



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU BAZLI ORGANİK TÜRK PROPOLİSİNİN
GENOTOKSİK-ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN TAVUK YUMURTASI
MİKRONÜKLEUS TESTİYLE (HET-MN)
BELİRLENMESİ

Semra ARABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haziran-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Semra ARABA tarafından hazırlanan ‘‘Su Bazlı Organik Türk Propolisinin Genotoksik-Antigenotoksik Etkilerinin Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testiyle (HET-MN) Belirlenmesi’’ adlı tez çalışması 01/06/2023 tarihinde aŐağıdaki jüri tarafından oy birliğı / oy okluğı ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri yeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

.....

Danışman

Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

.....

ye

Prof. Dr. Gökalp zmen GÜLER

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr.

FBE Müdürü

Bu tez alışması BAP Koordinatrlğı tarafından 22201024 nolu proje ile desteklenmiŐtir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Semra ARABA

Tarih: 01.06.2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU BAZLI ORGANİK TÜRK PROPOLİSİNİN GENOTOKSİK- ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN TAVUK YUMURTASI MİKRONÜKLEUS TESTİYLE (HET-MN) BELİRLENMESİ

Semra ARABA

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

2023, viii+85 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Prof. Dr. Gökalep Özmen GÜLER

Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

Propolis eski çağlardan beri halk hekimliğinde kullanılan bir arı ürünüdür. Propolis biyolojik olarak antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser/antitümöral ve antijenotoksik etkilere sahiptir. Yapısında çoğunlukla flavonoidler ve fenolik bileşikler yer almaktadır. Propolis tedavi amaçlı kullanıldığı için etkileri detaylı bir şekilde araştırılmalıdır. Ayrıca son zamanlarda Covid-19 pandemisinin etkisiyle her geçen gün propolise olan ilgi artmaktadır. Bu çalışmanın amacı su bazlı organik Türk propolisinin olası genotoksik ve antijenotoksik etkilerini tavuk yumurtası mikronükleus testini (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) kullanarak değerlendirmektir. Propolisin üç farklı dozu (500, 250 ve 50 µg/yumurta) genotoksik etkilerini belirlemek için döllenmiş tavuk yumurtalarına inkübasyonun sekizinci gününde enjekte edilmiştir. Genotoksik madde olarak Siklofosamid (50 µg/yumurta) kullanılmıştır. Ayrıca antijenotoksik etkiyi tespit etmek için Siklofosamid propolisle birlikte enjekte edilmiştir. Askorbik asit (50 µg/yumurta) antijenotoksik madde olarak kullanılmıştır. Kuluçkanın 11. gününde embriyoların periferik kan frotileri hazırlanmıştır ve modifiye May-Grünwald Giemsa boyama metoduyla boyanmıştır. Eritrositlerdeki mikronükleus ve nükleer anormalliklerin frekansları ışık mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre su bazlı organik Türk propolisi test edilen üç dozda herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir. Bununla birlikte propolisin sadece en düşük dozu antijenotoksik etki göstermiştir. Ayrıca embriyolar teratojenite açısından makroskobik olarak incelenmiştir. Embriyoların bir kısmı kemik gelişiminin değerlendirilmesi için Alizarin Red-S'yle boyanmıştır. Propolisin teratojenik bir etkisi gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Antijenotoksisite, Askorbik Asit, Genotoksisite, Mikronükleus, Propolis, Siklofosamid.

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF GENOTOXIC-ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF WATER-BASED ORGANIC TURKISH PROPOLIS BY HEN'S EGG TEST FOR MICRONUCLEUS INDUCTION (HET-MN)

Semra ARABA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

Advisor: Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

2023, viii+85 Pages

Jury

Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

Propolis is a bee product that has been used in folk medicine since ancient times. Propolis has biologically antimicrobial, anti-inflammatory, anti-allergic, antioxidant, anticancer/antitumoral and antigenotoxic effects. It mostly contains flavonoids and phenolic compounds. Since propolis is used for therapeutic purposes, its effects should be investigated in detail. In addition, interest in propolis has been recently increasing day by day with the effect of the Covid-19 pandemic. The aim of this study is to evaluate the possible genotoxic and antigenotoxic effects of water-based organic Turkish propolis using Hen's Egg Test for Micronucleus Induction (HET-MN). Three different doses (500, 250 ve 50 µg/egg) of propolis were injected into fertilized chicken eggs at incubation day 8 to determine genotoxic effects. Cyclophosphamide (50 µg/egg) was used as genotoxic agent. In addition, doses of propolis were injected together with Cyclophosphamide to determine the antigenotoxic effect. Ascorbic acid (50 µg/egg) was used as antigenotoxic agent. Embryonic peripheral blood smears were prepared and stained with a modified May-Grünwald-Giemsa method on 11th day of incubation. The frequencies of MN and nuclear abnormalities in erythrocytes were determined using light microscopy. According to statistical analysis results, water-based organic Turkish propolis did not show any genotoxic effect at the three doses tested. However, only lowest dose of the propolis showed antigenotoxic effect. In addition, embryos were macroscopically examined for teratogenicity. Some of the embryos were stained with Alizarin Red-S for evaluation of bone development. No teratogenic effects were observed.

Keywords: Antigenotoxicity, Ascorbic Acid, Cyclophosphamide, Genotoxicity, Micronucleus, Propolis.

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca bana her daim yön gösteren, destek ve emeklerini esirgemeyen, beni yüreklendiren, benimle ilgilenirken büyük bir sabır gösteren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın uygulama kısmında yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. İlhami ÇELİK'e, dömlü tavuk yumurtası temininde yardımcı olan Veteriner Hekim Hakan KONYA'ya, gerekli kimyasalları elde etmemde bana yardımcı olan Prof. Dr. Atilla ARSLAN'a, Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN'a, Doç. Dr. Bahar YILMAZ ALTINOK'a, Biyomühendis Yaşar GÜZEL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca bana her daim inanan, güvenen ve destekleyen, evladı olmaktan her zaman gurur duyduğum ve varlığına şükrettiğim annem Muhabbet BOZKURT'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca 22201024 nolu projeye "2000 TL" maddi destek sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Semra ARABA
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Propolis ve Propolisin Biyolojik Aktiviteleri	3
2.1.1. Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesi	6
2.1.2. Propolisin Antienflamatuar Aktivitesi.....	7
2.1.3. Propolisin Antialerjik Aktivitesi.....	8
2.1.4. Propolisin Antioksidan Aktivitesi	8
2.1.5. Propolisin Antikanser/Antitümör Aktivitesi.....	9
2.2. Genotoksisite ve Genotoksisite Testleri	9
2.2.1. Mikronükleus (MN) ve Mikronükleus Testi	12
2.2.2. Propolisle İlgili Yapılan Genotoksisite/Antigenotoksisite Çalışmalar	17
2.2.3. Siklofosfamid (CP).....	22
2.2.4. Askorbik Asit (C vitamini).....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Dozların Belirlenmesi ve Yumurtaların İnkübe Edilmesi	27
3.2.2. Test Solüsyonlarının Yumurtalara Enjeksiyonu.....	29
3.2.3. Yumurtaların Açılması ve Embriyoların Değerlendirilmesi	30
3.2.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Frotilerin Hazırlanması	31
3.2.5. Kan Frotilerinin Boyanması	32
3.2.6. Preparatların Analiz Edilmesi.....	32
3.2.7. İstatistiksel Analizler	33
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	34
4.1. Araştırma Sonuçları	34
4.1.1. Genel Gözlemler.....	34
4.1.2. HET-MN Sonuçları	40
4.2. Tartışma	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
5.1. Sonuçlar	65
5.2. Öneriler	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

® : Tescilli ticari marka

Kısaltmalar

AA: Askorbik Asit (C vitamini)

ADME: Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion)

Ames Testi: Bakteri Revers Mutasyon Testi, *Salmonella typhimurium* Reverse Mutation Assay

CAPE: Kafeik Asit Fenil Ester

CBMNA: Sitokinez-Blok Mikronükleer Testi (Cytokinesis-Block Micronucleus Assay)

Comet: Tek Hücreli Jel Elektroforez Tahlili (Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE))

CP: Siklofosfamid

HET-MN: Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction)

HH skalası: Hamburger ve Hamilton (1951) skalası

CA: Kromozom Aberasyon (Chromosome Aberration, CA)

MN: Mikronükleus (Micronucleus, MN)

MI: Mitotik İndeks

NA: Nükleus Anormalliği (Nuclear Abnormality)

SCE: Kardeş Kromatit Değişimi (Sister chromatid Exchange, SCE)

1. GİRİŞ

Doğal maddeler; yaygın bulunabilirlikleri ve popülerlikleri sebebiyle küresel epidemiyolojik sorunların çözümünde giderek daha önemli hale gelmiştir (Ozarowski ve Karpiński 2023). Propolis ise bal arılarının kavak, söğüt, karaağaç, kızılağaç ve kozalaklı ağaçlar gibi bitkilerin tomurcuklarından, çiçeklerinden ve yapraklarından elde ettiği bitki salgılarını ve reçinemsî maddeleri baş kısmındaki β -glukosidaz enzimiyle bir araya getirip zenginleştirdiği doğal bir üründür (Zullkiflee ve ark. 2022, Gniewosz ve ark. 2023).

Propolisin önemiyle ilgili ilk literatürlerden biri Ghisalberti (1979)'ye aittir (Doğan ve Hayoğlu 2012). Tarihsel olarak propolisi Romalılar ve Yunanlılar apse gibi cilt hastalıklarının tedavisinde, Asurlular yaraları ve tümörleri iyileştirmede, İnkalar ateş düşürmede, Mısırlılar ise mumyalamada kullanmışlardır (Afata ve ark. 2022, Pilario ve ark. 2022). Günümüzde ise propolis dünyada kozmetik, gıda ve ilaç sanayileri gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Hirata ve ark. 2021, Song ve ark. 2021, Afata ve ark. 2022, Shakoury ve ark. 2022). Çeşitli formlardaki propolis, dünya çapında çeşitli sağlık durumlarında hastalar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır ve genel olarak ek gıda takviyesi olarak kullanılırken son zamanlarda Londra Farmakope'sinde resmi ilaçlar arasında yer almıştır (Yıldız ve Ünal 2022, Ozarowski ve Karpiński 2023).

Propolisin ana bileşenlerini aromatik asitler, triterpenoidler, diterpenoid asitler, fenolik bileşikler ve flavonoidler oluşturmaktadır (Rushdi ve ark. 2014). Ayrıca propolis, esansiyel yağ asitleri ($\omega 3$ ve $\omega 6$ yağ asitleri gibi), esansiyel aminoasitler, mineraller ve vitaminler (tiamin, riboflavin, piridoksin, nikotinik asit, pantotenik asit, askorbik asit ve tokoferol gibi) için iyi bir kaynaktır (Güney ve Yılmaz 2013, Abdellatif ve ark. 2021, Pant ve ark. 2022).

Propolisin yapısında 500'ün üzerinde biyolojik aktif bileşen yer almaktadır (Peixoto ve ark. 2021). İnsan sağlığı açısından bu bileşenlerin etkilerinin her açıdan bilinmesi büyük önem kazanmaktadır. Bu bağlamda propolisin genotoksik/antigenotoksik etkisinin tespit edilmesi de güvenle kullanılabilirliğini destekleyecektir.

Günümüzde genotoksik maddelerin neden olduğu sorunlar gittikçe artmaktadır. Canlıların maruz kaldığı bu maddelerin etkilerini belirlemek için genotoksisite testleri geliştirilmiştir ve bu testler aynı zamanda genotoksik hasarı onaran antigenotoksik maddelerin etkilerini belirlemek için de kullanılmaktadır. Mikronükleus (MN) testi

sıklıkla kullanılan bir genotoksisite test yöntemidir. Wolf ve Luepke (1997) kuluçkaya alınan dömlü tavuk yumurtalarında gelişen embriyoların periferik kan eritrositlerinde MN oluşumunu rapor ederek, Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) olarak isimlendirdikleri alternatif bir yöntemi geliştirmişlerdir. Daha sonra bu yöntemde modifikasyonlar yapmışlar ve çok sayıda literatür yayınlamışlardır (Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003, Wolf ve ark. 2008, Greywe ve ark. 2012). Son derece basit, ucuz ve hızlı bir genotoksisite testi olan bu yöntem, hayvan hakları açısından ve etik açıdan da makul görülmektedir. Bu testin bir hayvan deneyi olmadığı ve *in vitro* testlere daha yakın olduğunun düşünülmesi, ayrıca test edilecek maddenin sistemik bir yoldan (Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım aşamalarından) geçmesine imkân sağlaması testin en önemli avantajıdır. Son yıllarda bu yöneme son şeklini veren (Reisinger ve ark. 2019, Reisinger ve ark. 2022) ve değerlendirmeye yardımcı kan hücreleriyle ilgili renkli atlaslı yeni literatürler yayınlanmıştır (Maul ve ark. 2022).

İnsanlar tarafından tedavi amaçlı kullanılan propolisin genotoksik/antigenotoksik etkilerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalar sınırlı sayıda. Bu çalışmada ülkemizin farklı bölgelerinden toplanıp bir araya getirilerek Fanus® ticari markasıyla piyasada satılan su bazlı organik Türk propolisinin olası genotoksik/antigenotoksik etkileri HET-MN kullanılarak ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca propolisin tavuk embriyoları üzerindeki olası teratojenik etkileri de bu çalışmayla ilk kez değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Propolis ve Propolisin Biyolojik Aktiviteleri

Propolis genellikle bal arılarının (*Apis mellifera* L., 1758) bitkilerin tomurcuklarından, dallarından ve filizlerinden topladıkları bitki salgılarını ve reçinensi maddeleri baş kısmındaki β -glukosidaz enzimiyle bir araya getirip içine bir miktar da bal mumu ekleyerek ürettiği doğal bir karışımdır (Kim ve ark. 2019, Rocha ve ark. 2021, Salleh ve ark. 2021, Sarıkahya ve ark. 2021, Song ve ark. 2021, Afata ve ark. 2022, De Oliveira Sartori ve ark. 2022, Ibrahim ve Alqurashi 2022, Mendez Pfeiffer ve ark. 2022, Neto ve ark. 2022, Surek ve ark. 2022, Gniewosz ve ark. 2023). Etimolojik olarak propolis kelimesi, Yunanca pro 'önünde, girişinde' ve polis 'topluluk, şehir' (kovan savunmasına katkıda bulunması) anlamına gelmektedir (Doğan ve Hayoğlu 2012, Afata ve ark. 2022, Pilario ve ark. 2022).

Bal arıları propolisi kovanda çatlak ve boşlukları doldurmak, neme karşı sızdırmazlık sağlamak, küf gelişimini engellemek ve kovan girişini daraltarak koloniyi korumaya çalışmak için kullanılmaktadır (Sarıkahya ve ark. 2021, Afata ve ark. 2022, Monteil ve ark. 2022, Shakoury ve ark. 2022, Zuhendri ve ark. 2022). Ayrıca bal arıları ürettikleri bu maddeyle girişin boyutunu ve yönünü, iklim koşullarına uyarlamak için sürekli olarak yeniden şekillendirmektedirler. Bu geçit gelen ve giden her arının geçmesi gereken bir dekontaminasyon hava kilidi oluşturmaktadır (Monteil ve ark. 2022). Propolis aynı zamanda mikroorganizmalara karşı kimyasal bir silahtır ve bal arıları propolisin bu özelliğini kullanarak kovanda tahliye edilemeyecek kadar büyük (sıçan, fare, kertenkele ve yılan gibi) davetsiz misafirleri ve ölü hayvanları mumyalayarak çürümelerini engellemektedirler (Çelemler ve ark. 2016, Salleh ve ark. 2021, Sarıkahya ve ark. 2021, Song ve ark. 2021, Afata ve ark. 2022, Monteil ve ark. 2022, Soós ve ark. 2022, Zuhendri ve ark. 2022).

Propolis üretimi için tutkal kaynağı bitkiler büyük bir öneme sahiptir. Bu bitkiler bulunduğu bölgeye göre değişkenlik göstermektedir ve Dünya üzerinde dağılımları farklıdır. Örneğin; tutkal kaynağı bitki olarak Brezilya'da *Baccharis spp.*, *Araucaria spp.*; Rusya'da huş, kavak, çam; Çin'de söğütgiller, çamgiller, huşgiller, servigiller; Batı Avustralya'da çam, çim ağacı; ABD'deki Hawaii adalarında *Apocynaceae* ve popülasyonu; Türkiye'de ise çam, at kestanesi, kestane, kızılbaş, kavak türleri, erik, dişbudak, huş, ihlamur, okaliptüs, söğüt, fındık, karaağaç, meşe, göknar ve akasya

hakimdir (Kumova 2002, Çelemlı ve ark. 2016, Cui ve ark. 2021). Günümüzde ise propolis, bitkilerin kökenine göre *Baccharis*, *Populus*, Akdeniz, *Clusia* ve *Macaranga* tipi olarak gruplandırılmıştır (Cui ve ark. 2021). Bal arılarının propolisi üretirken kullandıkları bitkilere ve bu bitkilerin bulunduğu konumlara göre biyolojik, kimyasal ve fiziksel özellikleri değişmektedir (Çelemlı ve ark. 2016).

Propolis %40-70 reçine ve bitkisel balzam, %10-30 mum, %5-10 aromatik ve temel bileşikler, %5-10 polen ve diğer organik bileşikler içeren doğal bileşenlerden oluşan son derece karmaşık bir üründür (Afata ve ark. 2022, Garzarella ve ark. 2022, Jeong ve ark. 2022, Monteil ve ark. 2022, Pant ve ark. 2022, Shakoury ve ark. 2022). Propolisteki reçine ve bitkisel balzam, polifenolik bileşikler, flavonoidler, flavanonlar, flavonlar, flavanoller, aromatik bileşikler ve bunların türevleri gibi biyoaktif bileşenlerin çoğunu içermektedir (Pant ve ark. 2022, Pereira ve ark. 2022). Propolisin kimyasal bileşiminde coğrafi bölge, iklim, rakım, mevsim ve flora gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak büyük farklılıklar gözlenmiştir ve yapısında Dünya çapında 500'den fazla kimyasal bileşik tespit edilmiştir (Peixoto ve ark. 2021, Pant ve ark. 2022). Ayrıca bal arısının türü de bileşenleri etkileyebilmektedir (Pant ve ark. 2022). Propoliste; Sodyum (Na), Potasyum (K), Magnezyum (Mg), Kalsiyum (Ca), Bor (B) (eser), Baryum (Ba), Çinko (Zn), Stronsiyum (Sr), Kadmiyum (Cd), Selenyum (Se) (eser), Alüminyum (Al), Nikel (Ni), Silisyum (Si), Mangan (Mn), Krom (Cr), Demir (Fe), Titanyum (Ti), Vanadyum (V), Kobalt (Co), Gümüş (Ag) gibi inorganik maddeler de bulunmaktadır (Çelik ve ark. 2017).

Propolis doğası gereği hidrofobiktir, oda sıcaklığında sert ve kırılımandır, ısıtıldığında ise yumuşak ve yapışkan hale gelmektedir (Çalışkol 2013, Monteil ve ark. 2022, Onur ve ark. 2022). Bu doğal maddenin erime noktası 60-70 °C arasındadır. Propolis erken yaşlarda yeşil ve sarı renklerinde, yaş aldıkça da rengi koyu kahverengine doğru değişmektedir (Çalışkol 2013). Genellikle reçinemsı yapısı sebebiyle ham halde tüketilmediği gibi biyoyararlılığında oldukça düşüktür (Gülbol Duran 2007, Keskin 2018, Monteil ve ark. 2022). Propolis bitkisel yağ, su, propoilen glikol, gliserol, eter, metanol, kloroform, etanol, dimetilsülfoksit, hegzan, aseton ve diğer organik çözücülerde çözünebilmektedir (Bakkaloğlu ve Arıcı 2019). Ancak suda doğrudan dağılımı, olumsuz reolojik özelliklerinden dolayı oldukça problemlidir (Monteil ve ark. 2022). Propolisin yapısındaki aktif bileşenlerin çoğu suda çok az çözünürken %70'lik etanolde daha yüksek oranda çözünmektedir (Gülbol Duran 2007, Keskin 2018, Monteil ve ark. 2022, Shakoury ve ark. 2022). Bu nedenle propolis, esas

olarak hidroalkolik bir çözelti şeklinde pazarlanmaktadır (Monteil ve ark. 2022). Ancak alkolün varlığı yalnızca tıbbi, dini veya yaşa bağlı nedenlerle pazarı sınırlamakla kalmaz, aynı zamanda yutulması durumunda tahriş, alerji, uyuşukluk, baş ağrısı, mide bulantısı ve baş dönmesi gibi çok sayıda semptomu neden olabilmektedir (Keskin 2018, Monteil ve ark. 2022). Yan etkileri azaltmak için ise propolis, sakız, ağız spreyi, şurup ve kapsül olarak kullanıma sunulmuştur (Kumova 2002, Yücel ve ark. 2014, Monteil ve ark. 2022). Propolisin daha geniş uygulanabilirliği için nanofiltrasyon yoluyla sulu karışımlar üretilmiştir. Propolisin sulu ekstraktları biyolojik olarak daha dosttur fakat bu tür solüsyonlarda aktif bileşiklerin seviyeleri, etanolik propolis ekstraktlarına kıyasla 10-20 kat daha düşüktür (Monteil ve ark. 2022).

