0,87, 1,83

± 0,74 ve 2,06 ± 1,46 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 0,15 ± 0,01 şeklindedir. 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri Çizelge 4.7. ve Şekil 4.18'da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. A549 hücre hattın *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri

4.5.2. H1299 hücre hattında *A. nilotica* bitki ekstraktı için elde edilen ROS test bulguları

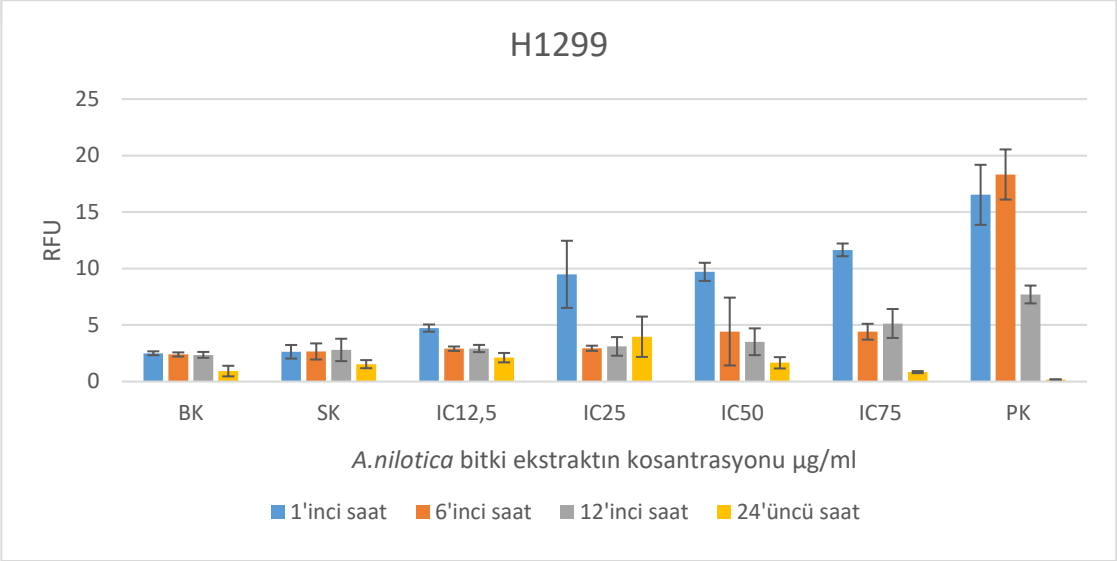
H1299 hücre hatlarının *A. nilotica* bitkisi metanolik yaprak ekstraktının ile bir saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri 2,5 ± 0,16 şeklindedir. $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerlerinin bu hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucunda elde edlilem ortalama ROS değerleri sırasıyla; 4,73 ± 0,31, 9,49 ± 2,96, 9,7 ± 0,8 ve 11,65 ± 0,56 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 16,52 ± 2,65 şeklindedir.

6 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri, 2,39 ± 0,18 şeklindedir. IC değerlerinden elde edilen ROS değeri sırasıyla; 2,9 ± 0,19, 2,94 ± 0,22, 4,42 ± 3,0 ve 4,41 ± 0,7 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 18,32 ± 2,21 şeklindedir.

12 saat muamele edilmesi sonucundan büyüme kontrolünde elde edilen ROS değeri, 2,36 ± 0,25 şeklindedir. IC değerlerinden elde edilen ROS değeri sırasıyla; 2,92 ± 0,31, 3,11 ± 0,82,

3,52 ± 1,18 ve 5,13 ± 1,28 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 7,7 ± 0,78 şeklindedir.

24 saat muamele edilmesi sonucunda büyüme kontrolde elde edilen ROS değeri, 0,92 ± 0,47 şeklindedir. IC değerlerinden elde edilen ROS değeri sırasıyla; 2,11 ± 0,41, 3,96 ± 1,78, 1,65 ± 0,49 ve 0,83 ± 0,09 şeklindedir. Pozitif kontrolün ROS değeri ise, 0,17 ± 0,02 şeklindedir. 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri Çizelge 4.8. ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. H1299 hücre hattın *A. nilotica* bitki ekstraktın IC doz değerleri ile 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat ile muamele edilmesi sonucundan elde edilen ROS değeri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerindendir. Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin başında gelen akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere iki ana tipe ayrılmaktadır. Akciğer kanseri için en büyük risk faktörü sigaradır. Ayrıca, arsenik, berilyum, kadmiyum, vinil klorür ve nikel kromatlara kimyasal maruziyet akciğer kanserine neden olabilmektedir (Gorlova ve diğerleri, 2007).

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin yanı sıra bilim insanları doğal ürünlerden özellikle de bitkilerden kansere karşı etkili ilaçlar bulabilmek için durmaksızın yeni çalışmalar yapmaktadır.