Propolisin biyoaktiviteleri genellikle bileşenler arasındaki sinerjizmlerle bağlantılıdır (Pereira ve ark. 2022). Antimikrobiyal özellikler propolis örneklerinde yaygın olarak bulunurken bunun yanında antioksidan, antikanser/antitümör, antigenotoksik, antienflamatuar, antialerjik dâhil olmak üzere başka biyoaktiviteler de bildirilmiştir (Albayrak ve Albayrak 2008, Ertürk ve Güler 2013, Ünal ve ark. 2020, Bouchelaghem 2021, Campoccia ve ark. 2021, Cui ve ark. 2021, Ibrahim ve Alqurashi 2022, Monteil ve ark. 2022, Pereira ve ark. 2022, Selvaraju ve ark. 2022, Suárez ve ark. 2022, Surek ve ark. 2022). Propolisin yapısındaki bileşenler ve biyoaktiviteleriyle ilgili bazı örnekler Tablo 2.1'de verilmiştir. Propolisin biyoaktivitesi kimyasal bileşim, coğrafi bölge, bitki kaynağı türü, arı türü, hasat zamanı ve ekstraksiyon yöntemi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Suárez ve ark. 2022).

Tablo 2.1. Propolisin yapısında bulunan bileşikler ve biyoaktiviteleri (Yıldız ve Ünal 2022).

Bileşen	Etki
Apigenin	Antibakteriyel, antiviral, antiülser, antikanserojen
Artepillin C	Antikanserojen, antilösemik, böbrek toksisitesini azaltıcı, lipid peroksidaz oluşumunu önleyici
Asasetin	İltihaplanmayı önleyici
Benzoik Asit	Antibakteriyel
Eterik Yağlar	İltihaplanmayı önleyici, antimikrobiyal
Ferulik Asit	Antioksidan, antikanserojen, antibakteriyel, kollajenik
Galangin	Antikanserojen, antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antienflamatuar
Gallik Asit	Prostat kanserini önleyici
Isoferulik Asit	<i>Staphylococcus aureus</i> gelişimini engelleyici
Kaempferol	Antioksidan, antibakteriyel, antienflamatuar, antikanserojenik, antialerjik, antiviral, antidiabetik, ağrı kesici, sinirler üzerine koruyucu
Kafeik Asit	Antibakteriyel, iltihaplanmayı önleyici, antiviral, antikanserojen, antioksidan, mide koruyucu,
Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE)	Antioksidan, antikanserojen, antibakteriyel, immun sistemi uyarıcı

2.1.1. Propolisin Antimikrobiyal Aktivitesi

Propolisin antimikrobiyal aktivitesi en kapsamlı olarak araştırılan çalışmalardan biridir. Bu maddenin antibakteriyel aktivitesi mikroorganizma üzerinde iki şekilde etki göstermektedir. Birincisinde mikroorganizma üzerine doğrudan etki ederken ikincisinde bağışıklık sistemini uyararak organizmanın doğal savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir (Selvaraju ve ark. 2022). Genel olarak gram (+) bakterilerin gram (-) bakterilere göre propolis ekstraktlarına daha duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (Albayrak ve Albayrak 2008, Almuhayawi 2020, Mizuno ve ark. 2021, Vadillo Rodríguez ve ark. 2021, Vică ve ark. 2021, Selvaraju ve ark. 2022). Bunun nedeni, bakterilerin plazma zarlarındaki yapısal farklılıklardır (Almuhayawi 2020, Vadillo Rodríguez ve ark. 2021, Selvaraju ve ark. 2022). Gram (-) bakteriler propolisin biyoaktif bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip daha fazla hidrolitik enzim üretmektedir (Selvaraju ve ark. 2022). Propolisin antimikrobiyal aktivesinin sebebi yapısında bulunan fenolik asitler, basit fenoller, polifenoller ve flavonoidlerdir (Laleni ve ark. 2021, Ibrahim ve Alqurashi 2022). Bu doğal madde antimikrobiyal aktivitesini en iyi etanollü ekstraktında göstermektedir (Bouchelaghem 2021).

Yapılan bir çalışmada propolisin antibakteriyel aktivite olarak 600 farklı bakteri suşuna etki ettiği ve bu etkiyi yapısında bulunan galangin, pinocembrin, ester flavonoid, flavanol ve kafeik asit feniletal gibi bileşenler sayesinde gösterdiği tespit edilmiştir (Almuhayawi 2020, Laleni ve ark. 2021). Burada yer alan bileşenlerin bakteri türlerine,

bakteriyel RNA polimerazı inhibe ederek antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Almuhayawi 2020, Kuley ve ark. 2021). Propolis antibakteriyel olarak *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus türleri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces*, *Shigella*, *Salmonella* ve *Bacillus subtilis* gibi bakterilere etki etmektedir (Doğan ve Hayoğlu 2012).

Bir çalışmada propolisin etanollü ekstraktının streptomisin, ampicilin ve gentamisin gibi antibiyotiklerin etkisini yüksek düzeyde arttırdığı, kloramfenikol, seftriakson ve vankomisin'in etkisini orta düzeyde arttırdığı, eritromisin'in ise antimikrobiyal aktivitesini değiştirmedığı tespit edilmiştir (Albayrak ve Albayrak 2008). Propolis uzun süre kullanıldığında yararlı bakterileri olumsuz olarak etkilememekte ve zararlı bakterilere karşı da direnç oluşturmamaktadır (Kumova 2002).

Propolisin yapısında yer alan fenolikler ve flavonoidler antiviral etki göstermesine neden olan bileşenlerdir. Bu bileşenler virüsün replikasyonunu kontrol etmektedir ve konak savunma sistemini aktive etmektedir (Cui ve ark. 2021, Sarıkahya ve ark. 2021). Propolis SARS-CoV-2 virüsüne, *Pseudorabies* virüsüne, *Herpes*'e, Retrovirüslere, *Influenza*'ya, Patates virüsüne, Human Immunodeficiency Virüsü (HIV)'ne, kümes hayvanları bulaşıcı virüsü ve çiftlik hayvanları virüslerine karşı antiviral aktivite göstermektedir (Doğan ve Hayoğlu 2012, Cui ve ark. 2021, Liao ve ark. 2021, Silveira ve ark. 2021).

Ayrıca propolisin *Plasmopara viticola*, *Candida albicans*, *Ascosphaera apis*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* gibi türlere antifungal etki; farklı mikobakteri türlerine karşı antitüberküloz etki; *Giardia*, *Toxoplasma*, *Plasmodium* ve *Trichomonas* gibi hastalık etkenlerine karşı ise antiprotozoal etki gösterdiği de tespit edilmiştir (Yıldırım ve ark. 2004, Doğan ve Hayoğlu 2012, Ünal ve ark. 2020).

2.1.2. Propolisin Antienflamatuar Aktivitesi

Propolisin yapısında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler bu maddenin antienflamatuar etki göstermesine neden olmaktadır (Yılmaz ve ark. 2004, Aldemir ve Memmedov 2019, Cui ve ark. 2021). Bu etki prostaglandinler ve lökotrienlerin sentezinin inhibe edilmesi, trombosit agregasyonunun önlenmesi ve histamin gibi ateşlenmeye sebep olan maddelerin serbest kalmasının engellenmesiyle gerçekleşmektedir (Yılmaz ve ark. 2004, Memmedov ve ark. 2017). Propolisin antienflamatuar etkisiyle ilişkili olan ana mekanizmalar, serbest radikal süpürme,

siklooksijenaz ve prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, azaltılmış enflamatuar sitokin salgılanması ve nitrik oksit sentezinin inhibisyonunu içermektedir. Bununla birlikte propolisin cilt iyileştirme etkisi ve cilt koruması, cilt dokusu büyümesini ve yenilenmesini uarması, oksidatif strese maruz kaldıktan sonra kolajen üretimi ve hücre canlılığını iyileştirmesi gibi özellikleri de bulunmaktadır (Conte ve ark. 2022).

2.1.3. Propolisin Antialerjik Aktivitesi

Propolisin yapısında bulunan krisin ve kaempferol gibi bileşikler, alerjik olarak ortaya çıkan enflamatuar reaksiyonların baskılanmasını sağlamaktadır ve bazofil ile mast hücrelerini etkileyerek antialerjik etki göstermektedir (Ünal ve ark. 2020, Kashiwakura ve ark. 2021). Bu nedenle propolis kullanarak tedavi edilen hassas bireyler gıda alerjik reaksiyonlarına karşı koruma sağlayabilmektedirler (Kashiwakura ve ark. 2021). Ayrıca propolisde bulunan bioflavonoidler, kimyasalların alerjik reaksiyon oluşturmalarını da engellemektedir. Tüm bunlara ek olarak propolis, septik şok tedavisinde de kullanılabilir (Ünal ve ark. 2020).

2.1.4. Propolisin Antioksidan Aktivitesi

Genel olarak propolisin polifenolikler ve flavonoidler gibi bol miktarda antioksidan içerdiği bilinmektedir (Shehata ve ark. 2020, Irigoiti ve ark. 2021, Ibrahim ve Alqurashi 2022, Mei ve ark. 2022). Bu bileşiklerin yüksek antioksidan aktivitesi, aromatik bir hidroksil grubunun hidrojen atomlarını ve elektronlarını bir serbest radikale verme yeteneklerine ve aromatik halka çift bağ sistemindeki yüklerin delokalizasyon olasılığına bağlanmıştır (Irigoiti ve ark. 2021). Propolisin antioksidan aktiviteleri, biyoaktif bileşikler arasındaki etkileşimlerden ortaya çıkmaktadır (Mei ve ark. 2022). Propolisdeki flavonoidler, düşük redoks potansiyeline sahip bir madde sınıfı içermektedir ve indirgeyici ajan olarak kullanılabilir. Bu madde sınıfı, hidrojen sağlama ve vücuttaki serbest radikalleri etkili bir şekilde ortadan kaldırma yeteneğine sahiptir (Cui ve ark. 2021). Propolisdeki flavonoidler sadece aktif serbest radikalleri temizlemekle kalmaz aynı zamanda iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek ve dolaşımı daha iyi desteklemek için aktif serbest radikaller tarafından katalize edilen metal iyonlarıyla iş birliği yaparak yaşlanma karşıtı bir rol oynamaktadır (Memmedov ve ark. 2017, Cui ve ark. 2021, Ibrahim ve Alqurashi 2022).

2.1.5. Propolisin Antikanser/Antitümör Aktivitesi

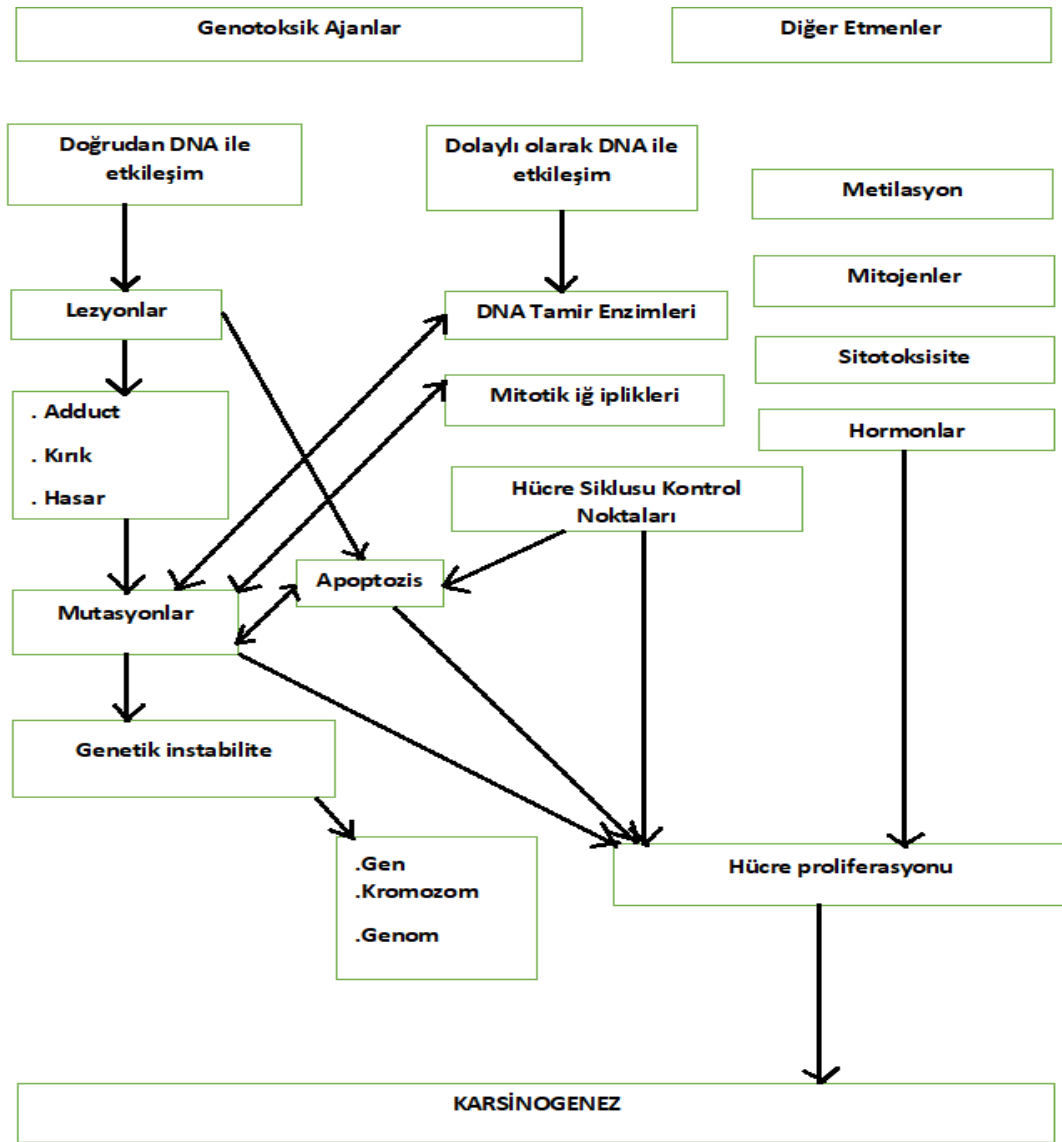
Propolisin yapısında bulunan flavonoidler meme, akciğer, ağız kanserlerinin yanı sıra yemek borusu, mide, kolorektal, prostat, mesane, böbrek, kolon, pankreas, karaciğer, kan, beyin ve omurilik, boyun ve cilt kanserlerine de etki etmektedir (Seven ve ark. 2007, Memmedov ve ark. 2018, Anjum ve ark. 2019, Acun ve Gül 2020). Propolisin antikanser özellikleri, apoptozun indüklenmesi, mitokondriyal stresin indüklenmesi, hücre döngüsünün durdurulması ve hücre proliferasyonu ve büyümesinin inhibisyonu gibi farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır (Sameni ve ark. 2021). Bununla birlikte propolisin antikanser özellikleri artırılmış bağışıklık gözetimine, kanser kök hücre popülasyonlarındaki azalmaya, güçlendirilmiş antioksidan duruma, proliferasyonun baskılanmasına, antianjiyogeneze, spesifik onkojenik sinyal yollarının tıkanmasına, kemoterapötiklerin geliştirilmesine, tümör mikroçevresinin modülasyonuna ve ilaçların yan etkilerinin azaltılmasına dayanmaktadır (Memmedov ve ark. 2018).

Propolisin yapısındaki artepillin C ve Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE) gibi bileşenler, bu maddenin antitümör etki göstermesine sebep olmaktadır (Yılmaz ve ark. 2004, Anjum ve ark. 2019, Azarshinfam ve ark. 2021). Propolisdeki galangin, kardanol, nemoroson ve krisin gibi diğer bileşikler ise tümör hücrelerinin hızla bölünmesini önlemektedir. CAPE'de tümör baskılayıcı proteinlerin varlığı C6 glioma hücrelerinin apoptozisine neden olur. Kafeik asit ve esterlerin yanı sıra fenolik bileşikler ve diterpenoidler tümör hücrelerine karşı yıkıcı yeteneğe sahiptir. Propolisin antitümör etkisi polifenolik bileşenlerinin birleşik işlevinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca Türk propolisinin apoptozu artırarak antitümör etki gösterdiği ve ayrıca DNA sentezini kısıtlayarak üridin, timidin ve lösinin kansere sebep olan hücreler haline gelmesini geciktirdiği belirtilmiştir (Anjum ve ark. 2019).

2.2. Genotoksisite ve Genotoksisite Testleri

Fiziksel ya da kimyasal ajanların kromozom, çekirdek ya da DNA üzerinde hasar oluşturmaya genotoksisite denilmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011b, Yüzbaşıoğlu ve ark. 2016). Bu hasarlar çoğunlukla DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, kromozom anormallikleri ve gen mutasyonlarıdır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011b).

Bazı kimyasallar genotoksik etkilerini metabolize oldukları zaman gösterebilmektedirler. Genotoksik maddeler ya doğrudan DNA'ya etki ederek ya da dolaylı bir şekilde genom bütünlüğünü sağlamak için gerekli olan proteinlere bağlanarak genomik değişikliklere neden olabilmektedirler. Şekil 2.2'de de görüldüğü gibi genotoksik madde hedef etkileşimleri sonucunda, doğrudan ya da dolaylı olarak farklı tipte DNA hasarları meydana gelebilmektedir.



Şekil 2.2. Genotoksik maddelerin DNA üzerinde meydana getirdikleri dolaylı ve direkt olarak etkileri ve bu etkilerin sonuçları (Vatan 2012).

Genotoksik maddelerin oluşturduğu etkiler nedeniyle bireyin kendisinde ve de gelecek nesillerinde anormallikler ortaya çıkabilmektedir. Bu tür sorunları engelleyebilmek adına söz konusu ajanların genotoksik etkilerini araştırabilmek için çeşitli test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu test yöntemlerinin her biri farklı canlı

gruplarını kapsamaktadır. Bu testler kısa süreli olup bir maddenin genotoksitesini incelemede kullanılmaktadırlar (Yüzbaşıoğlu ve ark. 2016).

Genotoksitate testleri, çeşitli mekanizmalarla genetik hasara neden olan bileşikleri tespit etmek için tasarlanmış *in vitro* ve *in vivo* testler olarak tanımlanabilmektedir. Bu tür hasarları tespit eden testlerde pozitif çıkan bileşikler, insan kanserojenleri veya mutajenleri olma potansiyeline sahiptir (Yüzbaşıoğlu ve ark. 2014, Yüzbaşıoğlu ve ark. 2016, Baldrick 2021).

Bu testler içinde en yaygın kullanılan standart *in vivo* ve *in vitro* genotoksitate testleri; Comet testi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), Ames testi (Bakteri Revers Mutasyon Testi, *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay), Kardeş kromatit değişimi testi (Sister chromatid Exchange, SCE), Mikronükleus (Micronucleus, MN) testi ve Kromozom aberasyon (Chromosome Aberration, CA) testidir (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011, Sezginer ve Dane 2016).

Ames testi, mutasyonlara yol açan (genetik hasar üretebilen) birçok kimyasal maddeyi tespit etmek amacıyla tasarlanmış kısa süreli bir bakteriyel ters mutasyon testidir. Bu yöntem test maddelerinin mutajenik özelliklerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Ames testinde amino aside bağlı *Salmonella typhimurium* ve *E.coli* suşları kullanılmaktadır ve her biri histidin operonundaki çeşitli genlerde farklı mutasyonlar taşımaktadır. Bu mutasyonlar farklı mekanizmalar yoluyla DNA hasarına neden olan mutajenler için pozitif olarak görev görmektedir. Ames testinde bir histidin kaynağının yokluğunda hücreler büyüyememektedir ve koloniler oluşturamamaktadır. Sadece histidin bağımsızlığına (his+) geri dönen bakteriler koloniler oluşturabilmektedir. Her petride kendiliğinden indüklenen ve geri dönen kolonilerin sayısı nispeten sabittir. Bununla birlikte petriye bir mutajen eklendiğinde her petride geri dönen kolonilerin sayısı genellikle doza bağlı bir şekilde artmaktadır (Tejs 2008).

Comet testi, ökaryotik hücrelerde DNA iplik kopmalarını ölçmek amacıyla kullanılan basit bir testtir. Bu yöntemde mikroskop lamı üzerinde agaroz içine gömülü hücreler, nükleer matrikse bağlı süper sarmal DNA döngüleri içeren nükleoidler oluşturmak için deterjan ve yüksek tuzla parçalanmaktadır. Elektroforez floresan mikroskopuyla incelendiğinde kuyruklu yıldızlara benzeyen yapılar ortaya çıkmaktadır. Gözlemlenen bu kuyruklu yıldızların başa göre yoğunluğu, DNA kırılmalarının sayısını yansıtmaktadır. Bunun muhtemel temeli bir kopukluk içeren ilmeklerin süper sargılarını kaybetmeleri ve anoda doğru uzanmakta serbest hale gelmeleridir. Comet testinin yeni kimyasalların genotoksitesininin test edilmesinde,

genotoksinlerle çevresel kontaminasyonun izlenmesinde, insan biyoizlemesinde ve moleküler epidemiyolojide uygulamaları vardır (Collins 2004).

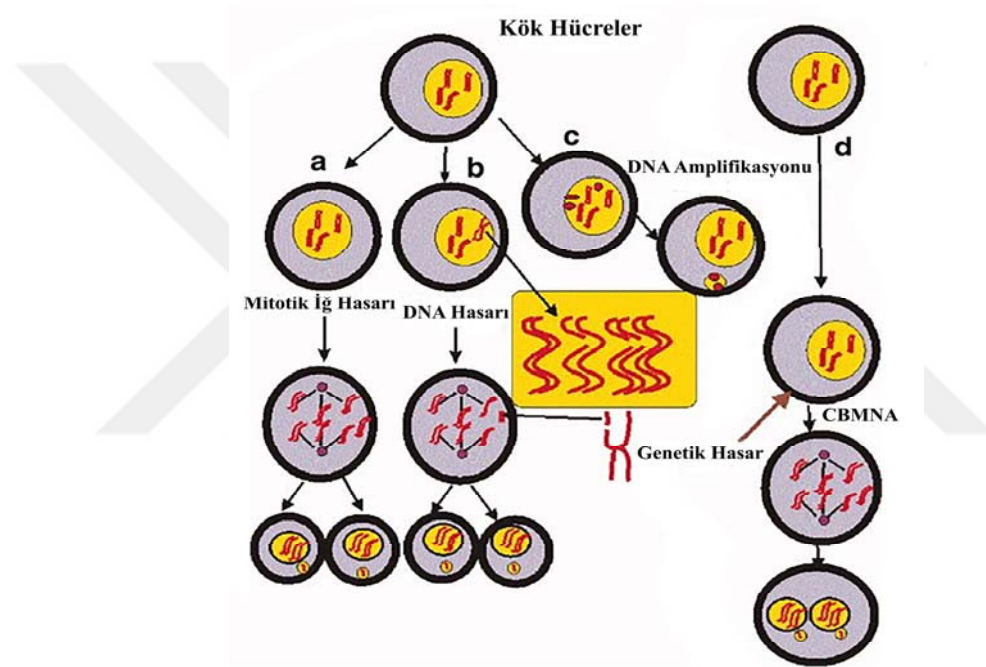
SCE testi, somatik ve germ hattı (bakteri, virüs) hücrelerinin çoğalmasında sıklıkla meydana gelen ve hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak memelilerde, diğer hayvanlarda ve bitki hücrelerinde, farklı hücre hatlarında gözlenen doğal bir olaydır (Lialiaris 2013). SCE, homolog lokuslarda bir kromozomun kardeş kromatitleri arasındaki DNA segmentlerinin karşılıklı değişimini temsil etmektedir (Latt ve ark. 1981, Wilson III ve Thompson 2007, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011b, Lialiaris 2013). Bu olay, hücre döngüsünün sentez fazı sırasında gerçekleşmektedir. SCE'ler, DNA hasarının nicel ve nitel olarak değerlendirilmesi için mükemmel bir araçtır ve son 30 yılda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metotla, SCE'lerin genotoksisite indeksini oluşturarak bir ajanın genotoksik potansiyeli ve proliferasyon hızı indeksini ölçerek bu ajanın sitostatik etkisi, etkenin Mitotik İndeks (MI) sayılarak değerlendirilebilmektedir (Lialiaris 2013).

CA testi, çeşitli sayısal ve yapısal kromozom anormalliklerinin (mutajenler tarafından indüklenen) tespit edilmesi amacıyla kullanılan bir metottur. *In vivo* CA testiyle kemik iliği hücrelerinde, *in vitro* CA testiyle memeli hücre kültürlerinde kromozom anormalliği frekansı ölçülebilmektedir. Ayrıca *in vivo* CA testi, mutajen maddelerin oluşturduğu mutajenik hasarın tespit edilmesinde doku ve türe göre farklılaşan farmakokinetik, DNA onarım mekanizmaları ve metabolizma gibi faktörlerin değerlendirilebilmelerini de sağlamaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011b).

2.2.1. Mikronükleus (MN) ve Mikronükleus Testi

Mitoz bölünme (anafaz) sırasında kaybedilen (kromatit veya kromozom kırılması, anafazik köprü sapmaları, iç disfonksiyonları veya kromozom bölünmesiyle ilgili mekanizmaların bozulmaları (örneğin kinetokor)), hücrenin ana nükleusuyla aynı renkte ve boyutu ana nükleusun yaklaşık üçte biri ile beşte biri arasında değişen, ikinci bir nükleus oluşturan parçalardan veya tam kromozomlardan oluşan yapıya MN denilmektedir (Schmid 1976, Leonardi ve ark. 2020, Cruz ve ark. 2021). MN'nin oluşumu hakkındaki teorilere göre mitoz bölünmenin gerçekleştiği bir hücrede MN oluşumuna yol açan iki ana mekanizma vardır. Bunlar; kromozomal kırılma ve mitotik yapıların işlev bozukluğudur. Klastojenler, kromozom kırılmalarına neden olmaktadır ve asentrik parçalar vermektedir. Bu kromozomal parçalar doğrudan MN'lere dâhil

edilmektedir (Ford ve ark. 1988, Falck ve ark. 2002, Samanta ve Dey 2012). Diğer mekanizmada ise anöjenik ajanlar, mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin oluşumunu engellemektedir. Bunun sonucunda tüm kromozomlar anafazda geride kalmaktadır. Kromozom MN oluşturan nükleer zarla çevrilmektedir ve bu nedenle yavru hücreler tüm kromozomları içeren MN'lere sahiptir (Cimini ve ark. 2002, Samanta ve Dey 2012). Bu önemli iki mekanizma dışında anafaz köprülerinin kırılmasıyla da MN oluşabilmektedir. Bunun sebebi ise disentrik kromatitler, birbirine karışmış halka kromozomlar veya kardeş kromatitlerin birleşimi olabilmektedir (Saunders ve ark. 2000, Samanta ve Dey 2012). MN oluşumunun farklı yolları Şekil 2.3'de görülmektedir.



Şekil 2.3. MN oluşumunun farklı yolları gösterilmiştir. **a)** Mitotik iğ hasarı durumunda kromozomun tamamı yavru hücrelerden birine bırakılmaktadır ve MN oluşmaktadır. **b)** DNA çeşitli nedenlerle parçalanmaktadır ve kromozom parçaları MN oluşturmaktadır. **c)** Ekstra kromozomal DNA genellikle çoğaltılmaktadır ve MN oluşturmak için nükleer zarla çevrenmektedir. **d)** Sitokinezis-Blok MN (Cytokinesis-Block Micronucleus Assay: CBMNA) temeli vurgulanmaktadır. Kromozomal DNA, genotoksik ajan nedeniyle hasar görmektedir. Hücreler kültürlenmektedir ve hücrenin sitoplazmik bölünmesi engellenmektedir. Parçalanmış kromozom da, MN oluşturmaktadır (Samanta ve Dey (2012)'den değiştirilerek).

MN'nin çoğunlukla fibroblast kültürlerinde, lenfosit kültürlerinde, nükleuslu eritrosit hücrelerinde ve epitel hücresi döküntülerinde olduğu gözlemlenmiştir. Sitokinezis-Blok MN'de (Cytokinesis-Block Micronucleus Assay: CBMNA), etkisi belirlenecek olan madde hücre kültürüne eklenmektedir ve mitojen ilavesiyle hücreler mitoz bölünmeye sevk edilmektedir. Mitoz bölünmede karyokinez aşaması tamamlandıktan sonra kritik bir evrede sitokinezi durduran Sitokalazin B maddesi

eklenmektedir. Bu maddenin eklenmesiyle çift nükleuslu hücreler oluşmaktadır ve bu hücrelerde oluşan MN'ler daha basit bir şekilde tespit edilebilmektedir. CBMNA'yla sitostatik, nondisjunction, nekroz, apoptosiz, kromozom kayıpları ve kromozom kırıklıkları belirlenebilmektedir (Müller ve Streffer 1994, Fenech 2000, Bonassi ve ark. 2001, Fenech ve ark. 2003).

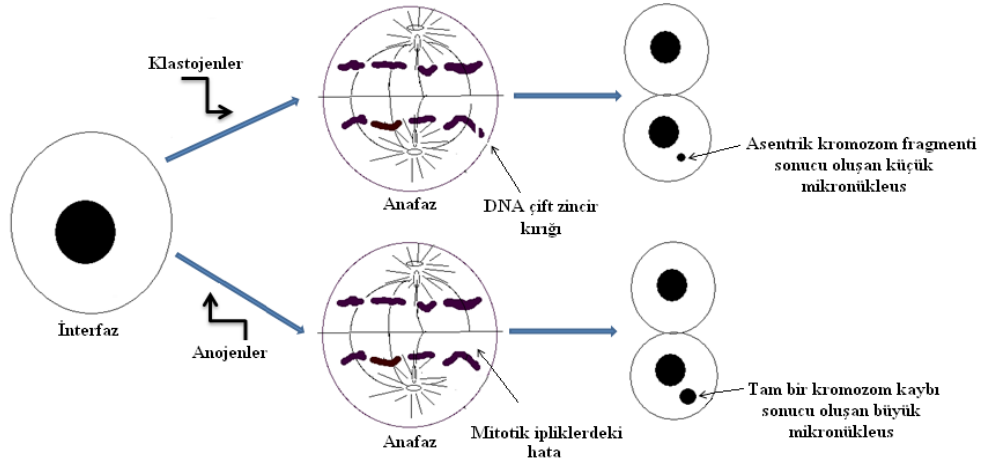
MN testinin en önemli özelliklerinden biri farklı hücre tiplerinde uygulanabilmesidir. Bunun yanı sıra sayımları kolaylıkla yapılmaktadır ve elde edilen verilerin fazla olması sebebiyle de istatistiksel olarak güvenilirdir (Enzel ve ark. 1999). MN testiyle genotoksik ajanların mutajenik özellikleri belirlenirken, genotoksik madde grubunun kontrol grubuna kıyasla MN frekansı daha yüksekse madde mutajenik, yaklaşık olarak aynı oradaysa mutajenik değil, daha azsa madde antimutajenik olarak yorumlanmaktadır (Heddle ve ark. 1991).

MN oluşumunda DNA'da bazen tek zincir kırıklıkları bazen de çift zincir kırıklıkları meydana gelebilmektedir. Tek zincir kırıklıkları hücrenin replikasyonu sırasında çift zincir kırıklıklarına dönüşebilmektedir. MN'ler hücrelerde genel olarak bir adet gözükmemektedir ancak genotoksik maddenin etkisiyle birlikte iki veya daha fazla miktarda da görülebilmektedir (Fenech ve Morley 1985).

MN, amplifiye DNA tomurcuklanması nedeniyle de oluşabilmektedir. Bu yüzden her zaman kromozomal kısımların kaybını temsil etmemektedir. İnsan tümörlerinde onkogen amplifikasyonu sırasında asentrik otonom olarak kopyalanan ekstrakromozomal yapılar oluşmaktadır. Bu yapılar Double Minute (DM) kromozomu olarak bilinmektedir. Bu DM kromozomunun, sentez fazı sırasında nükleer zarın tomurcuklanmasıyla başlayan bir mikronükleasyon mekanizmasıyla çekirdekten ayrıldığı gözlemlenmiştir (Shimizu ve ark. 1998, Fischer ve ark. 2010, Samanta ve Dey 2012). DNA çift sarmallarının kırılması, bir hücre döngüsünün dinlenme fazından hazırlık fazına geçmesi durumunda meydana gelen fizyolojik bir durumdur ve normal sağlıklı hücrelerde de görülebilmektedir. Yani normal sağlıklı bir bireyde de MN saptanabilmektedir ancak sayısı daha azdır (Bartkova ve ark. 2005, Pickering ve Kowalik 2006, Samanta ve Dey 2012).

Kimyasal veya fiziksel olarak çeşitli ajanların, hücrelerde oluşturdukları yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri MN sayısındaki artışın indirekt göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Klastojenler kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkı sağlarken anöploidi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak katkıda bulunmaktadırlar (Şekil 2.4). Bu sebeple

somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın nedeninin hücrelerdeki MN sayısında gerçekleşen artıştan dolayı olduğu söylenmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011a).



Şekil 2.4. Anojenler ve klastojenler tarafından uyarılan hücrelerde MN oluşumu (Balta 2017).

MN testi, çeşitli kimyasalların ve fiziksel etmenlerin neden olduğu mutajenik etkileri değerlendirmek için en çok kullanılan yöntemlerden biridir (Udroiu 2006, Canedo ve ark. 2021). Ayrıca kanser öncesi lezyonları belirlemede ve takip etmede en sık kullanılan testlerden biridir. Bunların dışında MN testi, insanlarda genomik hasarı ve kromozom dengesizliğini değerlendirmede de kullanılan bir yöntemdir. Bu nedenle mikronükleus testi çeşitli çalışmalarda genotoksinlere karşı mesleki ve çevresel maruziyeti değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bunlara; tıbbi prosedürler, mikro besin eksiklikleri, yaşam tarzı faktörleri, pestisit maruziyeti, genetik duyarlılık ve ksenobiyotik metabolize eden polimorfizmler ve DNA hasarında DNA onarım genleri örnek verilebilmektedir (Leonardi ve ark. 2020).

MN, 19. yüzyılın sonunda Howell ve Jolly'in kedilerden ve sıçanlardan alınan kanlarda küçük kalıntılar bulduklarında tanımlanmıştır. Howell-Jolly cisimciği adı verilen küçük inklüzyonları, şiddetli anemi hastalarından alınan periferik kanın eritrositlerinde de gözlemlenmiştir. Bunlar MN'yle ilgili ilk açıklamalardır (Hayashi 2016).

Evans ve ark. (1959), gama ışınlarının barbunya bitkisinin kök uçlarında MN oluşturduğunu bildirmişlerdir ve kromozomal sapmayı nicel olarak değerlendirmişlerdir. Yapılan bu çalışma, normal hücreler arasında MN barındıran hücrelerin sıklığına göre kromozomal sapmayı değerlendiren ilk rapordur. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda kromozomal fragmanların yaklaşık %60'ının MN oluşumuna katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir.

Boller ve Schmid (1970), güçlü bir alkilleyici ajan olan trenimonla tedavi edilen Çin hamsterının kemik iliği ve periferik kan hücrelerini kullanarak, hematopoez sırasında kendi çekirdekleri olmayan normal eritrositler arasında mikroçekirdekli eritrositlerin sıklığını değerlendirmek amacıyla bir yöntem geliştirmişlerdir. Makalede bu yöntemi 'Mikrokern-Test' olarak adlandırmışlardır.

Countryman ve Heddle (1976), insan lenfositlerinin kullanıldığı bir yöntem bildirmişlerdir. Farklılıklar Fenech ve Morley (1985) tarafından Sitokalazin B kullanılarak belirtilmiştir ve bu yöntem günümüzde de insanlar üzerindeki etkileri gözlemleyebilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

İnsan lenfositlerinde MN'nin oluşma hızı ve sıklığının yaşla birlikte arttığı, çeşitli çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Hando ve ark. 1994, Bakou ve ark. 2002, Samanta ve Dey 2012). Bu çalışmalara göre insan lenfositlerinin mikronükleasyonu rastgele değildir ve X ile Y kromozomlarının yaşa bağlı olarak mikronükleasyon sıklığında bir artış söz konusudur (Hando ve ark. 1994, Nath ve ark. 1995, Bakou ve ark. 2002, Samanta ve Dey 2012). Kadınlarda X kromozomunun mikronükleasyonun daha yüksek olmasının inaktif olan X kromozomundan olabileceği söylenmiştir (Catalán ve ark. 2000, Samanta ve Dey 2012).

Cole ve ark. (1979) ve King ve Wild (1979), hamile fareleri klastojenik bir kimyasala intraperitoneal olarak muamele etmişler ve gebeliğin çok geç evresinde oluşan fetal fare karaciğerinde ve periferik kan hücrelerinde görülen MN oluşumunu gözlemlemişlerdir. Bazı kimyasallar karaciğerde metabolize olmaktadır ve aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen kimyasallar kararsız olduğunda ve kemik iliğine ulaşmadan önce azaldığında, bu kimyasalların klastojenitesi olağan bir yöntemle saptanamayacaktır. Bu durumda araştırmacılar, fetal MN yöntemi kullanılarak stabil olmayan aktif metabolitlerin (örneğin, dialkil-nitrozamin) tespit edilebileceğini göstermişlerdir.

MacGregor ve ark. (1980), farelerin periferik kanındaki eritrositlerde MN'yi tespit etmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. MN'nin sıçanların ve insanların periferik kanında çok fazla görülmediğini, bunun nedeninin ise MN'yi içeren eritrositlerin dalak tarafından hızlı ve etkili bir şekilde yakalanıp yok edildiğini söylemişlerdir. Ancak farelerde, MN'li eritrositlerin periferik kandaki normal hücrelerle aynı şekilde bulunduğunu belirtmişlerdir. Kemik iliğinin kullanıldığı deneyde kimyasalların akut etkisi değerlendirilir ancak farelerin periferik kan eritrositlerinin kullanıldığı yöntemde, yaşam sürelerine kadar MN'leri barındıran olgun eritrositleri analiz ederek test

kimyasalının kronik bir etkisinin olup olmadığının değerlendirilebileceğini söylemişlerdir.

Lähdetie ve Parvinen (1981) ve Tates ve ark. (1983) erkek germ hücrelerinin kullanıldığı bir yöntem bildirmişlerdir. Çalışma raporlarında, kimyasalların kalıtsal olarak olumsuz etkilerini belirlemek için MN testinin kullanılabilirliğini önermişlerdir.

1983 yılında Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (United States Environmental Protection Agency, US-EPA) Gen Tox Programının MN komitesi, MN testi kullanılarak o zamana kadar test edilen bütün kimyasalların veri tabanını içeren genel bir özet rapor etmiştir (Heddle ve ark. 1983). Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (IPCS) ise bu yıldaki kısa vadeli çalışmalarını değerlendirmek için uluslararası bir iş birliği programı başlatmıştır. Kanserojen maddeleri ve kanserojen olmayan maddeleri birkaç *in vivo* yöntemle değerlendirmişlerdir ve bu değerlendirme sonucunda MN testinin, kanserojen maddelerin etkilerini belirlemek için en iyi yöntem olduğunu söylemişlerdir (Ashby 1985).

2.2.2. Propolisle İlgili Yapılan Genotoksisite/Antigenotoksisite Çalışmalar

Demir (2010b), fibroblast hücrelerini kullanarak Trabzon propolisinin etanollü ekstraktının (50 µg/ml'lik konsantrasyonda), H₂O₂'le indüklenmiş DNA hasarı üzerine etkisini Comet testiyle incelemiştir. Hücrelerin etanollü propolis ekstraktıyla muamelesi sonucunda; genotoksik ajandan önce, genotoksik ajanla aynı anda ve genotoksik ajandan sonra DNA hasarındaki azalma oranı sırasıyla %96, %98.92 ve %99.84 olarak saptamıştır. Sonuç olarak propolisin etanollü ekstraktının fibroblast hücrelerinde, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engellediği ve antigenotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Bayram ve ark. (2016), Hakkâri bölgesinden toplanan propolisin AFB₁'e (Aflatoxin B₁) karşı antigenotoksik ve antisitotoksik etkilerini insan lenfosit hücrelerinde *in vitro* olarak incelemiştir. Araştırmacılar yaptıkları mutajenite testleri sonucunda AFB₁'in SCE frekansını arttırdığını ve DNA hasarına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Propolis AFB₁'e karşı insan lenfositlerinde (*in vitro*) yüksek oranda antimutajenik etki göstermiş ve SCE frekansını azaltmıştır. Ayrıca propolisin antisitotoksik etkisi LDH (Laktat dehidrogenaz) enzim salınım testiyle belirlenmiştir. Yapılan tüm bu testler sonucunda propolisin AFB₁'e karşı antigenotoksik ve antisitotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Yıldız ve Ünal (2022) bu iki çalışma dışında propolisin genotoksik ve antigenotoksik etkilerini içeren bütün çalışmaları özetlemiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Propolisin genotoksik ve antigenotoksik etkileri (Yıldız ve Ünal (2022)'dan değiştirilerek).