Afrika ülkelerinde kanserin önemli bir sorun olmasının nedenleri arasında, kanserle mücadele edebilmek için genellikle sınırlı fon bulunması, buna öncelik verilmemesi ve toplumun farkındalığındaki eksiklik yer almaktadır. Dolaysıyla kanseri önlemek ve tedavi etmek için mümkün olan tüm kaynakların kullanılması gerekmektedir (Kuete ve diğerleri, 2015). Afrikalılar, batı tıbbına şüphe ettikleri veya ekonomik yetersizliklerinden dolayı bu hastalıklarla savaşabilmek için geleneksel şifacılardan alternatif tıp almayı seçmiştir. Afrika'da halk arasında genel olarak çeşitli bitkilerin kabuklarının, yapraklarının veya köklerinin kaynar suda eritilerek farklı hastalıkları tedavi edebilmek için oral olarak uygulanması yaygındır. Bununla birlikte elde edilen karışımların yara yerine lokal olarak uygulanması şeklindeki kullanımı da oldukça yaygındır. Bu bağlamda Afrika ülkelerinde doğal ürünlerin çeşitli şekillerde halk arasında tedavi amaçlı kullanımı oldukça yaygındır. Bu tip uygulamaların bilimsel araştırmalara konu olması da kaçınılmaz gözükmektedir, Dünya çapındaki ilaçlara bakıldığında pek çok ilaç etken maddesinin bitkiler vb. doğal ürünlerden kökenlendiklerini söyleyebilmemiz mümkündür (Mbele ve diğerleri, 2017). *A. nilotica* bitkisinin özellikle Afrika ülkelerinde halk arasındaki yaygın kullanımı, bu bitkinin çeşitli ürünlerinin yüksek bir potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir. Buradan hareketle tez çalışmamızda *A. nilotica* bitkisinin metanolik yaprak ekstraktının anti-kanser potansiyeli iki farklı akciğer kanser hücre hattı olan A549 ve H1299 hücre hatlarında araştırılmıştır.

Çalışmamızda ilgili hücre hatlarında *A. nilotica* bitkisinin metanolik yaprak ekstraktının sitotoksik etkinliği XTT ve klonojenik test yöntemleri ile araştırılmıştır. Çalışmamızda, gerçekleştirilen XTT testi bulgularımız değerlendirildiğinde A549 hücrelerinde IC50 değeri 616,66 ± 11,71 olarak belirlenirken H1299 hücreleri için aynı değer 198,05 ± 14,48 µg/mL olarak belirlenmiştir. *A. nilotica* ile ilgili gerçekleştirilen sitotoksite çalışmalarına bakıldığında; Sulaiman ve Gopalakrishnan, gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL ve 200 µg/mL dozlarında *A. nilotica* dahil olmak üzere farklı *Acacia* türlerinin sulu ekstraktlarının hemolitik aktivitesini incelemiştir. Çalışmada *A. nilotica* (200 µg/ml dozunda)'nın en yüksek hemolitik aktiviteye (8,9 ± 0,16) sahip olduğu gösterilmiştir. Doz artışı ile hemolitik yüzdenin arttığı saptanmıştır (Sulaiman ve Gopalakrishnan, 2013). Başka bir çalışmada Kalaivani ve arkadaşları, *A. nilotica'nın* sulu yaprak ekstraktlarının farklı dozlarda (5-500 µg/ml) sıçan ve insan eritrositlerine karşı *in-vitro* sitotoksisite etkisini araştırmıştır. Sulu yaprak ekstraktın, IC50<200 µg/mL ile hemolitik bir etki göstermiştir (Kalaivani ve Mathew, 2010). Her iki çalışma da bizim bulgularımızla paralel olacak şekilde farklı hücreler üzerinde *A. nilotica* bitkisinin farklı ürünlerinin sitotoksik etkinliğe sahip olabileceğini göstermektedir. Bunların dışında *A. nilotica* ekstraktından izole edilen *pyrogallol*'un antikanser etkisini HT29 hücre hattında araştırılmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarından, HT-29 hücrelerin IC50 değeri 35µg/mL olarak hesaplanmıştır (Revathi ve diğerleri, 2018). Bu çalışmada kullanılan HT29 hücreleri insan kolon kanseri hücreleridir ve elde edilen IC50 değeri *A. nilotica* bitkisinin herhangi bir organının ekstraktının toplamı değil, ekstraktlardan elde edilmiş olan spesifik bir maddeye ait IC50 değeridir. Bu nedenlerle ilgili çalışmada belirlenen IC50 değeri ile tez çalışmamızda belirlenen IC50 değerleri arasındaki fark anlaşılabilirdir. Tez çalışmamıza daha benzer bir çalışmada (Sundarraj ve diğerleri, 2012) MCF 7 ve A549 hücrelerinde, 48 saat boyunca *A.nilotica* bitkisinin etanolik yaprak ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının (0.1–1 mg/mL) MCF 7 ve A549 hücrelerinin canlılığı üzerindeki potansiyel etkisini MTT yöntemi ile araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, *A. nilotica* etanolik yaprak ekstraktının doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını inhibe ettiğini göstermiştir. MTT testi ile belirlenen MCF-7 ve A549 hücrelerinin IC50 değerleri sırasıyla, 493,3 ± 15,2 µg/mL ve 696,6 ± 11,5 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada A549 hücreleri için belirlenen IC50 değeri, tez çalışmamızda belirlenen 616,66 ± 11,71 µg/mL değeri ile oldukça yakın değerlerdir ve bulgularımız söz konusu çalışmanın bulguları ile örtüşmektedir. Ancak söz konusu çalışmada 24 saat değil 48 saatlik maruziyet uygulanmıştır. Bu bağlamda A549 hücreleri için elde edilen IC50 değerleri açısından bir farklılık göze çarpsa da tez çalışmamızda çözücü olarak metanol kullanmış olmamız, ilgili çalışma da ise etanolün kullanılmış olmasının bu farkın ortaya çıkmasına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Bitkisel biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde farklı çalışmalarda farklı solventler kullanılmaktadır. Çalışmamızda yüksek polaritesi ve düşük kaynama noktası nedeniyle metanol tercih edilmiştir. Thiagarajan ve diğerleri (2020) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise *A. nilotica* etanolik yaprak ekstraktının sitotoksik etkinliği insan ağız içi epidermal karsinoma hücrelerinden türetilmiş KB hücre hatlarında MTT yöntemi ile araştırılmıştır. MTT yöntemi ile elde edilen veriler ışığında IC50 değeri 40 µg/mL olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışma ile çalışmamızda elde edilen IC50 değerleri ile kıyaslandığında çok büyük farklılık olduğu görülmektedir. Bu farklılığın temel sebebinin kullanılan hücre hatlarındaki farklılıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Yapılan bir diğer çalışmada ise *A. nilotica* yaprak ekstraktı ile oksidatif strese karşı *in-vitro* DNA koruması çalışmasından elde edilen sonuçlar, bir gram yaprak ekstraktın süpürme potansiyeli açısından 20 mg etil galata eşdeğer olduğunu göstermiştir (Mohan ve diğerleri, 2014).