Test sistemi	Uygulama		Sonuçlar		Kaynaklar
	Madde	Mutajen	Genotoksisite	Antigenotoksisite	
Ames: <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98 ve TA102 (S9 +/-)	Propolisin Etanollü Ekstraktı (EEP): 0.25; 0.5; 1; 2 ve 4 µg/petri	TA100; AZS: 1.25 µg/petri B[a]P: 1 µg/petri 2-AA: 0.125 µg/petri TA98 NPD: 5 µg/petri AFB1: 0,5 µg/petri B[a]P: 1 µg/petri 2-AA: 0.125 µg/petri TA102 DAU: 1.5 µg/petri AAF: 10 µg/petri B[a]P:1 µg/petri	(-)	TA100 B[a]P: (+) 2-AA: 2 ve 4 µg/petri (+) TA98 AFB1: (+) B[a]P: (+) 2-AA: 4 µg/petri (+) TA102 DAU: (+)	(Varanda ve ark. 1999)
Ames: <i>S. typhimurium</i> suşları	Propolisin Etanollü Ekstraktı (EEBG): 50; 100; 200 ve 400 µg/petri (<i>S. typhimurium</i> TA98)	X	(-)	X	(Jeng ve ark. 2000)
	EEBG: 10; 20; 40 ve 80 µg/petri (<i>S. typhimurium</i> suşları)	4-NO: 1 µg/petri. 1-NP: 200 µg/petri	(-)	(+)	
	EEBG: 4; 8; 10; 16; 20; 40 ve 80 µg/petri (<i>S. typhimurium</i> suşları; S9 +)	IQ: 1 µg/petri B[a]P:3 µg/petri	X	(+)	
	EEBG: 100; 200; 300 ve 400 µg (<i>S. typhimurium</i> suşları)	EROD ve ECD: 20; 40; 60; 80 ve 100 µg	X	(+)	
Ames: <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 (S9 +/-)	Propolis: 200; 1000; 2000 ve 3000 µg/petri	NaN□: 1.25 µg/petri (TA100 - S9) 2AF: 20 µg/petri (TA100 +S9, TA98 +S9) DMC: 10 µg/petri (TA98 - S9)	(-)	DMC ve 2AF: 1000; 2000 ve 3000 µg/petri (TA98) (+)	(Fu ve ark. 2004)
MN: Fare kemik iliği	Propolis: 22.5; 45.0 ve 135.0 mg/kg	CP: 60.0 mg/kg	X	45.0 ve 135.0 mg/kg (+)	
CA: Fare testis hücresi	Propolis: 22.5; 45.0 ve 135.0 mg/kg	MMC: 2.0 mg/kg	X	135.0 mg/kg (+)	

Tablo 2.2 (devamı). Propolisin genotoksik ve antigenotoksik etkileri (Yıldız ve Ünal (2022)'dan değiştirilerek).

MN ve Mİ (Mitotik İndeks): İnsan lenfositleri	Propolis: 0.01; 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 0.7 ve 1.0 ml	X	Doz ↑ MN ↑ Doz ↑ Mİ ↓	X	(Özkul ve ark. 2005)
Comet: Wistar ratları anormal kript odakları (ACF)	Propolisin Sulu Ekstraktı (AEP): %0.01; %0.03; %0.1 ve %0.3 (12; 34; 108 ve 336 mg/kg)	DMH: 40 mg/kg vücut ağırlığı	%0.3 (+)	%0.01; %0.03 ve %0.3 (+)	(De Lima ve ark. 2005)
SCE: İnsan lenfositleri	Propolis: 5; 25; 50 ve 250 mg/ml	X	Doz ↑ SCE ↑	X	(Özkul ve ark. 2006)
CA ve Mİ: Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri	Yeşil propolis ekstraktı: 12.5; 25; 50 ve 100 µg/mL	DXR: 0.5 µg/mL	100 µg/mL (+)	12.5 µg/mL (+)	(Tavares ve ark. 2006)
Comet: İnsan spermatozoa	Chilean propolis: 6; 12 ve 25 µg/mL	B[a]P: 500 µM H ₂ O ₂ : 500 µM FeSO ₄ (2.7 mM) + ADP (1.8 mM) + H ₂ O ₂ (0.1 mM) kombinasyonu	X	(+)	(Russo ve ark. 2006)
Comet: Fare periferik kanı	Brezilya yeşil propolisi: 1000, 1500 ve 2000 mg/kg (4 ve 24 saat)	X	4 saat: (+) 24 saat: 1500 ve 2000 mg/kg (+)	X	(Pereira ve ark. 2008)
MN: Fare periferik kanı	Brezilya yeşil propolisi: 1000, 1500 ve 2000 mg/kg (48 ve 72 saat)	X	48 saat: 1500 ve 2000 mg/kg (+) 72 Saat: (+)	X	(Pereira ve ark. 2008)
Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART): <i>Drosophila melanogaster</i>	WEP: 12.5; 25 ve 50 mg/mL	DXR: 0.125 mg/mL	(-)	(+)	(Valadares ve ark. 2008)
Comet, CA ve MN: İnsan beyaz kan hücreleri	EPP: 100 µg/ml (Comet: ön ve eş muamele) Kuersetin: 50 µM (Comet: ön ve eş muamele)	4Gγ	(-)	(+)	(Benković ve ark. 2008)
Comet: Fare lökosit	EPP: 100 mg/kg (ön, eş ve geç muamele) Kuersetin: 100 mg/kg (ön, eş ve geç muamele)	□□Co: 9 Gγ	(-)	(+)	(Benkovic ve ark. 2008)
CA, MN ve comet: İnsan beyaz kan hücreleri	Suda Çözündürülmüş Propolis (WSDP): 100 mg/kg (ön muamele) Kafeik asit: 50 µM (ön muamele) Krizin: 50 µM (ön muamele) Naringenin: 50 µM (ön muamele)	□□Co: 4 Gγ	(-)	(+)	(Benkovic ve ark. 2009b)

Tablo 2.2 (devamı). Propolisin genotoksik ve antigenotoksik etkileri (Yıldız ve Ünal (2022)'dan değiştirilerek).

Comet: Fare lökositleri	EEP: 100 mg/kg (ön ve geç muamele) Kuersetin: 100 mg/kg-1 (ön ve geç muamele)	□□Co; 4 Gy	(-)	(+)	(Benkovic ve ark. 2009a)
MN: Rat karaciğeri	Propolis: 50 mg/kg	AlCl ₃ : 34 mg/kg	(-)	(+)	(Türkez ve ark. 2010)
Comet: Primer fibroblast hücreleri	Propolis: 30; 40; 50; 60; 80; 100; 150 ve 400 µg/mL (ön, eş ve geç muamele)	H ₂ O ₂ : 40 µM	400 µg/mL (+)	30; 40; 50; 60; 80; 100 ve 150 µg/mL (ön, eş ve geç muamele) (+)	(Demir 2010a)
SMART: <i>Drosophila melanogaster</i>	EEP: 5; 10; 20 ve 40 mg/mL (ön ve eş muamele)	NaNO ₂ : 50 mM NaNO ₃ : 50 mM	(-)	(+)	(Özcan 2011)
Tripan blue canlılık testi	Türk propolis ekstraktı: 25; 50; 75 ve 100 µg/mL	H ₂ O ₂ : 40 µM	X	(+)	(Aliyazıcıoğlu ve ark. 2011)
Comet: Sünnet derisi fibroblast hücreleri	Türk propolis ekstraktı: 50 µg/mL (ön, eş ve geç muamele)	H ₂ O ₂ : 40 µM	X	(+)	
CA ve Mİ: Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri	Brezilya yeşil propolisi ekstraktı: %1.2; %2.4 ve %3.6 (3 ve 20 saat)	X	Mİ: %3.6 (20 saat) (+)	X	(Senedese ve ark. 2011)
MN: Wistar rat periferel kan hücreleri	Brezilya yeşil propolisi ekstraktı: %1.2; %2.4 ve %3.6 (Akut, subakut, ve subkronik)	X	(-)	X	
MN, MTT(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ve LDH (Laktat dehidrojenaz): Primer rat hepatositleri	Propolis; 25; 50 ve 100 µM	TCDD; 5 ve 10 µM	(-)	(+)	(Türkez ve ark. 2012)
CA, SCE ve Mİ: İnsan lenfositleri	EEP: 20; 40; 120; 250; 500; 750; 1000 ve 2000 µg/mL	X	CA: 750; 1000; 2000 µg ml (+) SCE: 500; 1000; 2000 µg ml (+) Mİ: 1000; 2000 µg ml (+)	X	(Montoro ve ark. 2012)
CA: İnsan lenfositleri	EEP: 20, 40, 120, 250, 500, 750, 1000 ve 2000 µg/mL	2 Gy	(-)	120, 250, 500, 750, 1000 ve 2000 µg/mL ⁻¹ (+)	(Montoro ve ark. 2012)

Tablo 2.2 (devamı). Propolisin genotoksik ve antigenotoksik etkileri (Yıldız ve Ünal (2022)'dan değiştirilerek).

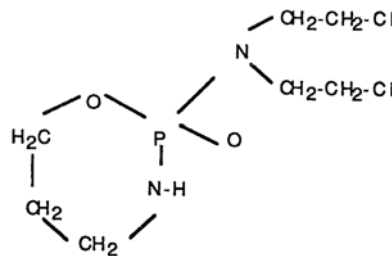
MN: Rat karaciğeri	Propolis: 50 mg/kg	TCDD: 0.75 ve 8 mg/kg	(-)	(+)	(Türkez ve ark. 2013)
CA ve MN: Rat kemik iliği ve lökosit	Yeşil propolis: 150 mg/kg (ön ve eş muamele); 300 mg/kg (geç muamele)	BBN	(-)	(+)	(Dornelas ve ark. 2014)
MN: Çin hamsteri yumurtalık hücreleri (CHOK1)	AF-08: 5; 10; 15 ve 30 (1 Gy) µg/mL 50 ve 100 (1.2 ve 4 Gy) µg/mL	□□Co; 1; 2 ve 4 Gy	(-)	1 Gy; 30 µg/mL (+)	(Santos ve ark. 2014)
CA ve Mİ: Fare kemik iliği	WSDP: 8.4 mg/kg Mısır Arı Poleninin Sulu Ekstraktı (WEBP): 140 mg/kg	CDDP: 2.8 mg/k	(-)	(+)	(Tohamy ve ark. 2014)
SCE: İnsan lenfosit	Propolis: 10 µM Propolis: 5; 10 ve 20 µM + AFB1	AFB1: 5 µM	(-)	(+)	(Bayram ve ark. 2015)
Ames: <i>S. typhimurium</i> TA1535, 1537 ve <i>E. coli</i> WP2 (uvrA) test sistemi	EEP: 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 ve 1.0 mg/petri	NaN□: 5 µg/petri 9-AA: 50 µg/petri MNNG: 1 µg/petri	1.0 mg/ petri (+)	(+)	(Bayram ve ark. 2015)
MN: İnsan lenfositleri	Jabuka kökenli EEP1 ve Velika Župa kökenli EEP2: 1; 10; 50; 100; 250 ve 500 µg/ml	MMC: 0.5 µg/ml	EEP1: (-) EEP2: 250 ve 500 µg/ml (+)	EEP1: 100, 250, 500 µg/ml (+) EEP2: 10, 50, 250 ve 500 µg/ml (+)	(Milošević-Đorđević ve ark. 2015)
Hücre Canlılık Testi (MTT): İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisi (MDA-MB231)	Jabuka kökenli EEP1 ve Velika Župa kökenli EEP2: 1; 10; 50; 100; 250 ve 500 µg/mL	MMC: 0.5 µg/ml	(-)	(+)	
Comet: <i>S. cerevisiae</i> sferoplastları	Propolis: 25; 100 ve 300 µg/mL (S Tamponu ön ve eş muamele)	H□O□: 10 mM	Önmuamele: 300 µg/mL (+) Eş muamele: (+)	(+)	(Cruz ve ark. 2016)
CA, MN ve Mİ (<i>Allium</i> testi): <i>Allium cepa</i>	EEGP: 0.06 µL/mL <i>Baccharis dracunculifolia</i> etanolik ekstraktı: 0.30 µL/mL	MMS	(-)	(+)	(Roberto ve ark. 2016a)
Comet ve MN: Rat hepatoma hücre hattı (HTC)	EEGP ve <i>Baccharis dracunculifolia</i> etanolik ekstraktı: Ön inkübasyon ve eş zamanlı	MMS	(-)	(+)	(Roberto ve ark. 2016b)
SMART: <i>Drosophila melanogaster</i>	Yeşil ve kahverengi propolis: 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 ve 7.5 mg/mL	X	(-)	X	(Rodrigues ve ark. 2016)

Tablo 2.2 (devamı). Propolisin genotoksik ve antigenotoksik etkileri (Yıldız ve Ünal (2022)'dan değiştirilerek).

Comet: Sünnet derisi fibroblast hücreleri	Türk propolisi: 100; 200 ve 300 µg/mL (15 ve 30 dakika ön muamele)	□□Co: 3 Gy	X	(+)	(Yalçın ve ark. 2016)
CA: Albino rat kemik iliği	Propolis: 200 ml/kg	AS: 5 ve 20 mg/kg	(-)	(+)	(Abd ve ark. 2019)

2.2.3. Siklofosamid (CP)

CP, etkilerini DNA alkilasyonu yoluyla gösteren bir tür nitrojen mustard (bir tür alkilleyici ajan) ilacıdır (Şekil 2.5.). Bu ilaç sadece hücre döngüsü fazına özgü değildir. CP, DNA ve RNA'ya çapraz bağlanması yoluyla protein sentezini inhibe edebilen aktif bir forma metabolize olmaktadır (Korkmaz ve ark. 2007, Mills ve ark. 2019).



Şekil 2.5. CP'nin kimyasal yapısı (C₇H₁₅C₁₂N₂O₂P) (Monach ve ark. 2010).

CP genellikle; multiple myeloma, Burkitt lenfoma, küçük lenfositik lenfoma, lenfositik lenfoma, Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma, akut ve kronik lösemi, meme kanseri, kemik iliği nakilleri ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesine (U.S. Food and Drug Administration: FDA) göre CP, malign lenfomanın III. ve IV. evresinde (Ann Arbor evreleme sistemi tarafından belirlenen) kullanılmak için uygundur (Korkmaz ve ark. 2007, Mills ve ark. 2019). CP'nin FDA onaylı endikasyonları arasında Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma, lenfositik lenfoma, küçük lenfositik lenfoma, Burkitt lenfoma, multipl miyelom, meme kanseri, yayılmış nöroblastomlar, retinoblastom, pediatrik hastalarda minimal değişiklik nefrotik sendromu ve yumurtalık adenokarsinomlarının tedavisinde kullanımı yer almaktadır (Colvin 1999, Korkmaz ve ark. 2007, Emadi ve ark. 2009, Mills ve ark. 2019).

Kanser kemoterapiyle tedavi edilirken neoplastik hastalık sürecini durdurmak, yavaşlatmak veya geriletme için antineoplastik ilaçlar kullanılmaktadır. Antineoplastik ilaçların bazıları kansere sebep olabilmektedir (Fairchild ve ark. 1979, Kinlen ve ark.

1981, Ehrenfried ve ark. 1997, Furuta ve ark. 2000, Watanabe ve ark. 2001). Bu ilaçların alkilleyici tipte olanları en fazla kanserojenik olanlarıdır. CP ise alkilleyici bir antineoplastik ilaçtır (Perini ve ark. 2008).

CP'nin antineoplastik etkilerinin çoğu sitokrom P-450 gibi karaciğer enzimleri tarafından, ilacın metabolizmada oluşturduğu fosforamid mustard (FAM)'dan kaynaklanmaktadır. Hepatik enzimler ilk önce CP'yi 4-hidroksisiklofosfamid'e dönüştürmektedir ve daha sonra aldofosfamide metabolize olmaktadır. Aldofosfamid ise aktif bir alkilleyici ajan olan FAM'a ve akroleine bölünmektedir. Fosforamid metaboliti, guanin N-7 pozisyonundaki bitişik DNA iplikleri içinde ve arasında çapraz bağlar oluşturmaktadır. Bu modifikasyonlar kalıcıdır ve tüm bu değişimlerin sonunda apoptoz gerçekleşmektedir (Chang ve Waxman 1993, Colvin 1999). CP, FAM ile akrolein metabolitlerinin özellikleriyle antitümör ve bağışıklık baskılama gibi etkiler göstermektedir. Lenfositler CP'den en fazla etkilenen hücrelerdir. Bunların işlev ve sayı bakımından farklılıkları bağışıklık sisteminin baskılandığına işaret etmektedir (Fritz ve Kaina 2006).

CP'nin antimitotik ve antineoplastik etkilerinin yanında immünosupresif etkileri ve T hücreleri için seçiciliği vardır. CP'nin yüksek dozları maling hematopoietik hücrelerin ortadan kaldırılması için kullanılırken daha düşük dozları, düzenleyici T hücrelerinin seçici immünomodülasyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca CP, interferon-gama ve interlökin-12'nin (IL-12) salgılanmasını azaltırken beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve periferik kanda, interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-10 (IL-10) gibi Th2 sitokinlerin salgılanmasını artırmaktadır (Ahlmann ve Hempel 2016, Chatelanat ve ark. 2018). Bu etkiler nedeniyle CP, tümör aşılama protokollerine, nakil sonrası alloreaktivite (T hücrelerinin baskılanması) yönetimine ve immün aracılı durumların ve bazı vaskülit türlerinin tedavisine değerli bir katkı olarak kabul edilmiştir (Korkmaz ve ark. 2007, Cavallasca ve ark. 2015, Mills ve ark. 2019). CP'nin immünomodülatör etkilerini gösterdiği kesin bir mekanizma tam olarak net olmasa da birkaç çalışma bazı olası etki şekilleri önermiştir. Bunlar iyi ve kötü huylu konak hücrelerde düzenleyici T hücrelerinin ortadan kaldırılmasını, tip-I interferonlar gibi T hücresi büyüme faktörlerinin indüklenmesini ve konakçı hücrelerin donör T hücreleri için ön şartlandırılmasını ve böylece alloreaktivitenin azaltılmasını içermektedir (Cavallasca ve ark. 2015, Ahlmann ve Hempel 2016, Chatelanat ve ark. 2018).

CP, kanser tedavisinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır ancak bu maddenin karsinojenite, teratojenite, mutajenite, myelosupresyon ve ürotoksisite gibi toksik

etkileri de vardır (Pool ve ark. 1988, Ayhancı ve ark. 2008, Büyüknacar ve ark. 2008). CP'nin yan etkileri mesane ve gonadal toksisitesiyle ilişkilidir. CP kullanılan çeşitli ve klinik çalışmalarda bildirilen yaygın yan etkiler arasında hemorajik sistit, amenore, miyelosupresyon, alopesi ve bulantı ile kusma nöbetleri yer almaktadır (Martin ve ark. 1997, Korkmaz ve ark. 2007, Dan ve ark. 2014).

CP'nin alkile edici etkileri ayrıca oogenez ve spermatogenez süreçlerini etkileyerek her iki cinsiyette de kısırlığa yol açabilmektedir. Kısırlık riski zamana ve doza bağlıdır ve bazı hastalarda geri dönüşümsüzdür. Kısırlık kadınlarda amenore, erkeklerde testis atrofisi olarak kendini gösterebilmektedir. CP tedavisine başlamadan önce hastalar infertilite riskleri konusunda yeterli eğitim almalıdır (Dan ve ark. 2014, Cavallasca ve ark. 2015).

Literatürlere bakıldığında *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda birçok genotoksikite çalışmasında genotoksik madde olarak yüksek dozda CP (pozitif kontrol grubu olarak) kullanılmıştır (Bramwell ve ark. 1987, Blom ve ark. 1995, Moore ve ark. 1995, Wolf ve Luepke 1997, Wolf ve ark. 2002, Özparlak 2006, Çavaş ve Könen 2007, Özparlak ve ark. 2011, Çelik ve Özparlak 2019, Maul ve ark. 2022, Reisinger ve ark. 2022).

2.2.4. Askorbik Asit (C vitamini)

Yapılan araştırmalara ve çalışmalara göre içeriği mikro besin açısından zengin besinlerle beslenmenin mutasyonu ve kanseri önleyebildiği ve bu riskleri azalttığı tespit edilmiştir (Ames 1983, Block 1991, Byers ve Perry 1992, Kaya 2003). Vitaminler, mikro besin olarak makromolekülleri korumada çok önemlidir. Askorbik asit (C vitamini) ise en önemli mikro besinlerden biridir ve suda çözünebilmektedir (Frei ve ark. 1989, Halliwell 2001, Adıgüzel ve Çavaş 2017).

Birçok çalışmadan elde edilen verilere göre etkili bir antioksidan olan C vitamininin, *Drosophila* testlerinde (Kaya ve ark. 2002), insan lenfositlerinde (Ahmad ve Afzal 2004, Türkez 2011, Türkez ve Aydın 2012), hem *in vitro* hem de *in vivo* testlerinde ve farklı ökaryotik dokularda (Premkumar ve Bowlus 2003, Ozturk ve ark. 2009, Uzun ve ark. 2009, Rajesh ve ark. 2013) antigenotoksik aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir (Adıgüzel ve Çavaş 2017).

Antioksidan aktivite gösteren maddeler, kimyasalların sebep olduğu mutasyonları farklı yollarla azaltabilmektedirler. Bu yollardan birincisi; elektrofilik mutajenler için antioksidan maddenin DNA üzerindeki nükleofilik kısımlara

bağlanmasıdır. İkincisi antioksidan maddenin oksidasyon proseslerini engelleyerek promotajen biyoaktivasyonunu durdurmasıdır. Üçüncüsü ise antioksidan maddenin promotajenin elektrofilik metabolitleriyle reaksiyona girmesi sonucu mutasyonları azaltmasıdır (Goncharova ve Kuzhir 1989, Adıgüzel ve Çavaş 2017). Kaya ve ark. (2004), yaptıkları çalışmalarda C vitamininin antigenotoksik etkisini birinci mekanizmaya göre gösterdiğini söylemişlerdir.

Longchar ve Prasad (2016), yaptıkları çalışmada tümör taşıyan farelerin cisplatinle tedavi edildiği zaman eritrositlerde farklı şekillerde morfolojik anormalliklerin gelişmesiyle beraber kan hemoglobininin, lökositlerin, eritrositlerin ve paketlenmiş hücre hacminin azaldığını görmüşlerdir. Bu hemotoksiteleri azaltmak için ise farelere, cisplatin ile C vitaminini birlikte vermişlerdir. Bunun sonucunda ise C vitamininin, cisplatinin oluşturduğu hematotoksiteleri azalttığını gözlemlemişlerdir.

Ahmad ve Afzal (2004), insan lenfosit kültürleri üzerinde hidrokortizonun sebep olduğu genotoksik etkiyi azaltmak için C vitamini, flavonoid ve kurkuminin etkisini incelemişlerdir. Bunun için ise SCE ve CA tekniklerini kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda C vitamini ve kurkumin, yüksek oranda genotoksik etkiyi azaltarak antigenotoksik etki göstermiştir.

Surjyo ve Anisur (2004), yaptıkları çalışmada L-Askorbik asit uygulamasının farelerde sitogenetik, biyokimyasal, histolojik ve ultra-yapısal seviyelerde para-Dimethylaminobenzaldehyde (p-DAB) ile indüklenen hepatokarsinogenezle mücadelede herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmadığını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda da C vitamininin farelerde p-DAB'la indüklenen hepatokarsinogenezise karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Literatürde, yapılan bazı çalışmalarda C vitamininin antigenotoksik madde olarak kullanıldığı görülmektedir (Goncharova ve Kuzhir 1989, Guha ve Khuda Bukhsh 2002, Ahmad ve Afzal 2004, Kaya 2004, Surjyo ve Rahman 2004, Ural ve ark. 2005, Landino ve ark. 2006, Guha ve ark. 2007, Könen 2007, Jiraungkoorskul ve ark. 2010, Çelik ve Özparlak 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deney aşamasında kullanılan materyaller aşağıda sıralanmıştır:

- Alizarin Red-S (106278, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Amonyak (5432, Merck)
- Askorbik Asit (Ascorbic acid A92902, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- ATABEY Hibrit Damızlık Tavuk Yumurtası
- di-Sodium Hydrogen Citrate Sesquihydrate (112264, Sigma)
- Entellan (107961, Merck)
- Etanol (100983, Merck)
- Fanus® Marka Su Bazlı Organik Türk Propolis (Patentli) (%10'luk sıvı form)
- Formaldehit (104002, Merck)
- Giemsa (109204, Merck)
- Gliserol (Emir Kimya)
- İmmersiyon yağı (104699, Merck)
- Ksilol (108685, Merck)
- May-Grünwald (101424, Merck)
- Metanol (24229, Sigma)
- Moleküler İodine (104761, Merck)
- Parafin (107337, Merck)
- Potasyum Hidroksit (KOH) (105012, Merck)
- Siklofosfamid (Cyclophosphamide, CP) (C0768, Sigma)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (106469, Merck)

3.2. Yöntem

3.2.1. Dozların Belirlenmesi ve Yumurtaların İnkübe Edilmesi

Bu çalışma S. Ü. Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 07.02.2022 tarih ve 2022/08 sayılı izniyle gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan Fanus® marka su bazlı organik Türk propolis (Patentli) numunesi (%10'luk sıvı form) Fanus Gıda ve Organik Ürünler San. Tic. Ltd. Sti. (Trabzon) firmasından temin edilmiştir. Ön denemelerde su bazlı organik Türk propolis numunesinin içindeki kuru madde miktarı -85°C 'de vakum altında 48 saat liyofilize edilerek tespit edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonucunda su bazlı organik Türk propolis numunesi içinde 10 mg/mL saf propolis katı maddesi bulunmuştur. Literatürde benzer bir çalışma bulunmadığı için başlangıç dozu olarak yumurtaya verilebilecek 1/1 v/v oranında stok numunenin steril bidistile suyla seyreltilmesiyle elde edilen en yüksek doz olan 500 $\mu\text{g}/\text{yumurta}$ ($\mu\text{g}/\text{y}$) kullanılmıştır. Bunun azalan dozları olarak yine steril bidistile suyla seyreltilen 250 $\mu\text{g}/\text{y}$ ve 50 $\mu\text{g}/\text{y}$ diğer çalışma dozlarını oluşturmuştur. Genotoksik madde olarak Wolf ve ark. (2003) referans alınarak 50 $\mu\text{g}/\text{y}$ siklofosamid (CP), antigenotoksik madde olarak Çelik ve Özparlak (2019) referans alınarak 50 $\mu\text{g}/\text{y}$ askorbik asit (C vitamini, AA) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kuluçkanın sekizinci gününde uygulanan test solüsyonları.

Deney aşamasında yumurtaların kuluçka, enjeksiyon ve preparasyon işlemleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Çiftliği ve S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Sitoloji-Histoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ticari bir işletmeden (Anadolu Damızlık Ltd. Şti., Güneysınır, Konya) temin edilen ATABEY hibrit damızlıklara ait ortalama 60.49 ± 2.08 g ağırlığındaki 110 adet kuluçkalık dömlü tavuk yumurtası 11 gruba ayrılmıştır ve Tablo 3.1 ile Tablo 3.2’de görülen deney düzenekleri oluşturulmuştur. Kuluçkaya alınacak yumurtalar ilk olarak ılık suyla temizlenmiştir. Yumurtalar üzerine kurşun kalemle grup isimleri yazılarak kodlanmıştır. Çalışma solüsyonları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de görülen dozlarda steril şartlarda hazırlanarak $+4^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Propolisin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için oluşturulan deney düzeneği.

Gruplar	Yumurta Sayısı	Gruptaki her bir yumurtaya uygulanacak işlemler
Kontrol 1 100 µl su (K1)	10	100 µl hacminde steril bidistile su enjekte edildi.
*Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg siklofosfamid enjekte edildi.
Propolis 500 µg/y (P1)	10	Steril bidistile suda seyreltilmiş 100 µl hacminde 500 µg propolis enjekte edildi.
Propolis 250 µg/y (P2)	10	Steril bidistile suda seyreltilmiş 100 µl hacminde 250 µg propolis enjekte edildi.
Propolis 50 µg/y (P3)	10	Steril bidistile suda seyreltilmiş 100 µl hacminde 50 µg propolis enjekte edildi.

* Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’deki deney düzeneklerinde ortak bir siklofosfamid 50 µg/y (CP) grubu oluşturulmuştur.

Tablo 3.2. Propolisin antigenotoksik etkilerinin belirlenmesi için oluşturulan deney düzeneği.

Gruplar	Yumurta Sayısı	Gruptaki her bir yumurtaya uygulanacak işlemler
Kontrol 2 200 µl su (K2)	10	200 µl hacminde steril bidistile su enjekte edildi.
*Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg siklofosfamid enjekte edildi.
Askorbik Asit 50 µg/y (AA)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg askorbik asit enjekte edildi.
Siklofosfamid 50 µg/y + Askorbik Asit 50 µg/y (CA)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg siklofosfamid ve steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg askorbik asit enjekte edildi.
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 500 µg/y (CP1)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg siklofosfamid ve steril bidistile suda seyreltilmiş 100 µl hacminde 500 µg propolis enjekte edildi.
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 250 µg/y (CP2)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg siklofosfamid ve steril bidistile suda seyreltilmiş 100 µl hacminde 250 µg propolis enjekte edildi.
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 50 µg/y (CP3)	10	Steril bidistile suda çözünmüş 100 µl hacminde 50 µg siklofosfamid ve steril bidistile suda seyreltilmiş 100 µl hacminde 50 µg propolis enjekte edildi.

* Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’deki deney düzeneklerinde ortak bir siklofosfamid 50 µg/y (CP) grubu oluşturulmuştur.

Kodlanan her yumurta hassas terazide tartılarak başlangıç ağırlıkları kaydedilmiştir. Kuluçkalama işleminden önce kuluçka makinesi dezenfekte edilmiştir (%70'lik etanolle). Daha sonra yumurtalar HB500 S model (Cimuka, Ankara, Turkey) kuluçka makinesine (37.7°C sıcaklık, %55'lik nisbi nem ile yumurtalar her saat başı bir kez 180°C çevrilecek şekilde ayarlı) yerleştirilmiştir.



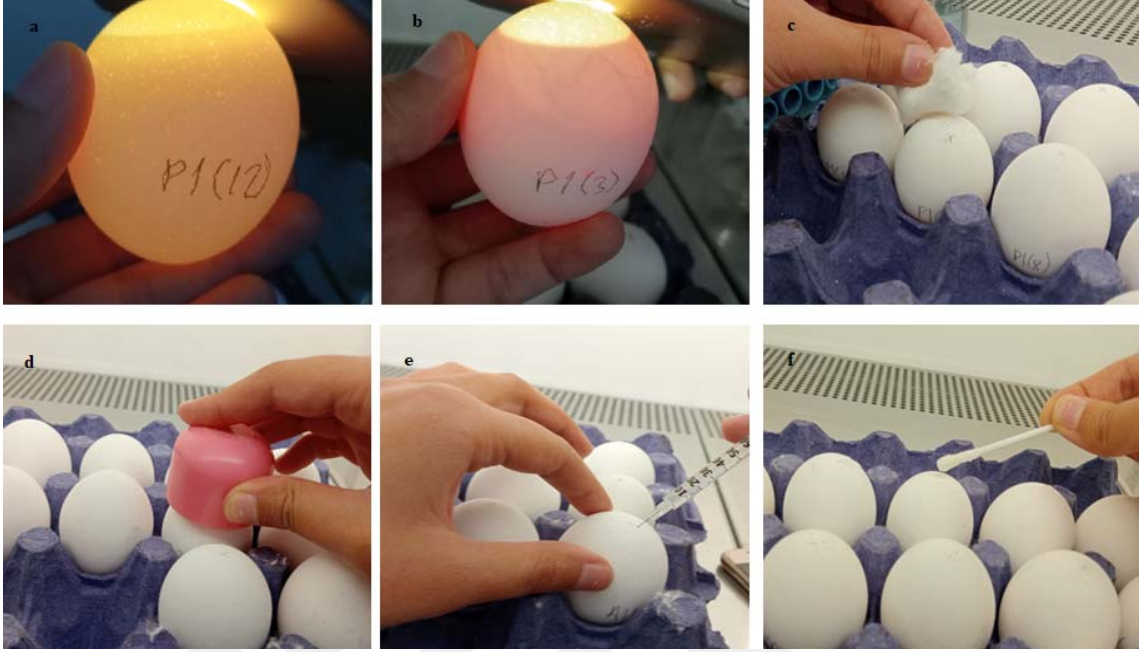
Şekil 3.2. HB500 S model (Cimuka, Ankara, Turkey) kuluçka makinesi (37.7°C sıcaklık, %55'lik nisbi nem ile yumurtalar her saat başı bir kez 180°C çevrilecek şekilde ayarlı)

3.2.2. Test Solüsyonlarının Yumurtalara Enjeksiyonu

Yumurtalar, hava kamaralarının yerleşmesi için enjeksiyon işlemine ~12 saat kala çevirme işlemi durdurularak küt ucu yukarı gelecek şekilde dik pozisyona getirilmiştir.

Kuluçkanın sekizinci gününde bütün uygulamalar (Şekil 3.3) her grup için ayrı ayrı yapılmıştır. İlk önce yumurtalar ışıkla muayene edilerek hava kamaraları kurşun kalemle işaretlenmiştir (Şekil 3.3, a, b). Uygulama yumurtalarda sıcaklık değişimi olmaması için hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yumurtalar Laminar flow kabinde hava kamarasının bulunduğu yerden yarısına kadar %70'lik etanollü pamukla dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.3, c) ve hava kamarasının bulunduğu yerden özel yumurta delicisiyle delinmiştir (Şekil 3.3, d). Açılan deliklerden insülin iğnesi yardımıyla test solüsyonları enjekte edilmiştir (Şekil 3.3, e). Enjeksiyondan sonra açılan delik hızlı bir şekilde sıvı parafin damlatılarak kapatılmıştır (Şekil 3.3, f). Yumurtalar enjekte edilen solüsyonların diffüze olabilmesi için enjeksiyon işleminden sonra ilk bir saat hava kamarası yukarıda kalacak şekilde kuluçka makinesinde dik pozisyonda bekletilmiştir.

Sonrasında da kuluçka makinesinde (daha önce belirtilen şartlarda) inkübasyona devam edilmiştir.



Şekil 3.3. Kuluçkanın sekizinci günü enjeksiyon işlemi. a) Karanlık ortamda bir ışık kaynağı yardımıyla hava kamarası belirlenen dölsüz bir yumurta. b) Karanlık ortamda bir ışık kaynağı yardımıyla hava kamarası belirlenen döllü bir yumurta. c) Hava kamarası bölgesinin %70'lik etanollü pamukla dezenfekte edilmesi. d) Hava kamarasının özel yumurta delicisiyle delinmesi. e) Test solüsyonunun insülin iğnesi yardımıyla hava kamarasına enjekte edilmesi. f) Enjeksiyondan sonra açılan deliğin sıvı parafin damlatılarak kapatılması.

3.2.3. Yumurtaların Açılması ve Embriyoların Değerlendirilmesi

Kuluçkanın 11. gününde ilk olarak yumurtaların ağırlıkları hassas terazide tartılarak kaydedilmiştir. Daha sonrasında yumurtalar tek tek bir cerrahi makas yardımıyla açılmıştır. Yumurtalardan çıkan embriyoların ağırlıkları hassas teraziyle tartılarak kaydedilmiştir. Embriyolar, gelişim gerilikleri ile malformasyonlarının tespit edilmesi için taze ve %10'luk nötr formaline konularak +4°C'de saklanmıştır. Saklanan embriyolarda bacak ve kanatların gelişmemesi, parmaklarda bükülme ve kıvrılmalar, iç organların ters dönük dışarıda oluşu, hemoraji, tüylenmede anormallik, ödem, anormal gaga oluşumu, boyun defektleri, kalça defektleri, tek ve çift göz anormalliği, genel gelişim geriliği ve beynin dışarıda gelişimi gibi çeşitli malformasyonların oluşup oluşmadığı çıplak gözle ve stereo mikroskopla incelenerek belirlenmiştir.

Olası iskelet gelişim geriliklerinin tespit edilebilmesi için her bir gruptan iki-üç adet makroskopik olarak herhangi bir anormallik göstermeyen embriyo Alizarin Red-S boyaması yapılarak incelenmiştir (Tamayo Arango ve ark. 2012). En az bir hafta %10'luk nötr formalinde tespit edilen embriyolar iki gün de %70'lik etilalkolde

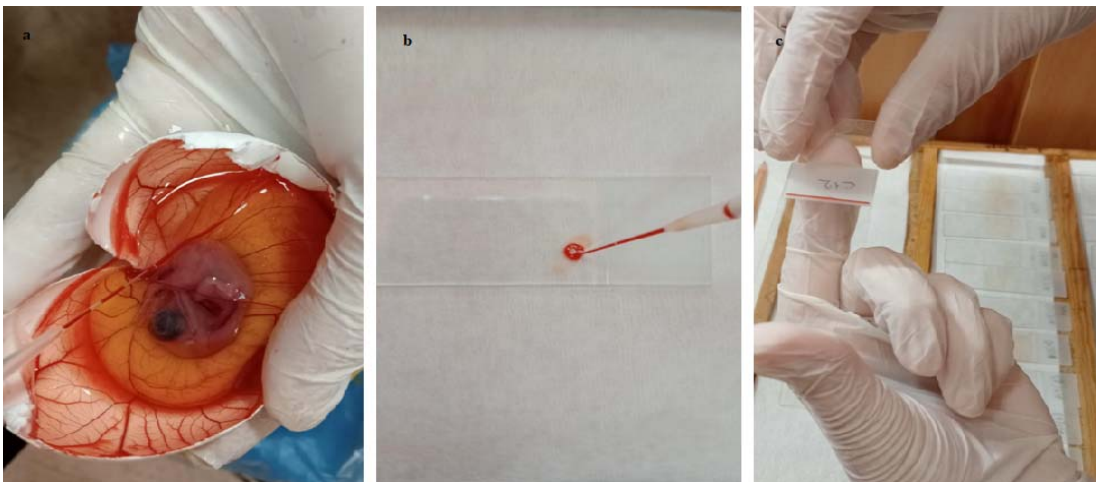
(%70'lik etilalkol içine küçük bir parça moleküler iodine atılıp çözdürülmüştür) tutulmuştur. Daha sonra embriyolar %0.01'lik Alizarin Red-S (%1'lik KOH'de taze hazırlanan) boyasında üç gün bekletilerek boyanmıştır. Boyamadan sonra embriyolar beş gün %2'lik KOH içinde bekletilmiştir. Beş gün sonrasında embriyoların %2'lik KOH + gliserol + amonyak (1:1:1) karışımında 1 hafta boyunca renklerinin açılması beklenmiştir. Daha sonra da embriyolar gliserol içerisine konularak depolanmış ve makroskobik fotoğrafları çekilmiştir.

Kuluçkanın 11. gününde açılan yumurtalardan çıkan canlı ve ölü embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton (1951) skalasına (HH skalası) göre belirlenmiştir. Hassas terazide ağırlıkları tartılan embriyoların rölatif embriyo ağırlıkları (%) aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır;

$$\text{Rölatif embriyo ağırlığı (\%)} = \frac{\text{Embriyo ağırlığı}}{\text{Yumurtanın son ağırlığı}} \times 100$$

3.2.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Frotilerin Hazırlanması

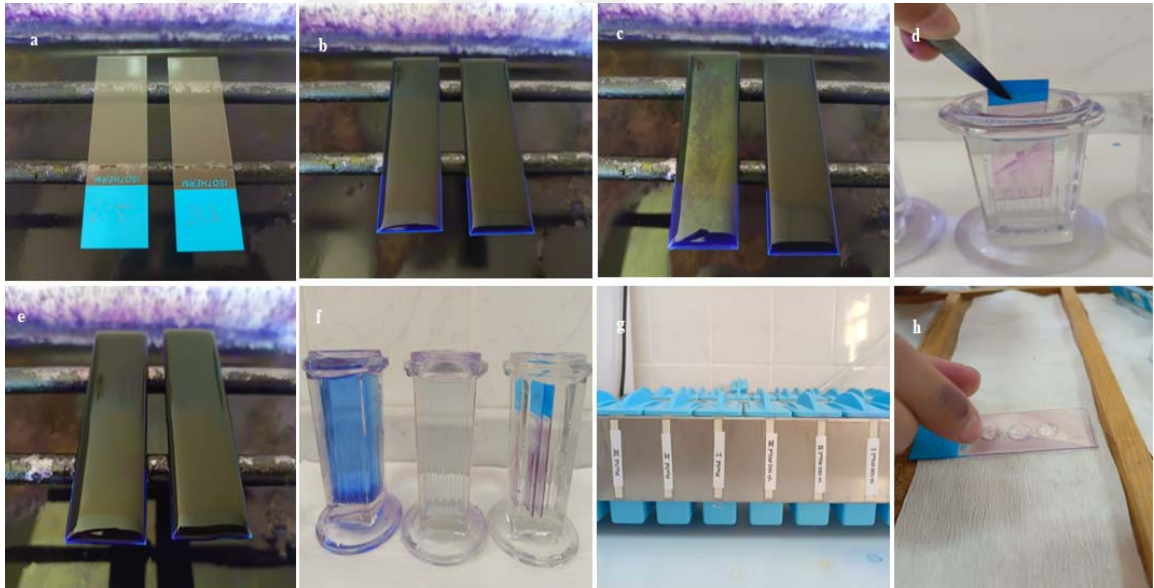
Kuluçkanın 11. gününde HET-MN prosedürüne uygun bir şekilde açılan yumurtalarda canlı embriyo bulunduranların, korioallantoik zarlarının periferik dolaşım sistemindeki büyük kan damarlarından mikropipet yardımıyla kan alınarak frotileri hazırlanmıştır (Şekil 3.4). Hazırlanan frotiler havada kurutulmuştur ve sonra da 5 dakika boyunca metil alkolde tespit edilmiştir. Tespit edilen frotiler daha sonra da modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanmıştır (Wolf ve Luepke 1997, Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003).



Şekil 3.4. Kuluçkanın 11. gününde kan alımı ve froti hazırlanması. a) Açılan bir yumurtada canlı embriyodan korioallantoik zarının periferik dolaşım sistemindeki büyük kan damarından mikropipet yardımıyla kan alınması. b) Alınan kanın lama damlatılması. c) Damlatılan kanın bir lamel yardımıyla lam üzerinde yayılması.