A549 hücrelerinin IC50 değeri H199 hücrelerinin IC50 değerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksektir ($p \leq 0,001$)

Çalışmamızda, *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktın sitotoksik etkinliğinin belirlenebilmesi için kullanılan bir diğer yöntem ise Klonojenik testidir. A549 hücreleri *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının 100- 400 µg/mL arasında farklı konsantrasyonları ile, H1299 hücreleri ise 25-100 µg/mL arasında farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Uygulamalar sonrasında A549 hücrelerinde 300 µg/mL konsantrasyonundan, H1299 hücrelerinde ise 75 µg/mL konsantrasyonundan sonra koloni oluşumu gözlenmemiştir. Klonojenik test bulgularımızda diğer sitotoksite testimiz olan XTT testi

bulguları gibi *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının A549 ve H1299 hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliğe sahip olduğunu gösterir niteliktedir.

Çalışmamızda, *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının sitotoksik etkinliğinin yanında genotoksik etkinliği de araştırılmıştır. Genotoksik etkinliğin belirlenebilmesi için yaygın olarak kullanılan genotoksisite testlerinden biri olan alkali komet testi kullanılmıştır. *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının A549 ve H1299 hücreleri XTT testinden elde edilen IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 değerleri ile 24 saat muamele edilerek komet testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, kuyruk uzunluğu parametresi açısından değerlendirildiğinde A549 hücrelerinde uygulanan *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktı konsantrasyonlarının hepsi solvent kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Benzer bulgular H1299 hücreleri için de elde edilmiştir. Kuyruk %DNA içeriği açısından yapılan değerlendirmelerde de Kuyruk uzunluğu parametresine benzer şekilde, uygulanan tüm konsantrasyonların, solvent kontrole kıyasla kuyruk %DNA içeriğini arttırdığı belirlenmiştir. Bunların yanı sıra bir diğer komet parametresi olan Olive Kuyruk Momenti parametresi değerlerinde, H1299 hücrelerinde uygulanan *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktı konsantrasyonlarının hepsi solvent kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. A549 hücrelerinde ise IC50 ve 75 konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen komet sonuçları kullanılan *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktı konsantrasyonlarının her iki hücre hattında da genotoksik etkinliğe neden olduğunu göstermektedir. Literatürde *A. nilotica* ile gerçekleştirilmiş benzer çalışmalara çok rastlanılmamakla birlikte Thiagarajan ve diğeerleri (2020) tarafından yapılan çalışmada *A.nilotica* etanolik yaprak ekstraktının genotoksik etkinliği insan ağız içi epidermal karsinoma hücrelerinden türetilmiş KB hücre hatlarında komet yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada benzer komet parametrelerinin değerlendirilmesi ile 50 µg/mL konsantrasyonda ciddi DNA hasarı oluştuğu rapor edilmiştir. Çalışmamızdaki komet bulgularımızda; H1299 hücreleri için IC12,5 konsantrasyonumuz olan 49,5 µg/mL, A549 hücreleri için ise yine IC12,5 konsantrasyonumuz olan 149,33 µg/mL konsantrasyonundan itibaren *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının anlamlı düzeyde, komet testi ile belirlenebilir DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla söz konusu çalışma ile

çalışmamız kıyaslandığında, farklı hücre hatları kullanılmış olsa bile *A. nilotica* bitkisinin genotoksik etkinliğini ortaya koyması bakımından bulgularımız uyumlu görülmektedir.