3.2.5. Kan Frotilerinin Boyanması

Boyanacak olan kan frotileri modifiye May-Grünwald Giemsa metoduyla boyanmak üzere boya haznesine yerleştirilmiştir (Şekil 3.5, a) ve iki kez filtre edilmiş May-Grünwald'la üç dakika boyanmıştır (Şekil 3.5, b). Ardından üzerine boyayla eşit hacimde 0.1M disodyumsitrat/NaOH tamponu (PH:5.2) eklenmiş ve metalik parlaklık oluşuncaya kadar (beş dakikayı geçmeyecek şekilde) beklenmiştir (Şekil 3.5, c). Bu süre sonunda boya solüsyonu dökülerek frotiler distile suyla yıkanmıştır (Şekil 3.5, d). Daha sonra frotiler %30'luk Giemsa'yla (0.1 M disodyumsitrat/NaOH (pH=5.2) içinde hazırlanmış ve filtre edilmiş) 22 dakika boyanmıştır (Şekil 3.5, e). 22 dakika sonra frotiler 10 dakika boyunca distile suyla yıkanmıştır (Şekil 3.5, f). %100'lük etanolde toplam 2 dakika bekletilen frotiler ksilolde toplam 15 dakika bekletilerek şeffaflaştırılmış (Şekil 3.5, g) ve daha sonra da entellanla kapatılarak daimi preparatlar oluşturulmuştur (Şekil 3.5, h).



Şekil 3.5. Frotilerin May-Grünwald Giemsa boyama metoduyla boyanması. a) Boyanacak olan frotiler. b) Frotilerin iki kez filtre edilmiş May-Grünwald'la (Eritrosit hücrelerinin sitoplazmasını boyar) üç dakika boyanması. c) Üzerine May-Grünwald boyasıyla eşit miktarda 0.1M disodyumsitrat/NaOH tamponu (pH:5.2) eklenmesi ve metalik parlaklık oluşuncaya kadar (beş dakikayı geçmeyecek şekilde) beklenmesi. d) Frotilerin distile suyla yıkanması. e) Frotilerin %30'luk Giemsa'yla (0.1 M disodyumsitrat/NaOH (pH=5.2) içinde hazırlanmış ve filtre edilmiş) 22 dakika boyanması. f) Frotilerin distile suyla on dakika boyunca yıkanması g) Frotilerin %100'lük etanolde toplam iki dakika (boya fazlalıklarının giderilmesi), ksilolde toplam 15 dakika (şeffaflaştırma) bekletilmesi. h) Frotilerin kapatma ortamı olarak Entellan'la® daimi preparat haline getirilmesi.

3.2.6. Preparatların Analiz Edilmesi

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunun immersiyon objektifiyle incelenmiştir ve gerekli görülen alanların dijital görüntüleri kaydedilmiştir (DP2-BSW,

Olympus corporation, Ver. 1.2, 2006 dijital görüntü analiz programı). Her bir embriyonun periferik kan eritrositlerindeki nükleer anormallik (Nuclear Abnormality, NA) ve MN oranları belirlenmiştir. NA'lar değerlendirilirken çift nükleuslu (binuclei), çok sayıda nükleuslu (multinuclei), tomurcuklu (blebbed nuclei), çentikli (notched nuclei) ve loblu (lobed nuclei) gibi anormallikler ele alınmıştır. MN'ler değerlendirilirken Wolf ve Luepke (1997), Wolf ve ark. (2002) ve Maul ve ark. (2022) referans olarak kabul edilmiştir. Bu referanslara göre yuvarlak-oval şekilli ve sınırları belli, üç boyutlu, nükleusa benzer, nükleus boyutunun üçte ikisini geçmeyen, nükleusla aynı boyanma özelliğine sahip yapılar MN olarak değerlendirilmiştir.

Kuluçkanın 11. gününde kan alınan her bir embriyodan 5000 eritrosit hücresi değerlendirilmiştir. Embriyonik dönemdeki hücre tiplerinin değerlendirilmesinde Maul ve ark. (2022) tarafından yeni yayınlanan atlas dikkate alınmıştır. Bu atlasa göre MN sadece polikromatik ve normokromatik eritrositlerde değerlendirilmiştir. Diğer hücre tiplerinde MN oluşumu ya da hücreSEL ve nükleer etkiler kaydedilmiştir ancak hücre sayımında dikkate alınmamıştır. Primitif eritrositler polikromatik ve normokromatik eritrositlerin ortaya çıkmasından önce sekiz günlük bir yaşam süresiyle yumurta gelişiminin 36. saatinden yedinci gününe kadar gelişmektedir. Yani kuluçkanın sekizinci ve 11. günleri arasında sadece olgun bölünmeyen primitif eritrositler bulunmaktadır. Bu nedenle de primitif eritrositler MN analizi için dikkate alınmamaktadır.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Eritrositlerdeki MN ve NA oranları bakımından kontrol ve CP gruplarıyla diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

Canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları açısından kontrol ve CP gruplarıyla diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için t-testi uygulanmıştır.

İstatistiksel analizler uygulanırken paket program SPSS (13.0.0; SPSS Inc., Chicago IL) kullanılmıştır ve $p < 0.05$ önem düzeyi olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Sonuçları

4.1.1. Genel Gözlemler

Bu çalışmada, oluşturulan 11 grupta toplam 110 adet ATABEY hibrit damızlıklara ait ortalama 60.49 ± 2.08 g ağırlığında kuluçkalık döllü yumurtalar kullanılmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Genotoksik etkilerin belirlenmesinde kontrol grubu olarak oluşturulan K1 ile diğer gruplar arasında yumurta başlangıç ağırlığı bakımından istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1) ($p > 0.05$). Aynı zamanda antigenotoksik etkilerin belirlenmesinde kontrol grubu olarak oluşturulan K2 ile diğer gruplar arasında da yumurta başlangıç ağırlığı bakımından istatistiksel olarak herhangi bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4.2) ($p > 0.05$). Bu veri kontrol gruplarıyla diğer gruplar arasında yumurta başlangıç ağırlığı bakımından homojen bir dağılım gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Yumurtaların 98 tanesinin döllü olduğu görülmüştür ve döllülük oranı %89.09 olarak hesaplanmıştır. Kuluçkanın 11. gününde hassas teraziyle tartılan yumurtaların ortalama ağırlıklarının 56.90 ± 2.00 g olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada iki ayrı kontrol grubu oluşturulmuştur. K1 grubundaki yumurtaların, kuluçka döneminin başlangıcındaki ağırlık ortalaması 59.56 ± 2.36 g olarak hesaplanmıştır. Bu grubun kuluçka döneminin 11. günündeki ağırlık ortalamasının ise 55.89 ± 2.02 g olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu verilere göre K1 grubunun ağırlık kaybı yüzdesi %6.16 olarak hesaplanmıştır. K2 grubundaki yumurtaların ise kuluçka döneminin başlangıcındaki ağırlık ortalaması 60.00 ± 2.23 g olduğu görülmüştür ve bu grubun kuluçka döneminin 11. günündeki ağırlık ortalaması ise 56.36 ± 1.98 g olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilere göre ise K2 grubunun ağırlık kaybı yüzdesinin %6.07 olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Bu sonuçlara göre yumurtaların kuluçka dönemi boyunca günlük ağırlık kaybı K1 grubunda yaklaşık %0.54 iken, K2 grubunda yaklaşık %0.55 olduğu görülmüştür.

Tablo 4.1. Genotoksik etkilerin belirlendiği 11 günlük kuluçkaya ait veriler.

Gruplar (Doz)	Gruptaki Yumurta Sayısı	Yumurta Başlangıç Ağırlığı (g) (Ort±SS)	Kuluçka 11. gün Yumurta Ağırlığı (g) (Ort±SS)	Yumurta Ağırlık Kaybı (%)	Döllü Yumurta Sayısı	Döllülük Oranı (%)
Kontrol 1 100 µl su (K1)	10	59.56±2.36*	55.89±2.02	6.16	10	100
Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	10	61.31±1.34	57.76±1.23	5.80	9	90
Propolis 500 µg/y (P1)	10	60.06±2.32	56.50±2.40	5.93	9	90
Propolis 250 µg/y (P2)	10	59.76±1.94	55.82±1.56	6.59	10	100
Propolis 50 µg/y (P3)	10	59.31±3.03	55.36±2.81	6.66	7	70

* K1 grubuyla diğer gruplar arasında yumurta başlangıç ağırlığı bakımından istatistiksel olarak önemli fark yoktur (t-test. $p>0.05$)

Tablo 4.2. Antigenotoksik etkilerin belirlendiği 11 günlük kuluçkaya ait veriler.

Gruplar (Doz)	Gruptaki Yumurta Sayısı	Yumurta Başlangıç Ağırlığı (g) (Ort±SS)	Kuluçka 11. gün Yumurta Ağırlığı (g) (Ort±SS)	Yumurta Ağırlık Kaybı (%)	Döllü Yumurta Sayısı	Döllülük Oranı (%)
Kontrol 2 200 µl su (K2)	10	60.00±2.23*	56.36±1.98	5.89	10	100
Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	10	61.31±1.34	57.76±1.23	5.80	9	90
Askorbik Asit 50 µg/y (AA)	10	60.04±2.42	56.60±2.35	5.61	10	100
Siklofosfamid 50 µg/y + Askorbik Asit 50 µg/y (CA)	10	61.53±1.73	57.81±1.50	6.05	10	100
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 500 µg/y (CP1)	10	61.71±1.49	57.93±1.15	6.13	8	80
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 250 µg/y (CP2)	10	61.03±1.50	58.02±1.50	4.93	7	70
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 50 µg/y (CP3)	10	61.50±1.32	58.30±1.27	5.20	8	80

* K2 grubuyla diğer gruplar arasında yumurta başlangıç ağırlığı bakımından istatistiksel olarak önemli fark yoktur (t-test. $p>0.05$)

Kuluçkanın 11. gününde tüm gruplarda, incelenen embriyoların canlılık oranı %100 olarak hesaplanmıştır. Embriyolar makroskobik olarak incelendiğinde herhangi bir anormallik tespit edilmemiştir (Şekil 4.1 ve 4.2).



Şekil 4.1. Genotoksik etkilerin belirlendiği deneyden sırasıyla K1, CP, P1, P2 ve P3 gruplarına (soldan sağa) ait embriyo görüntüleri.



Şekil 4.2. Antigenotoksik etkilerin belirlendiği deneyden sırasıyla K2, CP, AA, CA, CP1, CP2 ve CP3 gruplarına (soldan sağa) ait embriyo görüntüleri.

Alizarin Red-S'le boyanan embriyolar makroskobik düzeyde incelendiğinde de kemik gelişiminde herhangi bir gecikme ve anormallik tespit edilmemiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3. Genotoksik etkilerin belirlendiği deneyden sırasıyla K1, CP, P1, P2 ve P3 gruplarına (soldan sağa) ait Alizarin Red-S'yle boyanmış embriyoların görüntüleri.



Şekil 4.4. Antigenotoksik etkilerin belirlendiği deneyden sırasıyla K2, CP, AA, CA, CP1, CP2 ve CP3 gruplarına (soldan sağa) ait Alizarin Red-S'yle boyanmış embriyoların görüntüleri.

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi genotoksik etkilerin belirlendiği deney grupları arasında CP, P1, P2 ve P3 gruplarının 11. gün canlı embriyo ağırlıkları ile rölatif embriyo ağırlıkları, kontrol grubu olan K1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Tablo 4.4’de görüldüğü üzere de antigenotoksik etkilerin belirlendiği deney grupları arasında CP, CP1, CP2 ve CP3 gruplarının 11. gün canlı embriyo ağırlıkları ile rölatif embriyo ağırlıkları, kontrol grubu olan K2 grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). AA ve CA gruplarının 11. gün canlı embriyo ağırlıkları ile rölatif embriyo ağırlıkları, K2 grubuna kıyasla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). CA, CP1, CP2 ve CP3 gruplarının 11. gün canlı embriyo ağırlıkları ile rölatif embriyo ağırlıkları, CP grubuna kıyasla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). Ancak AA grubunun 11. gün canlı embriyo ağırlığı ile rölatif embriyo ağırlığı, CP grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$).

Tablo 4.3. Kuluçkanın 11. gününde genotoksik etkilerin belirlendiği embriyolara ait bazı veriler.

Gruplar (Doz)	Döllü Yumurta Sayısı	Canlı Embriyo Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Canlı Embriyo Ağırlığı (g) (Ort±SS)	Rölatif Embriyo Ağırlığı (%) (Ort±SS)	Anormal Embriyo Sayısı	Anormal Embriyo Oranı (%)
Kontrol 1 100 µl su (K1)	10	10	100	3.34±0.23	5.98±0.42	0	0
Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	9	9	100	2.62±0.18*	4.54±0.30*	0	0
Propolis 500 µg/y (P1)	9	9	100	2.97±0.22*	5.26±0.32*	0	0
Propolis 250 µg/y (P2)	10	10	100	3.00±0.20*	5.37±0.34*	0	0
Propolis 50 µg/y (P3)	7	7	100	2.90±0.32*	5.27±0.76*	0	0

* K1 grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test. $p < 0.05$)

Tablo 4.4. Kuluçkanın 11. gününde antigenotoksik etkilerin belirlendiği embriyolara ait bazı veriler.

Gruplar (Doz)	Döllü Yumurta Sayısı	Canlı Embriyo Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Canlı Embriyo Ağırlığı (g) (Ort±SS)	Rölatif Embriyo Ağırlığı (%) (Ort±SS)	Anormal Embriyo Sayısı	Anormal Embriyo Oranı (%)
Kontrol 2 200 µl su (K2)	10	10	100	2.89±0.18	5.13±0.33	0	0
Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	9	9	100	2.62±0.18*	4.54±0.30*	0	0
Askorbik Asit 50 µg/y (AA)	10	10	100	3.00±0.23†	5.32±0.51†	0	0
Siklofosfamid 50 µg/y + Askorbik Asit 50 µg/y (CA)	10	10	100	2.79±0.21	4.83±0.41	0	0
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 500 µg/y (CP1)	8	8	100	2.47±0.14*	4.26±0.22*	0	0
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 250 µg/y (CP2)	7	7	100	2.55±0.10*	4.40±0.27*	0	0
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 50 µg/y (CP3)	8	8	100	2.59±0.15*	4.45±0.32*	0	0

* K2 grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test. $p < 0.05$)

† CP grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test. $p < 0.05$)

4.1.2. HET-MN Sonuçları

Kuluçkanın 11. gününde hazırlanan kan preparatları ışık mikroskopuyla incelendiğinde hücre topluluğunun büyük bir kısmında yüksek oranda polikromatik ve normokromatik eritrositler gözlemlenirken daha az oranda primitif eritrositler gözlemlenmiştir. Bu preparatlarda trombositlere az miktarda rastlanırken diğer hücre tiplerine (eritroblast, erken polikromatik eritrosit, granüler lökosit) nadir rastlanmıştır. Işık mikroskobu altında incelenen preparatlarda gözlemlenen hücre tipleri ve bu hücrelerde oluşan NA ve MN'ler Şekil 4.5- 8'de görülmektedir.

Kontrol grubuna ait genel bir görünüm Şekil 4.5'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi hücre topluluğunun büyük bir kısmı polikromatik ve normokromatik eritrositlerden oluşurken bir kısmı da primitif eritrositlerden oluşmaktadır. Genel olarak kontrol grubu preparatları incelendiğinde polikromatik ve normokromatik eritrositlerde MN gözlemlenmemiştir fakat nadir olarak NA gözlemlenmiştir.

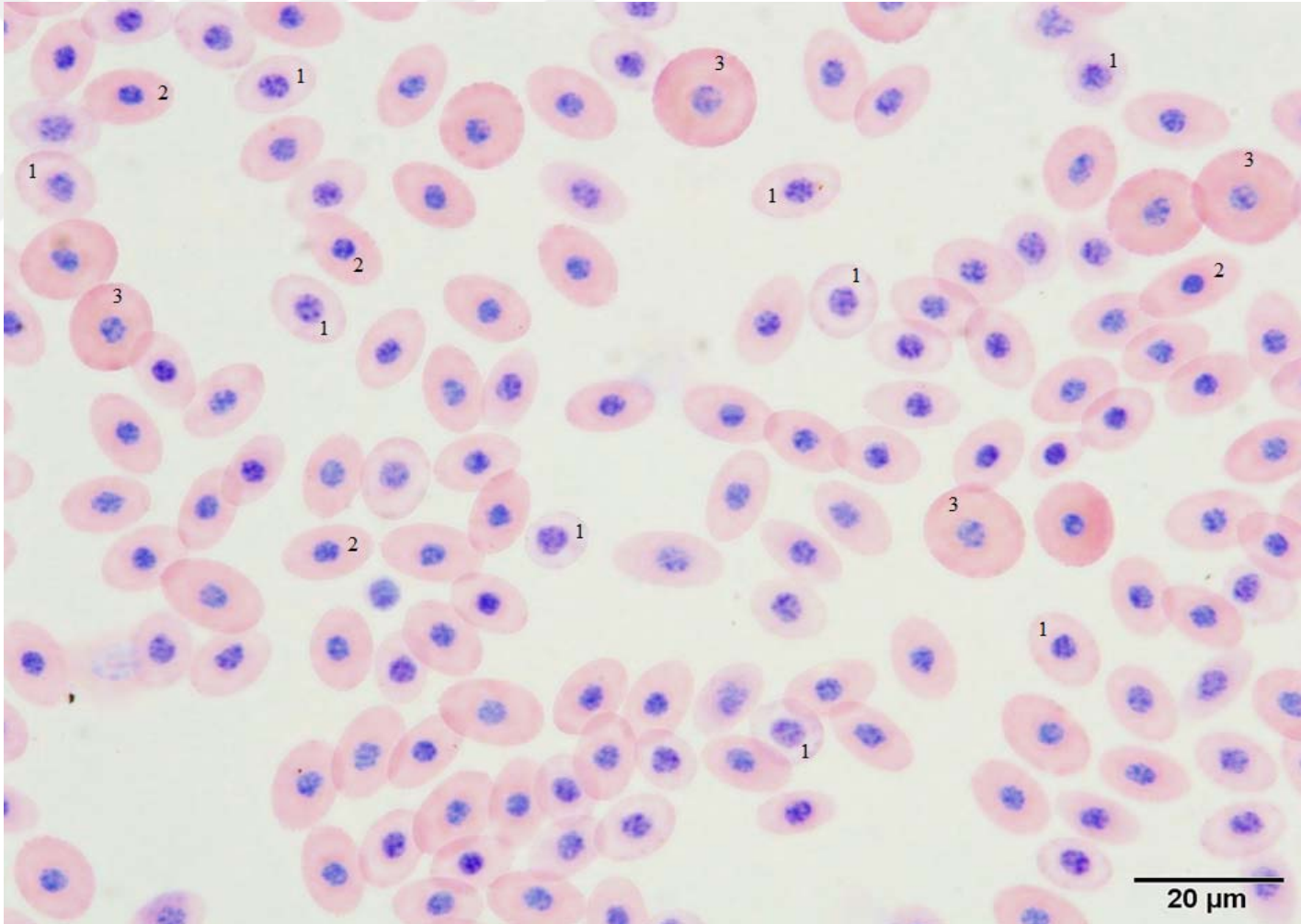
HET-MN analizi sonucunda incelenen preparatlarda gözlemlenen tüm hücre tipleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu hücre tiplerini bir MN'li polikromatik eritrosit, iki MN'li polikromatik eritrosit, üç MN'li polikromatik eritrosit, binükleuslu polikromatik eritrosit, üç nükleuslu polikromatik eritrosit, dört nükleuslu polikromatik eritrosit, loblu nükleusuyla polikromatik eritrosit, tomurcuklu nükleusuyla polikromatik eritrosit, çentikli nükleusuyla polikromatik eritrosit, metafaz evresindeki polikromatik eritrosit, anafaz evresindeki polikromatik eritrosit oluşturmaktadır.

CP grubuna ait genel bir görünüm Şekil 4.7'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi hücre topluluğunun büyük bir kısmı polikromatik ve normokromatik eritrositlerden oluşurken bir kısmı da primitif eritrositlerden oluşmaktadır. Genel olarak CP grubu preparatları incelendiğinde MN'ler ve NA'lar polikromatik eritrositlerde gözlemlenmiştir. Şekil 4.7'de ise genotoksisiteyi belirleyecek olan polikromatik eritrositlerde oluşan tek MN'li, iki MN'li ve binükleuslu hücreler görülmektedir.

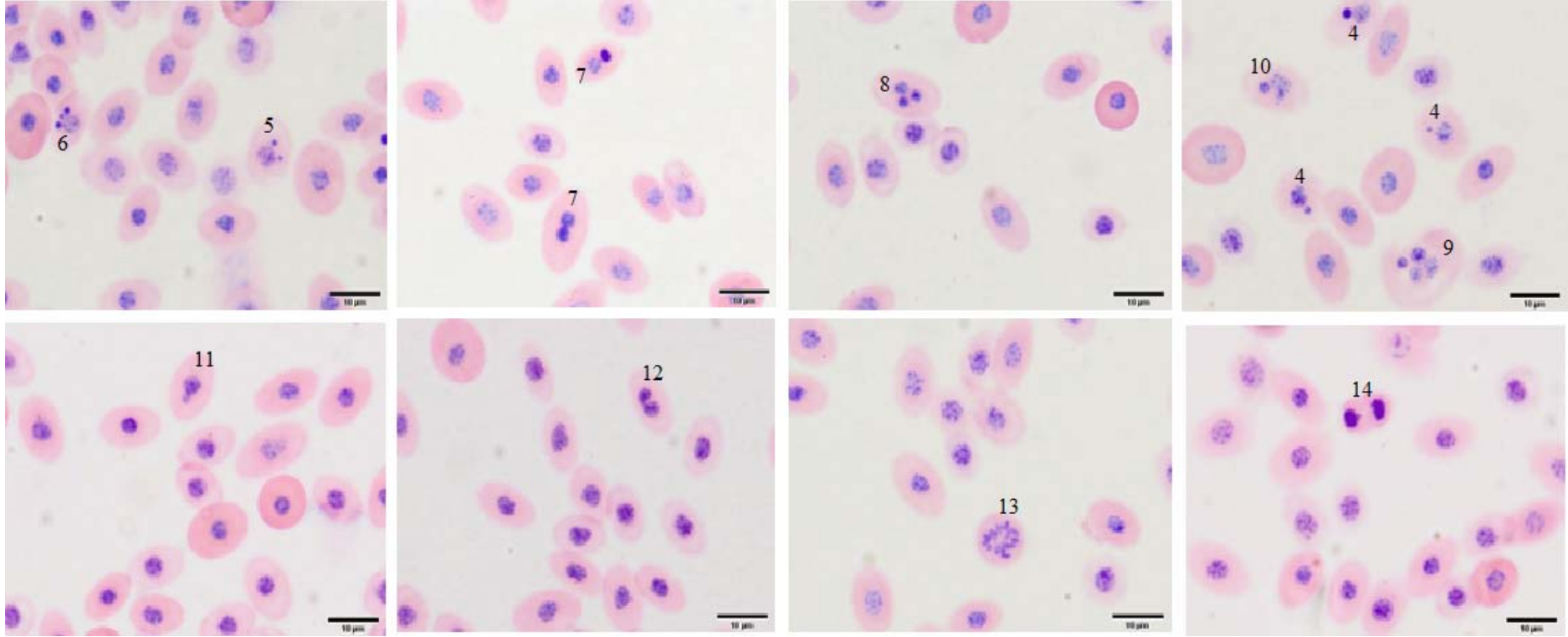
Şekil 4.8'de ise CP ile propolisin düşük dozunun birlikte uygulandığı gruba (CP3) ait genel bir görünüm verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi hücre topluluğunun büyük bir kısmı polikromatik ve normokromatik eritrositlerden oluşurken bir kısmı da primitif eritrositlerden oluşmaktadır. Genel olarak CP3 grubuna ait preparatlar incelendiğinde MN'ler ve NA'lar polikromatik eritrositlerde gözlemlenmiştir. Şekil 4.8'de polikromatik eritrositlerde oluşan iki MN'li polikromatik eritrosit, binükleuslu

polikromatik eritrosit, loblu nükleusuyla polikromatik eritrosit, bir MN'li ve binükleuslu polikromatik eritrosit görülmektedir.

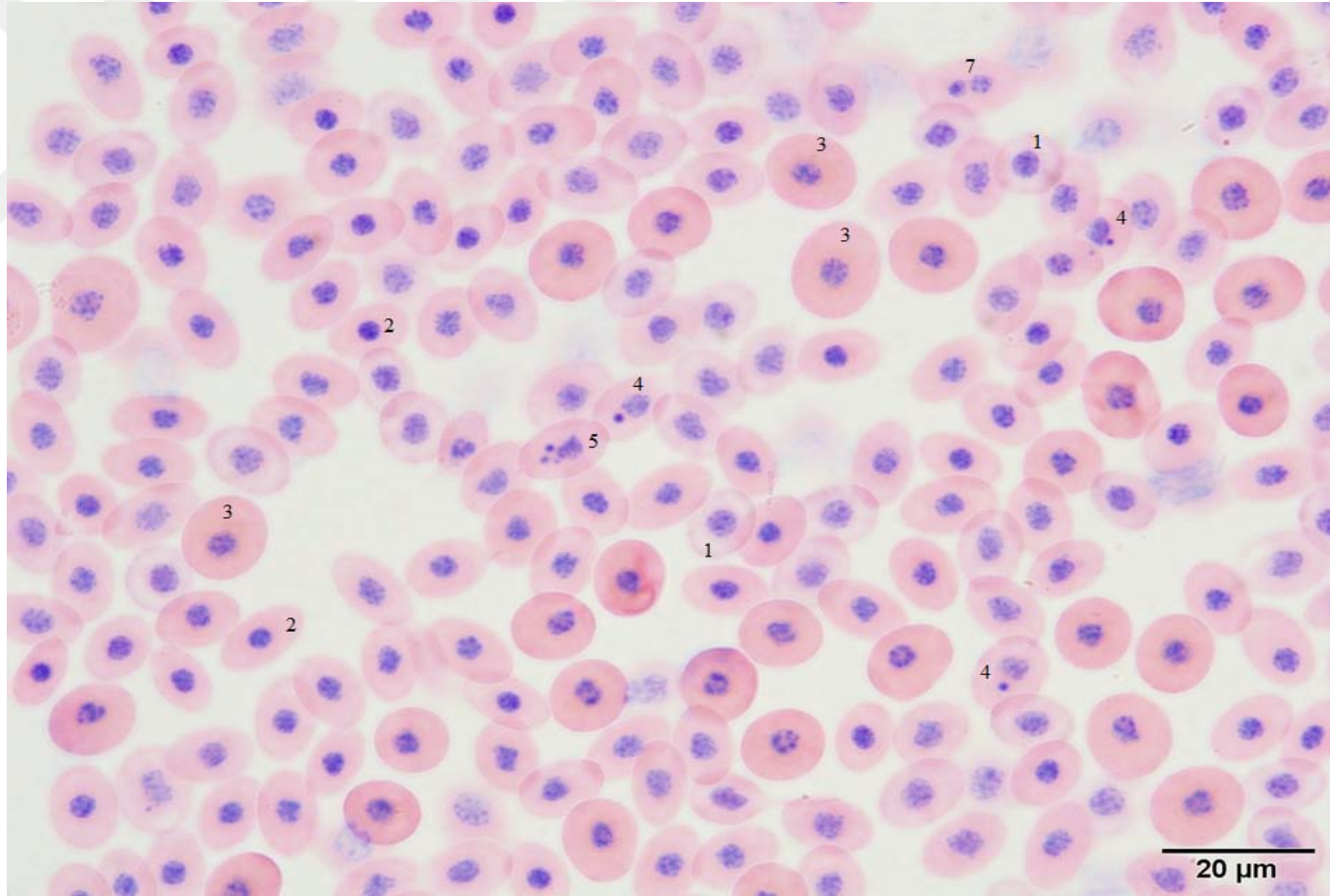




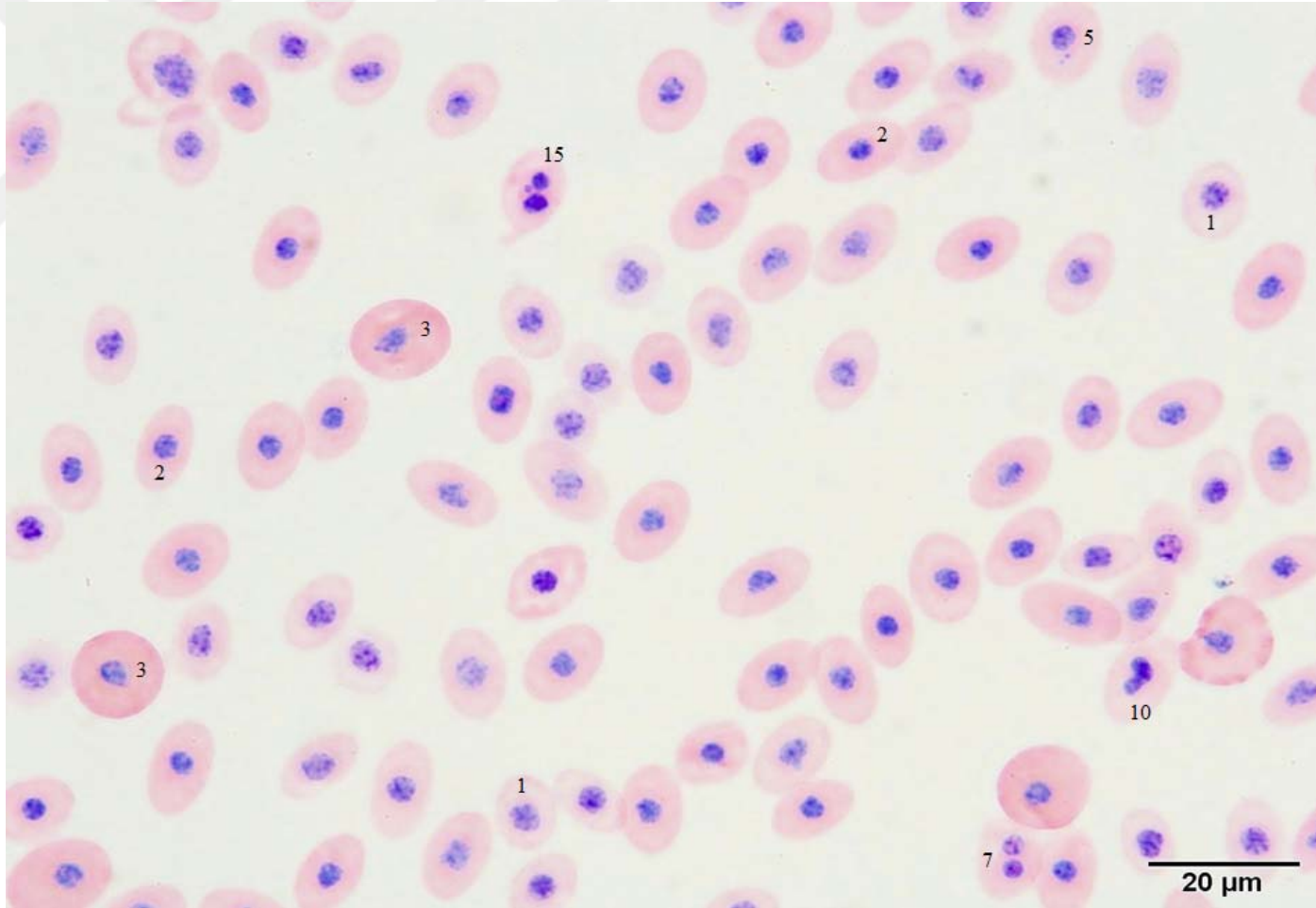
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait genel bir görünüm. Kuluçkanın 11. gününde periferik kandan hazırlanan frotilerin modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanarak preparat haline getirilmesi ve ışık mikroskopunun immersiyon objektifiyle incelenmesi sonucu gözlemlenen eritrosit hücresi tipleri. ¹polikromatik eritrosit, ²normokromatik eritrosit, ³primitif eritrosit. (Bar: 20 µm).



Şekil 4.6. Kuluçkanın 11. gününde periferik kandan hazırlanan frotilerin modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanarak preparat haline getirilmesi ve ışık mikroskopunun immersiyon objektifiyle incelenmesi sonucu genel olarak eritrositlerde gözlemlenen mikronukleus (MN) ve nükleer anormallikler (NA) ile hücre tipleri. ⁴bir MN'li polikromatik eritrosit, ⁵iki MN'li polikromatik eritrosit, ⁶üç MN'li polikromatik eritrosit, ⁷binükleuslu polikromatik eritrosit, ⁸üç nükleuslu polikromatik eritrosit, ⁹dört nükleuslu polikromatik eritrosit, ¹⁰loblu nükleusuyla polikromatik eritrosit, ¹¹tomurcuklu nükleusuyla polikromatik eritrosit, ¹²çentikli nükleusuyla polikromatik eritrosit, ¹³metafaz evresindeki polikromatik eritrosit, ¹⁴anafaz evresindeki polikromatik eritrosit (Bar: 10 µm)



Şekil 4.7. CP grubuna ait genel bir görünüm. Kuluçkanın 11. gününde periferik kandan hazırlanan frotilerin modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanarak preparat haline getirilmesi ve ışık mikroskopunun immersiyon objektifiyle incelenmesi sonucu eritrositlerde gözlemlenen mikronukleus (MN) ve nükleer anormallikler (NA) ile hücre tipleri. ¹polikromatik eritrosit, ²normokromatik eritrosit, ³primitif eritrosit, ⁴bir MN'li polikromatik eritrosit, ⁵iki MN'li polikromatik eritrosit, ⁷binükleuslu polikromatik eritrosit (Bar: 20 µm).



Şekil 4.8. CP3 grubuna ait genel bir görünüm. Kuluçkanın 11. gününde periferik kandan hazırlanan frotilerin modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanarak preparat haline getirilmesi ve ışık mikroskopunun immersiyon objektifiyle incelenmesi sonucu eritrositlerde gözlemlenen mikronukleus (MN) ve nükleer anormallikler (NA) ile hücre tipleri. ¹polikromatik eritrosit, ²normokromatik eritrosit, ³primitif eritrosit, ⁵iki MN'li polikromatik eritrosit, ⁷binükleuslu polikromatik eritrosit, ¹⁰loblu nükleusuyla polikromatik eritrosit, ¹⁵bir MN'li ve binükleuslu polikromatik eritrosit (Bar: 20 µm).

Embriyolardan kan alınarak hazırlanan preparatların tümü incelendiğinde, genotoksik etkilerin belirlendiği gruplara ait MN, NA ve total anormallik oranları Tablo 4.5’de verilirken antigenotoksik etkilerin belirlendiği gruplara ait MN, NA ve total anormallik oranları Tablo 4.6’da verilmiştir. Tablo 4.5’e bakıldığında CP genotoksik madde grubudur. CP grubu K1 grubuyla kıyaslandığında MN, NA ve total anormallik oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$). P1, P2 ve P3 grupları K1 grubuyla kıyaslandığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$).

Tablo 4.6’da görülebileceği gibi yine genotoksik madde grubu CP grubu iken antigenotoksik madde grubu AA grubudur. CP, CA, CP1, CP2 ve CP3 grupları K2 grubuyla kıyaslandığında MN, NA ve total anormallik oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$). AA grubu K2 grubuyla kıyaslandığında ise MN, NA ve total anormallik oranları bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). Ayrıca CA, CP1, CP2 ve CP3 grupları CP grubuyla MN, NA ve total anormallik oranları bakımından kıyaslanmıştır. CA ve CP3 grupları CP grubuyla kıyaslandığında MN oranı istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). CP1 ve CP2 grupları CP grubuyla kıyaslandığında MN oranı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). CP1 grubu CP grubuyla kıyaslandığında NA oranı istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$). CP3 grubu CP grubuyla kıyaslandığında ise NA oranı istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). CA ve CP2 grupları CP grubuyla kıyaslandığında NA oranı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$). CA ve CP3 grupları CP grubuyla kıyaslandığında total anormallik oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). CP1 grubu CP grubuyla kıyaslandığında total anormallik oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$). CP2 grubu CP grubuyla kıyaslandığında total anormallik bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$).

Tablo 4.5. Genotoksik etkilerin belirlendiği HET-MN sonuçları.

Gruplar (Doz)	Uygulama Hacmi	Uygulama günü	Kan alma günü	Kan alınan embriyo sayısı	Her yumurtada değerlendirilen eritrosit sayısı	MN oranı (%) (Ort±SS)	NA oranı (%) (Ort±SS)	Total MN ve NA oranı (%) (Ort±SS)
Kontrol 1 100 µl su (K1)	100 µl	8	11	9	5000	0.00±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01
Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	100 µl	8	11	7	5000	2.29±0.12*	0.29±0.06*	2.57±0.14*
Propolis 500 µg/y (P1)	100 µl	8	11	9	5000	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.02
Propolis 250 µg/y (P2)	100 µl	8	11	9	5000	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.02
Propolis 50 µg/y (P3)	100 µl	8	11	6	5000	0.01±0.02	0.00±0.00	0.01±0.02

* K1 grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Mann-Whitney U, p<0.05)

Tablo 4.6. Antigenotoksik etkilerin belirlendiği HET-MN sonuçları.

Gruplar (Doz)	Uygulama Hacmi	Uygulama günü	Kan alma günü	Kan alınan embriyo sayısı	Her yumurtada değerlendirilen eritrosit sayısı	MN oranı (%) (Ort±SS)	NA oranı (%) (Ort±SS)	Total MN ve NA oranı (%) (Ort±SS)
Kontrol 2 200 µl su (K2)	200 µl	8	11	8	5000	0.00±0.00	0.01±0.02	0.01±0.02
Siklofosfamid 50 µg/y (CP)	100 µl	8	11	7	5000	2.29±0.12*	0.29±0.06*	2.57±0.14*
Askorbik Asit 50 µg/y (AA)	100 µl	8	11	7	5000	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.02
Siklofosfamid 50 µg/y + Askorbik Asit 50 µg/y (CA)	100 µl+100 µl	8	11	8	5000	1.52±0.17*†	0.25±0.08*	1.77±0.19*†
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 500 µg/y (CP1)	100 µl+100 µl	8	11	7	5000	2.45±0.22*	0.58±0.29*†	3.03±0.48*†
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 250 µg/y (CP2)	100 µl+100 µl	8	11	7	5000	1.95±0.31*	0.36±0.07*	2.31±0.36*
Siklofosfamid 50 µg/y + Propolis 50 µg/y (CP3)	100 µl+100 µl	8	11	7	5000	1.85±0.22*†	0.21±0.04*†	2.06±0.25*†

* K2 grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Mann-Whitney U, p<0.05)

† CP grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Mann-Whitney U, p<0.05).

4.2. Tartışma

Bir maddenin (ilaçlar, pestisitler, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, biyolojik veya kimyasal maddeler) genotoksik, antigenotoksik, teratojenik ve embriyotoksik etkilerini belirleyebilmek için birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerin içinde, kanatlı embriyoların kullanımı oldukça yaygındır. Döllü tavuk yumurtalarına çeşitli modifikasyonlar uygulanarak farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden Jelinek (1977) Tavuk Embriyotoksitesisi Belirleme Yöntemini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST), Luepke (1985) Tavuk Yumurtası Korioallantoik Membran Testini (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane, HET-CAM), Kemper ve Luepke (1986) Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET), Nishigori ve ark. (1992) Döllü Tavuk Yumurtası Tarama Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST), Neumann ve ark. (1997) Tavuk Yumurtası Göz Testini (Photo Hen's Egg Test, PHET) ve Wolf ve Luepke (1997) ise Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testini (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) geliştirmişlerdir.

Bu yöntemler kısa süreli, ucuz ve kolay tekrarlanabilir olduğundan dolayı avantajlıdır. Ayrıca bu yöntemin en büyük avantajlarından biri de tavuk embriyolarının gelişim aşamalarının çok iyi bilinip gözlemlenebilmesidir. Tavuk embriyosu kullanılarak yapılan deneylerde bir diğer önemli avantaj da, bir memeli testine göre çok sayıda denek kullanılabilmesidir. Bu avantaj toksisitenin değerlendirilmesi açısından istatistiksel olarak önemlidir. Tavuk embriyoları üzerinde yapılan testler hayvan hakları ve etik kurallarına ters düşmemektedir. CHEST ve HET yöntemleri sonucunda elde edilen veriler, memeli canlıları kullanarak yapılan deneylerle ortalama olarak aynı verileri ortaya koymaktadır (Jelinek 1977, Jelinek ve ark. 1985, Kemper ve Luepke 1986, Vesely ve Vesela 1991, Özcan 1992, Jelinek ve Marhan 1994, Davies ve Freeman 1995). Memelilerde var olan anne-fetüs bağlantısı tavuk embriyolarında yoktur. Ayrıca bazı bileşik maddeler tavuk embriyosu testlerinde nonspesifik bir etkiyle yanlış pozitif sonuçlar vermektedir. Bu özellikler ise tavuk embriyosu testlerinin dezavantajlarıdır (Özcan 1992). HET test modelleriyle tavuk embriyolarının yumurtadan çıktıktan hemen sonraki ağırlıkları, gelişim gerilikleri, organ ağırlıkları ve ölüm oranları (LD₅₀) değerlendirilebilmektedir. Ayrıca kanın kimyasal parametrelerinin belirlenmesi, immünopatolojik etkilerin belirlenmesi, sistematik etkilerin (hematolojik parametreler gibi) belirlenmesi ve teratojenitenin (anatomik, makroskobik ve iskelet gelişimi

anormallikleri gibi) belirlenmesinde HET test modelleri etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Kemper ve Luepke 1986).

Bir denek olarak tavuk yumurtası modeli, tümör biyolojisinde, mukozal ve göz toksisitesi çalışmalarında, ağır metallerin etkilerinin tespit edilmesinde ve çoğu ilacın kardiyovasküler sisteme etkilerinin gözlemlenmesinde kullanılmaktadır (Rosenbruch 1994). Tıp ve biyoloji alanında tavuk yumurtası testleri çok fazla kullanılmaktadır. Ayrıca tavuk yumurtası üzerinde yapılan deneyler kuluçkanın 1/3'lük evresinde gerçekleştirilmektedir ve bu evrede embriyoların acıya duyarlılıkları gelişmemiştir. Tavuk yumurtası testleri bu özelliğinden dolayı hayvan deneylerine karşı bir alternatif olarak düşünülmektedir (Rosenbruch 1994, 1997).