Genotoksik ve sitotoksik etkinliğe sebep olabilecek önemli faktörlerden biri de oksidatif strestir. Hücre içerisinde artan reaktif oksijen türleri (ROS) hücrelerde oksidatif strese neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında A549 ve H1299 hücre hatları XTT test yöntemi ile belirlenen IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 değerleri kullanılarak 24 saat boyunca *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktına maruz bırakılmıştır. Süre içerisinde birinci saat sonunda, altıncı saat sonunda, on ikinci saat sonunda ve yirmi dördüncü saat sonunda hücre içi ROS miktarları hesaplanmıştır. A549 ve H1299 hücre hatlarından elde edilen bir saat, altı saat, on iki saat ve yirmi dört saatlik RFU değerleri incelendiğinde hücre içi ROS miktarlarında artış belirlenmiştir. ROS seviyesinin farklı saatlerindeki değerlere bakıldığında en yüksek artışın birinci saatte gerçekleştiği görülmektedir. Altıncı saat sonrasında ROS miktarlarında azalma görülmektedir. *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının sitotoksik etkinliğini göstermeye başladığını ve hücrelerin ölmesi nedeniyle altıncı saatten sonra ROS seviyelerinin azaldığını düşünmekteyiz. Bu sebepten dolayı hücrelerin ölmeye başlamış olması daha önce de değinilen ve Thiagarajan ve diğerleri (2020) tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmada olduğu gibi KB hücrelerinde *A. nilotica* etanolik yaprak ekstraktlarının da hücre içi ROS miktarını arttırdığı vurgulanmıştır. Bu bulgular da tez çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyumlu görülmektedir.

Tüm bu çalışmalar sonucunda *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktın hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmak için A549 ve H1299 hücrelerinde XTT testinden elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile Annexın-V testi gerçekleştirilmiştir. *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktın $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile 24 saat muamelesi sonucu elde edilen bulguları bakıldığında *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının hücreleri apoptoza götürmediği ve doğrudan hücre ölümüne sebep olduğunu görülmüştür. Elde edilen sonuçlarını destekleyen çalışmalar mevcuttur. Örneğin Revathi ve diğerleri (2018) yaptığı çalışmada, *A.nilotica*'den izole edilen *Pyrogallol*'un HT29 hücrelerini apoptoza götürüp götürmediği hakkında ikili boyama yöntemi ile morfolojik görüntüleri incelenmiştir. *Pyrogallol* ile muamele edilen HT-29 hücreler çoğunlukla apoptoza girmeden ölmüş ve çok

az sayıda şiddetli nükleer parçalanma ile geç apoptotik duruma girmiştir. Bu bağlamda elde ettiğimiz hücre ölüm modu bulgularımızın daha farklı yöntemlerle de daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasının ve ölüm modunun ayrıntılandırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Çeşitli protein ve gen ekspresyonu düzeylerinin incelendiği daha ileri düzey çalışmaların bu konuda katkı sunabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda XTT bulgularımızda elde ettiğimiz veriler; H1299 hücrelerinin A549 hücrelerine kıyasla daha düşük bir IC50 değerine sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Klonojenik test bulgularımız da komet testi bulgularımız da yine H1299 hücrelerinin *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktına daha duyarlı olduğunu göstermektedir. *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktının H1299 hücrelerindeki bu yüksek anti kanser etkinliğinin (A549 hücreleri ile kıyaslandığında) nedeninin H1299 hücrelerinin genotipinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu bağlamda, H1299 hücrelerinin sahip olduğu p53 mutasyonunun bu hücreleri *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktına karşı daha duyarlı hale getirmiş olabilir.

Kalaivani ve Mathew (2010) tarafından da rapor edildiği üzere *A. nilotica* bitkisinin sahip olduğu biyoaktif bileşiklerden Etil gallat yüksek anti kanser aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte *A. nilotica'nın* pek çok farklı biyoaktif bileşiğe de sahip olduğu belirtilmektedir (Kalaivani ve Mathew, 2010). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde ettiğimiz bulgular ışığında *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktlarının gerek H1299 gerekse A549 hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etkinliğe sahip olduğunun belirlenmesinden dolayı, akciğer kanser hücrelerine karşı yüksek bir anti-kanser etkinlik potansiyeline sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte özellikle hücre ölüm modunun belirlenmesi konusunda daha ayrıntılı çalışmalarla *A. nilotica* metanolik yaprak ekstraktlarının, anti kanser etkinliğinin mekanizmasının ayrıntılandırılmasına ihtiyaç olduğunu da düşünmekteyiz. Ayrıca *A. nilotica* bitkisinin sahip olduğu biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ile gerçekleştirilecek çalışmaların anti kanser aktivitede temel rol oynayan bileşiğin aydınlatılmasına çok önemli katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

A, Banso. (2009). Phytochemical and Antibacterial Investigation of Bark Extracts of Acacia Nilotica. *Journal of Medicinal Plants Research,* 3(2), 082-085. doi: 10.5897/JMPR.9000985

Abbas, ZTEM ve Wafa Ibrahim Elhag. (2015). In vitro antibacterial activity of Acacia nilotica methanolic extract against wound infection pathogen. *Am J Res Commun,* 3, 111-21.

Abbassy, M. M. S., H. Z. Ibrahim, ve Mahenaz A. A. Gab Alla. (2018). Evaluating the Insecticidal and Fungicidal Efficiency of Acacia nilotica Pods Extract. *Journal of Plant Protection and Pathology,* 9(5), 283-89. doi: 10.21608/jppp.2018.41410

Abdel-Farid, I. B., M. G. Sheded ve E. A. Mohamed. (2014). Metabolomic Profiling and Antioxidant Activity of Some Acacia Species. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 21(5), 400-408. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.03.005

Abuelgassim, O. A. (2013). Antioxidant potential of date palm leaves and Acacia nilotica fruit in comparison with other four common Arabian medicinal plants. *Life Sci J,* 10(4), 3405-10.

Agunu, Abdulkarim, Sadiq Yusuf, Gabriel Onyiloyi Andrew, Abdulkadir Umar Zezi, ve Ezzeldin Mukhtar Abdurahman. (2005). Evaluation of Five Medicinal Plants Used in Diarrhoea Treatment in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology,* 101(1), 27-30. doi: 10.1016/j.jep.2005.03.025

Alberg, Anthony J., Malcolm V. Brock, Jean G. Ford, Jonathan M. Samet ve Simon D. Spivack. (2013). Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest,* 143(5), e1S-e29S. doi: 10.1378/chest.12-2345

Ali, Atif, Naveed Akhtar, Barkat Ali Khan, Muhammad Shoaib Khan, Akhtar Rasul, Nayab Khalid, Khalid Waseem, Tariq Mahmood ve Liaqat Ali. (2012). Acacia nilotica: a plant of multipurpose medicinal uses. *Journal of medicinal plants research,* 6(9),1492-96.

Alwan, Ala, David R. MacLean, Leanne M. Riley, Edouard Tursan d'Espaignet, Colin Douglas Mathers, Gretchen Anna Stevens ve Douglas Bettcher. (2010). Monitoring and Surveillance of Chronic Non-Communicable Diseases: Progress and Capacity in High-Burden Countries. *The Lancet,* 376(9755), 1861-68. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61853-3

American Type Culture Collection. (t.y.). A549 | ATCC. Erişim adresi: https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185

American Type Culture Collection. (t.y.). ATCC: The Global Bioresource Center. Erişim adresi: https://www.atcc.org/

American Type Culture Collection. (t.y.). NCI-H1299 | ATCC. Erişim adresi: https://www.atcc.org/products/crl-5803

Aslam, Muhammad, Rizwana Raheel, Shahzad Asghar ve Muhammad Ashraf. (2014). Phytochemıcal, Ethnopharmacologıcal Revıew Of Acacıa Nılotıca (Desı Kıkar) And Taxo-Pharmacology Of Genus Acacıa. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science,* 1, 65-72.

Bachaya, Hafiz Allah, Zafar Iqbal, Muhammad Nisar Khan, Zia-ud-Din Sindhu ve Abdul Jabbar. (2009). Anthelmintic Activity of Ziziphus Nummularia (Bark) and Acacia Nilotica (Fruit) against Trichostrongylid Nematodes of Sheep. *Journal of Ethnopharmacology,* 123(2), 325-29. doi: 10.1016/j.jep.2009.02.043

Balunas, Marcy J., ve A. Douglas Kinghorn. (2005). Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sciences,* 78(5), 431-41. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.012

Bargali, Kiran ve S. S. Bargali. (2009). Acacia nilotica: a multipurpose leguminous plant. *Nature and Science,* 7(4), 11-19.

Benzie, Iris F. F. ve Sissi Wachtel-Galor. (2011). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, Second Edition*. CRC Press

Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Elisabete Weiderpass ve Isabelle Soerjomataram. (2021). The Ever-Increasing Importance of Cancer as a Leading Cause of Premature Death Worldwide. *Cancer,* 127(16), 3029-30. doi: 10.1002/cncr.33587

Commar, Alison, Vinayak K. Prasad, Edouard Tursan d'Espaignet, Luke Wolfenden ve Weltgesundheitsorganisation. (2018). WHO Global Report on Trends in Prevalence of Tobacco Smoking 2000-2025. *World Health Organization.*

Cooper, Geoffrey M. (2000). The Development and Causes of Cancer. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*.

Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis,* 23(3), 143-151.

Cragg, Gordon M., Paul G. Grothaus ve David J. Newman. (2009). Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chemical Reviews,* 109(7), 3012-43. doi: 10.1021/cr900019j

Cragg, Gordon M., ve David J. Newman. (2013). Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects,* 1830(6), 3670-95. Doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008

Çavaş, T., Könen, S. (2008). In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology,* 90, 154-159.

Dafallah, Abdullah A., ve Zaki Al-Mustafa. (1996). Investigation of the Anti-inflammatory Activity of Acacia nilotica and Hibiscus sabdariffa. *The American Journal of Chinese Medicine,* 24(03n04), 263-69. doi: 10.1142/S0192415X96000323

Dev, Swami Narsingh, Kantishree De ve Shraddha Singh. (2014). Antimicrobial activity and phytochemical analysis of Acacia nilotica (L.) Del. *Indian Journal of Applied Economics,* 331-32.

Dhabhai, Kshipra, ve Amla Batra. (2012). Physiological and phylogenetic analysis of rhizobia isolated from Acacia nilotica L. *African Journal of Biotechnology,* 11(6), 1386-90.

Dongmo, A. B., T. Nguelefack, ve M. A. Lacaille-Dubois. (2005). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Acacia Pennata Wild (Mimosaceae). *Journal of Ethnopharmacology,* 98(1), 201-6. doi: 10.1016/j.jep.2005.01.030

Eldeen, I. M. S., F. R. Van Heerden ve J. Van Staden. (2010). In Vitro Biological Activities of Niloticane, a New Bioactive Cassane Diterpene from the Bark of Acacia Nilotica Subsp. Kraussiana. *Journal of Ethnopharmacology,* 128(3):555-60. doi: 10.1016/j.jep.2010.01.057

Ford, Dee Walker, Kathryn A. Koch, Daniel E. Ray ve Paul A. Selecky. (2013). Palliative and End-of-Life Care in Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest,* 143(5), e498S-e512S. doi: 10.1378/chest.12-2367

Franken, N.A.P, Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc,* 1(5), 2315-2319.

Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1998). Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry,* 46(8), 895-900.

Gerber, B., C. Scholz, T. Reimer, V. Briese ve W. Janni. (2006). Complementary and Alternative Therapeutic Approaches in Patients with Early Breast Cancer: A Systematic Review. *Breast Cancer Research and Treatment,* 95(3), 199-209. doi: 10.1007/s10549-005-9005-y

Gilani, A. H., F. Shaheen, M. Zaman, K. H. Janbaz, B. H. Shah ve M. S. Akhtar. (1999). Studies on Antihypertensive and Antispasmodic Activities of Methanol Extract of Acacia Nilotica Pods. *Phytotherapy Research,* 13(8), 665-69. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573

Gorlova, Olga Y., Shih-Feng Weng, Yiqun Zhang, Christopher I. Amos ve Margaret R. Spitz. (2007). Aggregation of Cancer among Relatives of Never-Smoking Lung Cancer Patients. *International Journal of Cancer,* 121(1), 111-18. doi: 10.1002/ijc.22615

Jangade, N. M., P. B. Nagargoje ve P. J. Shirote. (2014). Isolation, phytochemical and biological evaluation of Acacia nilotica (L) willd. Leaf extract. *Int J Pharmacog Phytochem Res,* 6, 179-82.

Jeong, Soo-Jin, Wonil Koh, Bonglee Kim ve Sung-Hoon Kim. (2011). Are There New Therapeutic Options for Treating Lung Cancer Based on Herbal Medicines and Their Metabolites. *Journal of Ethnopharmacology,* 138(3), 652-61. doi: 10.1016/j.jep.2011.10.018.

Kalaivani, T., ve Lazar Mathew. (2010). Free Radical Scavenging Activity from Leaves of Acacia Nilotica (L.) Wild. Ex Delile, an Indian Medicinal Tree. *Food and Chemical Toxicology,* 48(1), 298-305. doi: 10.1016/j.fct.2009.10.013

Kankara, Sulaiman Sani, Mohd H. Ibrahim, Muskhazli Mustafa ve Rusea Go. (2015). Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used for Traditional Maternal Healthcare in Katsina State, Nigeria. *South African Journal of Botany,* 97, 165-75. doi: 10.1016/j.sajb.2015.01.007

Kashfi, Khosrow. (2013). Dysfunctional Cell Signaling Dynamics in Oncology: Diagnostic, Prognostic and Treatment Opportunities. *Biochemical Pharmacology,* 85(5), 595-96. doi: 10.1016/j.bcp.2012.12.020

Kuete, V., L. P. Sandjo, J. A. Seukep, M. Zeino, A. T. Mbaveng, B. Ngadjui ve T. Efferth. (2015). Cytotoxic compounds from the fruits of Uapaca togoensis towards multifactorial drug-resistant cancer cells. *Planta Medica,* 81(1), 32-38. doi: 10.1055/s-0034-1383362

Kumari, Mamta, Shashi Jain ve Rashmi Dave. (2014). Babul (Acacia nilotica): A potential source of tannin and its suitability in management of type II diabetes. *Nutrition & Food Science,* 44(2), 119-26. doi: 10.1108/NFS-06-2013-0072

Light, M. E., S. G. Sparg, G. I. Stafford ve J. van Staden. (2005). Riding the Wave: South Africa's Contribution to Ethnopharmacological Research over the Last 25 Years. *Journal of Ethnopharmacology,* 100(1), 127-30. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.028

M. Rudin, MD, PhD, C., & B. Thompson, MD, C. (1997). Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annual review of medicine,* 48(1), 267-281.

Malviya, Sapna, Swati Rawat, Anil Kharia ve Meena Verma. (2011). Medicinal attributes of Acacia nilotica Linn.-A comprehensive review on ethnopharmacological claims. *International journal of pharmacy & life sciences,* 2(6).

Martin, S., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., Laface, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), 1545-1556.

Mbele, Mzwandile, Rodney Hull ve Zodwa Dlamini. (2017). African Medicinal Plants and Their Derivatives: Current Efforts towards Potential Anti-Cancer Drugs. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(2), 121-34. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.08.002

Meena, Punar Dutt, Pallavi Kaushik, Shalini Shukla, Anil Kumar Soni, Manish Kumar ve Ashok Kumar. (2006). Anticancer and antimutagenic properties of Acacia nilotica (Linn.) on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced skin papillomagenesis in Swiss albino mice. *Asian Pac J Cancer Prev*, 7(4), 627-32.

Merck. (t.y.). Canlı hücrelerde XTT metobolizasyonu sonucunda suda çözünebilen formozan oluşumu. Erişim adresi: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/27815?lang=en&region=TR

Misar, Ashwini, Rani Bhagat, ve A. M. Mujumdar. (2007). Antidiarrhoeal Activity of Acacia Nilotica Willd. Bark Methanol Extract. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 49-50(1-4), 14-20.

Mohan, Shalini, Kalaivani Thiagarajan, Rajasekaran Chandrasekaran ve Joseph Arul. (2014). In vitro protection of biological macromolecules against oxidative stress and in vivo toxicity evaluation of Acacia nilotica (L.) and ethyl gallate in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 257. doi: 10.1186/1472-6882-14-257

Mu, Lina, Li Liu, Rungui Niu, Baoxing Zhao, Jianping Shi, Yanli Li, Mya Swanson, William Scheider, Jia Su, Shen-Chih Chang, Shunzhang Yu ve Zuo-Feng Zhang. (2013). Indoor Air Pollution and Risk of Lung Cancer among Chinese Female Non-Smokers. *Cancer Causes & Control*, 24(3), 439-50. doi: 10.1007/s10552-012-0130-8

Munshi, A., Hobbs, M. ve Meyn, R. E. (2005). Clonogenic cell survival assay. In *Chemosensitivity*, (s. 21-28). Humana Press.

National Cancer Institute. (2007). What Is Cancer. Erişim adresi: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer

Ntie-Kang, Fidele, Denis Zofou, Smith B. Babiaka, Rolande Meudom, Michael Scharfe, Lydia L. Lifongo, James A. Mbah, Luc Meva'a Mbaze, Wolfgang Sippl ve Simon M. N. Efange. (2013). AfroDb: A Select Highly Potent and Diverse Natural Product Library from African Medicinal Plants. *PLOS ONE*, 8(10), e78085. doi: 10.1371/journal.pone.0078085

Oladosu, P, Isu, N.R, Ibrahim, K, Okolo, P, Oladepo ve D.K. (2013). Time Kill-Kinetics Antibacterial Study of Acacia Nilotica. *African Journal of Microbiology Research*, 7(46), 5248-52. doi: 10.5897/AJMR2013.5889

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3(2), 115-121.

Piperakis, S. M. (2009). Comet assay: a brief history. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 1-3.

Pogue, A. I., Jones, B. M., Bhattacharjee, S., Percy, M. E., Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2012). Metal-sulfate induced generation of ROS in human brain cells: detection using an isomeric mixture of 5-and 6-carboxy-2′, 7′-dichlorofluorescein diacetate (carboxy-DCFDA) as a cell permeant tracer. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 9615-9626.

Rani, Phulan ve Neeraj Khullar. (2004). Antimicrobial Evaluation of Some Medicinal Plants for Their Anti-Enteric Potential against Multi-Drug Resistant Salmonella Typhi. *Phytotherapy Research*, 18(8), 670-73. doi: 10.1002/ptr.1522

Rather, Luqman Jameel ve Faqeer Mohammad. (2015). Acacia nilotica (L.): A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2:12-30.

Revathi, Seemaisamy, Faruck L. Hakkim, Neelamegam R. Kumar, Hamid A. Bakshi, Luay Rashan, Mohammed Al-Buloshi, Sidgi S. A. A. Hasson, Muthukalingan Krishnan, Farideh Javid, ve Kayalvizhi Nagarajan. (2018). Induction of HT-29 Colon Cancer Cells Apoptosis by Pyrogallol with Growth Inhibiting Efficacy Against Drug-Resistant Helicobacter pylori. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents*, 18(13), 1875-84. doi: 10.2174/1871520618666180806104902

Richardson, Mary Ann ve Jeffrey D. White. (2000). Complementary/Alternative Medicine and Cancer Research. *Cancer Practice*, 8(1), 45-48. doi: https://doi.org/10.1046/j.1523-5394.2000.81010.x

Runyoro, J. (2006). Study on Vortex Formation in the Pouring Basin by Direct Observation. *Tanzania Journal of Engineering and Technology*, 29(1), 1-17. doi: 10.52339/tjet.v29i1.369

Sakthive, K. M., N. Kannan, A. Angeline ve C. Guruvayoorappan. (2012). Anticancer activity of Acacia nilotica (L.) Wild. Ex. Delile subsp. Indica against Dalton's ascitic lymphoma induced solid and ascitic tumor model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(8), 3989-95.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*, 48,4827-4833.

Siddiqui, Ammar, Junaid Amin, Freah Alshammary, Eman Afroze, Sameer Shaikh, Hassaan Rathore ve Rabia Khan. (2020). Burden of Cancer in the Arab World. Ss. 1-26 içinde.

Singh, Brahma N., B. R. Singh, R. L. Singh, D. Prakash, B. K. Sarma ve H. B. Singh. (2009). Antioxidant and Anti-Quorum Sensing Activities of Green Pod of Acacia Nilotica L. *Food and Chemical Toxicology,* 47(4), 778-86. doi: 10.1016/j.fct.2009.01.009

Singh, Rajbir, Bikram Singh, Sukhpreet Singh, Neeraj Kumar, Subodh Kumar ve Saroj Arora. (2008). Anti-Free Radical Activities of Kaempferol Isolated from Acacia Nilotica (L.) Willd. Ex. Del. *Toxicology in Vitro*, 22(8), 1965-70. doi: 10.1016/j.tiv.2008.08.007

Singh, Rajbir, Bikram Singh, Sukhpreet Singh, Neeraj Kumar, Subodh Kumar ve Saroj Arora. (2010). Umbelliferone – An Antioxidant Isolated from Acacia Nilotica (L.) Willd. Ex. Del. *Food Chemistry*, 120(3), 825-30. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.022

Sulaiman, C. T., ve V. K. Gopalakrishnan. (2013). Radical scavenging and in-vitro hemolytic activity of aqueous extracts of selected acacia species. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 3(3), 19.

Sundaram, R., ve S. K. Mitra. (2007). Antioxidant activity of ethyl acetate soluble fraction of Acacia arabica bark in rats. *Indian journal of pharmacology*, 39(1), 33.

Sundarraj, Shenbagamoorthy, Ramar Thangam, Vellingiri Sreevani, Krishnasamy Kaveri, Palani Gunasekaran, Shanmugam Achiraman, ve Soundarapandian Kannan. (2012). γ-Sitosterol from Acacia Nilotica L. Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis through c-Myc Suppression in MCF-7 and A549 Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 803-9. doi: 10.1016/j.jep.2012.03.014

Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal ve Freddie Bray. (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), 209-49. doi: 10.3322/caac.21660

Tan, Wen, Jinjian Lu, Mingqing Huang, Yingbo Li, Meiwan Chen, Guosheng Wu, Jian Gong, Zhangfeng Zhong, Zengtao Xu, Yuanye Dang, Jiajie Guo, Xiuping Chen ve Yitao Wang. (2011). Anti-Cancer Natural Products Isolated from Chinese Medicinal Herbs". *Chinese Medicine,* 6(1), 27. doi: 10.1186/1749-8546-6-27

Tanko, Y., U. A. Garkuwa, A. Jimoh, N. M. Sada, K. A. Mohammed, A. Muhammad ve T. A. Makarfi. (2014). Hypoglycaemic effects of methanol crude leaves extract and aqueous fraction of Accacia nilotica on blood glucose levels on experimental animals. *Annals of Biological Sciences,* 2(1), 23-27.

Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P. ve Mendoza, C. (1998). Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular human reproduction,* 4(8), 757-762.

Thiagarajan, Kalaivani, Shalini Mohan, Tapas Kumar Roy ve Rajasekaran Chandrasekaran. (2020). Antiproliferative effect of Acacia nilotica (L.) leaf extract rich in ethyl gallate against

human carcinoma cell line KB. *Indian Journal of Pharmacology,* 52(6), 488-94. doi: 10.4103/ijp.IJP_223_17

Van Wyk, B. E. (2015). A Review of Commercially Important African Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology,* 176, 118-34. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.031

Vengadesan, G., A. Ganapathi, S. Amutha ve N. Selvaraj. (2002). In Vitro Propagation of Acacia Species—a Review. *Plant Science,* 163(4), 663-71. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00144-9

Wolfgang, Kathe. (2005). The revision of the 'WHO/IUCN/WWF guidelines on the conservation of medicinal plants': a step forward in medicinal plant conservation and sustainable use. *Herbal Gram,* 66, 60-61.

Zembruski, N. C., Stache, V., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical biochemistry,* 429(1), 79-81.