Kuluçka süresi boyunca dömlü tavuk yumurtalarında günlük olarak bir ağırlık kaybı söz konusudur. Tavuk yumurtalarındaki ağırlık kaybı, kabuklarında bulunan porlardan nemin buharlaşmasıyla birlikte oluşmaktadır. Yumurtalardaki ağırlık kaybı, kuluçka makinesinin nispi nem ayarının yapılabilmesi için önemli bir unsurdur. Kuluçka süresi boyunca kontrol grubuna ait dömlü tavuk yumurtalarında oluşan günlük ağırlık kaybı günde %0.50-0.70 arasında olmalıdır (Mauldin 1993). Yaptığımız çalışmada yumurtaların kuluçka dönemi boyunca günlük ağırlık kaybı K1 grubunda yaklaşık %0.54, K2 grubunda ise %0.55 olduğu görülmüştür. Her iki kontrol grubunda da günlük ortalama ağırlık kaybı oranları önerilen değerler arasındadır. Bu durum kuluçka ortamının optimum şartlara yakın olduğunu göstermektedir.

Tavuk embriyosu kullanılarak yapılan deneylerde, kullanılacak olan dömlü tavuk yumurtalarının sayısı ve bu yumurtaların ağırlığı, test solüsyonlarının enjekte edileceği bölge ve enjeksiyon zamanı, test solüsyonlarının hacmi, kullanılacak çözücünün cinsi ve konsantrasyonu en çok dikkat edilmesi gereken unsurlardır. Dömlü tavuk yumurtalarının kullanıldığı deneylerde, etkisi belirlenecek olan maddenin uygun dozları yumurtaya, embriyonun kaudal bölgesinden, hava kamarasından veya yumurta sarısı ve albümin gibi bölgelere enjeksiyonla verilebilmektedir. Verilen solüsyonların homojen olarak hızlı bir şekilde kolaylıkla diffüze olması, kontaminasyon riskinin az olması, iç basıncın yükselmesine karşı embriyoda oluşabilecek mekanik hasarın engellenmesi ve uygulamanın basitliği açısından hava kamarasına yapılan enjeksiyon yöntemi bu yöntemler arasında en çok tercih edilen ve en ideal olanıdır (Prelusky ve ark. 1987, (Hashizume ve ark. 1992) Çelik ve ark. 2000, Sur 2001, Öznurlu 2003)(Wytenbach ve Thompson 1985, Varga ve ark. 1999, Varnagy 1999, Budai ve ark. 2001, Varnagy ve ark. 2001, Budai ve ark. 2002, Fejes ve ark. 2002, Varga ve ark. 2002). Tavuk

yumurtası kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde hava kamarasına yapılan enjeksiyon sonucu test maddesinin tamamının embriyoya iletilip iletilmediği belirsizdir. Bu durum ise bu test sisteminin en büyük dezavantajıdır (Prelusky ve ark. 1987).

Tavuk yumurtası testlerinde test maddesinin formu enjeksiyon zamanını belirlemektedir. Örneğin; bir maddenin doğal formu incelenecekse kuluçkanın erken dönemlerinde enjeksiyon işlemi yapılması gerekirken bir maddenin karaciğerde metabolize edilmesiyle ortaya çıkacak metabolitlerin etkileri belirlenecekse kuluçkanın daha geç dönemlerinde enjeksiyon işlemi gerçekleştirilmelidir (Jelinek ve ark. 1985, Prelusky ve ark. 1987, Özcan 1992). Bunun dışında eğer bir gıda katkı maddesinin veya pestisitlerin teratojenik etkileri incelenmek isteniyorsa enjeksiyon işlemi, kuluçka başlangıcında dömlü tavuk yumurtasının ya yumurta sarısına ya da hava kamarasına yapılmalıdır. Ayrıca tavuk yumurtası kullanılarak bir ilacın teratojenik etkisi belirlenmek istendiğinde enjeksiyon işlemi kuluçkanın üçüncü ve dördüncü günlerinde gerçekleştirilmelidir. Bunun sebebi kuluçkanın dördüncü gününde, tavuk embriolarında karaciğer farklılaşmasıyla birlikte detoksifikasyon olaylarının gerçekleşmesidir (Hamilton ve ark. 1983).

Kanatlı hayvanlarda karaciğer gelişimi kuluçkanın erken dönemlerinde farklılaşmaktadır ve memeli embriyolara kıyasla kanatlı hayvan embriolarında, karaciğer farklılaşması kuluçkanın erken dönemlerinde oldukça yoğundur. Yapılacak olan genotoksisite çalışmalarında eğer özellikle bir promutajen kullanılacaksa, kullanılan madde yumurtaya kuluçkanın sekizinci gününde enjekte edilmelidir (Wolf ve Luepke 1997). Bu çalışmada ise promutajen madde olarak CP kullanılmıştır ve enjeksiyon işlemi kuluçkanın sekizinci gününde gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonun kuluçkanın sekizinci gününde gerçekleştirilmesinin sebebi ise CP'nin karaciğerde metabolitlerinin etkilerinin incelenmek istenmesidir. Doğal formda olan bazı maddeler teratojenite ve toksisite göstermemektedir. Ancak doğal formda olan bu maddelerin, karaciğerde metabolize olmasıyla ortaya çıkan metabolitleri toksisite ve teratojenite etkileri güçlenmektedir veya bu özellikleri kazanmaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı bu tarz doğal formdaki maddeler kullanılarak yapılan çalışmalarda, enjeksiyon işleminin kuluçkanın erken dönemlerinde gerçekleştirilmesinde hatalı negatif sonuçların ortaya çıkması tehlikeli ve muhtemeldir. Hatalı pozitif sonuçların ortaya çıkması ise sadece para ve zaman kaybına sebep olacağından daha az tehlikelidir (Johnson 1986). Tüm bu olasılıklar göz önünde bulundurularak, CP'nin metabolitlerinin genotoksisitesini belirlemek amacıyla kuluçkanın sekizinci günü (tavuk embriolarında metabolik

işleyişin en yüksek olduğu zaman) enjeksiyonun gerçekleştirileceği gün olarak belirlenmiştir.

Çelik ve ark. (2000) hava kamarasına yapılan enjeksiyonlarla alakalı olarak, kuluçka başlangıcında gerçekleştirilen enjeksiyon işlemi, 20 µl'den daha yüksek miktarda verilen solüsyonların, yumurtada iç basıncı artırması nedeniyle zararlı etkiler gösterebileceğini ve tüm bunlar sonucunda da enjekte edilen test maddesinin etkisini gizleyebileceğini bildirmişlerdir. Kuluçkanın farklı zamanlarında yapılan enjeksiyon işlemi ve yumurtaya verilen solüsyon hacimleriyle alakalı olarak yapılan çalışmalardan örnek vermek gerekirse; Wyttenbach ve Thompson (1985), kuluçkanın 24., 48., ve 72., saatlerinde hava kamarasına 50 µl hacimde solüsyonlar verirken, Varga ve ark. (2002), kuluçkanın en başında ve 12. gününde 100 µl hacimde solüsyonlar vermiştir. Aynı şekilde bazı çalışmalarda tavuk yumurtası testinde kuluçkanın 12. gününde hava kamarasına 100 µl hacminde solüyonlar enjekte edilmiştir (Varga ve ark. 1999, Varnagy 1999, Budai ve ark. 2001, Varnagy ve ark. 2001, Budai ve ark. 2002, Fejes ve ark. 2002). Yapılan çalışmalarda kullanılan solüsyon hacimlerine ve enjeksiyonun kuluçka döneminin hangi saatinde/gününde gerçekleştirildiğine bakılacak olursa, kuluçka döneminin ilerleyen zamanlarında mekanik hasarların daha az etki etmesinden dolayı solüsyon miktarlarının (hacimlerinin) arttığı görülmektedir. Son zamanlarda Reisinger ve ark. (2022) ile Maul ve ark. (2022) tavuk yumurtalarıyla yaptıkları çalışmalarda farklı çözücülerle farklı hacimlerde solüsyonlar (deiyonize su: 300 µl (standart hacim) ve 1500 µl aralığında; IPM: 50 µl; %10'luk etanol: 100 µl; %10'luk DMSO: 100-300 µl olarak) hazırlayarak kuluçkanın sekizinci ve dokuzuncu günlerinde enjeksiyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalara bakılarak, gerçekleştirdiğimiz çalışmada kuluçkanın sekizinci gününde tavuk embriyolarının tolere edebileceği solüsyon hacmi 100 ve 200 µl/yumurta olarak düşünülmüş ve tercih edilmiştir.

Bir maddenin etkisini belirlemek için farklı miktarlarda dozlarının denenmesi gerekmektedir. Bunun üzerine Brown ve ark. (1986) yapılacak olan denemelerde bir maddenin en az üç farklı miktardaki dozunun denenmesi gerektiğini söylemişlerdir. Çelik ve ark. (2000), Balta (2017) ve Çelik ve Özparlak (2019) yaptıkları çalışmada etkisini belirleyecekleri maddenin üç farklı miktardaki dozlarını kullanmışlardır. Bu çalışmada da propolisin üç farklı miktardaki dozu (500 µg/y, 250 µg/y, 50 µg/y) incelenmiştir.

Tavuk yumurtası kullanılarak yapılan testlerde etkisi belirlenecek maddenin uygun çözücüde çözünmesi çok önemli bir etkidir. Çözücü olarak; %10'luk DMSO,

IPM, fizyolojik bidistile su, %1'lik karboksimetilselüloz (CMC), ayçiçek yağı veya %30'luk etanol gibi maddeler kullanılabilir (Özparlak ve ark. 2018). Yapılan bu çalışmada ise hem HET-MN uygulaması hem de su bazlı propolis için en uygun çözücü olarak steril bidistile su kullanılmıştır.

Bir maddenin genotoksitesinin incelenmesi adına yapılan çalışmalarda, kanatlı embriyolarının kullanıldığı birçok farklı çalışmalar vardır. Örneğin; primer hücre kültüründe programlı ve programsız RNA, DNA sentezleri (Tempel ve ark. 1992), DNA hasarları (Hamilton ve Bloom 1986), CA (Novotna ve Jelinek 1986, 1990), SCE (Todd ve Bloom 1980, Wilmer ve Bloom 1991, Arias 1996, 2003) gibi çalışmalarda tavuk embriyoları kullanılmıştır. Tavuk kanıyla yapılan MN deneylerinde özellikle insektisitlerin incelendiği birçok çalışma vardır. Örneğin Bhunya ve Jena (1992), Lindane'nin genotoksik etkisini tespit etmek amacıyla 5-7 günlük civcivlere bu maddeyi intraperitoneal ve oral yolla vermişlerdir. Lindane civcivlere verildikten belli bir süre sonra periferik kandaki eritrositlerde oluşan MN oranları, kemik iliği hücrelerinde oluşan MN oranları ve CA tespit edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmaların sonucunda Lindane'nin genotoksik bir madde olduğunu tespit etmişler ve yaptıkları testin memeliler üzerinde yapılan testlere alternatif olabileceğini söylemişlerdir. Bhunya ve Jena (1993) yaptıkları bir diğer çalışmada ise Monocrotophos (içinde organik fosfor bulundurur) adı verilen bir insektisit genotoksik etkisini yine aynı yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. Genotoksik etkiyi belirlemek için kemik iliğinde oluşan kromozom anormallikleri ile MN'yi incelemişler ve periferik kanda eritrositlerde oluşan MN oranlarına bakmışlardır. Periferik kanda eritrositlerde MN oluşumuna baktıklarında sonuçların Monocrotophos'un kontrol grubuna göre MN frekansını arttırdığını tespit etmişlerdir. Giri ve ark. (2002) ise Malathion adı verilen organik fosfor içeren bir insektisit genotoksitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar benzer bir yöntem kullanarak yaptıkları deneylerde periferik kan hücrelerinde ve kemik iliği hücrelerinde MN oranlarını incelemişlerdir ve bu maddenin MN oranını önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre bu tarz insektisitler gibi çevresel kirleticilerin genotoksitesini incelemek amacıyla, memeli test sistemlerine göre civcivlerde *in vivo* test sistemlerinin büyük bir alternatif olabileceğini söylemişlerdir (Bhunya ve Jena 1993, Giri ve ark. 2002). Özparlak ve ark. (2011) ticari Fipronil'in olası kronik ve akut genotoksik etkilerini civciv periferik kan hücrelerinde MN test sistemiyle belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla sırasıyla 6.25, 25, 50 ve 100 mg/kg dozlarındaki Fipronil civcivlere intraperitoneal yolla vermişlerdir. Negatif kontrol

olarak distile su, pozitif kontrol olarak siklofosamid kullanmışlardır. Uygulamalardan sonra periferik kan örnekleri alarak frotiler hazırlamış ve modifiye May Grünwald-Giemsa yöntemiyle boyamışlardır. Daha sonra da ışık mikroskopuyla preparatlarda alyuvarlardaki MN ve NA olaralarını belirlemişlerdir. Sonuçlara baktıklarında ise negatif kontrol grubuna kıyasla, Fipronil uygulanan grupların MN ve NA oranlarında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış gözlemlenmemişlerdir ($p>0.05$). Bu sonuçlara bakarak da Fipronil'in ticari formülasyonunun test edilen dozlarda civcivler için genotoksik olmadığını söylemişlerdir.

MN testlerinde (periferik hücre popülasyonlarında), kromozom anormallikleri sayısal ve yapısal olarak dolaylı, kolay ve hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir. Bununla birlikte Wolf ve Luepke (1997), uygun şartlarda kuluçkaya alınan tavuk yumurtalarındaki embriyoların periferik kan eritrositlerindeki MN oluşumunu belirleyerek, HET-MN olarak isimlendirdikleri test sistemini oluşturmuşlardır. Wolf ve ark. (2002) ise bu test sistemini modifiye ederek geliştirmişlerdir. HET-MN olarak adlandırılan test sistemi, genotoksik etkiyi belirlemede oldukça hızlı, basit ve aynı zamanda ucuzdur. Bu yöntemin uygulandığı kuluçka döneminde tavuk embriyosunun henüz beyin aktivesi başlamamıştır fakat yüksek derecede metabolik aktiviteye sahiptir. Bu özelliğinden dolayı bu test sistemi, hayvan kullanılmayan testlere kıyasla daha üstündür. HET-MN'nin *in vitro* testlere daha yakın olduğunun ve bir hayvan deneyi olmadığının düşünülmesi hem etik hem de hayvan hakları açısından makul görülmektedir. Bu testle genotoksitesini belirlenecek olan maddenin, Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (ADME)) aşamaları gibi sistemik bir yoldan geçmesine olanak tanınması ise en büyük avantajı olarak görülmektedir (Reisinger ve ark. 2019, Maul ve ark. 2022, Reisinger ve ark. 2022). HET-MN'nin uygulandığı kuluçka döneminde sinirler korioallantoik membrana temas etmemektedir ve acı reseptörleri henüz oluşmamıştır. Ayrıca embriyonun yumurta içerisindeki yaşam ortamı da fizyolojik şartlara yakındır. Tüm bu özellikler HET-MN'nin *in vitro* testlerden çok daha üstün olduğunu göstermektedir. Tavuk embriyolarının dolaşım sistemindeki kompozisyonu, ergin memelilerin kemik iliği eritrosit hücre kompozisyonuna benzemektedir ve ayrıca periferik kanlarındaki polikromatik eritrosit oranı, farelerde %5 iken kuluçkanın 11. günündeki bir tavuk embriyosunda %25-50'dir. Memelilerde bulunup kuluçkanın 11. günündeki bir tavuk embriyosunda henüz gelişmemiş olan dalak, anormal eritrositleri elemine etmektedir. Kuluçkanın 11. günündeki embriyolarda dalağın henüz gelişmemiş olmasıyla beraber

dolaşımında MN bulunan eritrositler yoğunlaşmaktadır. Böylelikle HET-MN'yle daha kesin sonuçlar elde edilebilmektedir. Bunlar da HET-MN'nin diğer önemli özelliklerindedir. Sonuçların kolaylıkla analiz edilebilmesi için HET-MN bilgisayarlı resim analiz sistemiyle otomatikleştirilebilmektedir (Wolf ve Luepke 1997, Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003).

Wolf ve ark. (2002), HET-MN'ni modifiye etmek için CP ve 7,12-dimethylbenz[α]anthracene'le (DMBA) birlikte birçok deneme yapmışlardır. Test maddelerini yumurtaya iki yöntemle vermişlerdir. Birinci yöntemde test solüsyonlarını yumurtaya kuluçkanın sekizinci, dokuzuncu ve 10. günlerinde hipodermik bir iğne yardımıyla yumurtanın sivri ucundan albümine enjekte ederken ikinci yöntemde ise yumurtanın küt ucunda bulunan hava kamarasının bulunduğu yere bir delik açarak kabuk altı zarının üstüne pipetle vermişlerdir. Test solüsyonları yumurtalara verildikten sonra 24, 48 ve 72 saat boyunca kuluçka işlemini sürdürmüşlerdir. Daha sonra incelenmek amacıyla bu embriyolardan kan örnekleri (arteria umbilicalis sinistradan) almışlar ve frotiler hazırlamışlardır. Hazırladıkları frotileri May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyamışlardır ve ışık mikroskopuyla incelemişlerdir. Yaptıkları incelemeler ve değerlendirmeler sonucunda, hava kamarasına yaptıkları enjeksiyonda albümine yaptıkları enjeksiyona kıyasla daha fazla MN oluşumu gözlemlemişlerdir. Ayrıca kuluçkanın sekizinci gününde enjeksiyon yapıp 11. gününde (72 saat sonra) aldıkları kan örneklerinin, diğer saatlere oranla daha fazla oranda MN içerdiğini gözlemlemişlerdir. Tüm bunlar değerlendirilerek bakıldığında HET-MN için test solüsyonlarının kuluçkanın sekizinci gününde hava kamarasına verilip 11. gününde kan örneklerinin alınması en uygun şartlar olarak belirtilmiştir (Wolf ve ark., 2002).

Wolf ve ark. (2002)'de HET-MN'de, kuluçkanın altıncı ve yedinci günlerinde primitif eritrositlerde (EI) proliferasyon sona erdiğini ve bu nedenle bu hücrelerin mutajenite yönünden, kuluçkanın sekizinci gününde yapılan enjeksiyondan etkilenmeyeceğini ve MN oluşumu gözlenmeyeceğini söylemişlerdir. Yani MN oranına bakıldığında kontrol grubuyla EI hücreleri arasında herhangi bir farklılık olmadığını ve değerlendirmeye alınmadığını belirtmişlerdir. Tüm olgunlaşma evrelerindeki (proeritroblastlar, eritroblastlar, olgun normokromatik eritrositler ve erken-, orta- ve geç-polikromatik eritrositler) hücreleri (sekonder eritrositler (EII)) ise HET-MN'de birer genotoksisite parametresi olarak ele almışlardır. Son zamanlarda Maul ve ark. (2022) ise eritrosit hücrelerini sınıflandırmayı bırakmışlardır ve hücrelerin değerlendirilmesi için yeni bir atlas yayınlamışlardır. Yapılan bu çalışmada MN ve NA

değerlendirmeleri Maul ve ark. (2022)'nin yeni yayınladıkları atlasa göre yapılmıştır. MN ile NA değerlendirmeleri yapılırken incelenen eritrosit hücre kompozisyonları daha önce bu konuda yapılan çalışmalarda incelenen eritrosit hücre kompozisyonlarıyla genel olarak aynıdır (Wolf ve Luepke 1997, Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003, Özparlak 2006, Balta 2017, Çelik ve Özparlak 2019, Maul ve ark. 2022, Reisinger ve ark. 2022).

Wolf ve ark. (2002) HET-MN'yi modifiye etmeyi amaçladıkları çalışmalarında, 100 µl bidistile suda çözünmüş 50 µg/y dozunda CP kullanmışlardır. Belirledikleri bu dozda üç farklı deneme yapmışlardır. Gerçekleştirdikleri çalışmada MN oluşumunu EII hücrelerinde değerlendirmişlerdir. Değerlendirmede sırasıyla %13.2±4.9, %7.3±4.0, %9.3±1.4 oranlarında MN gözlemlemişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada da daha önceki çalışmalarda genotoksitesi belirlenmiş olan CP genotoksik madde olarak kullanılmıştır. Wolf ve ark. (2002)'nin denemelerde yaptıkları gibi 100 µl bidistile suda 50 µg/y CP çözündürülerek test solüsyonu hazırlanmıştır. CP grubunda MN oranı %2.29±0.12 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu MN oranı Wolf ve ark. (2002)'nin MN oranlarından daha yüksektir. Bu durum kullanılan tavuk ırklarının veya hibritlerinin farklı olmasıyla açıklanabilir. Yaptığımız çalışmada CP grubunun kontrol gruplarıyla NA oranları kıyaslandığında, CP grubunun NA oranının MN oranındaki gibi daha yüksek olduğu görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada CA grubuna bakıldığında 100 µl bidistile suda 50 µg/y CP ve 100 µl bidistile suda 50 µg/y C vitamini çözündürülerek ikisi birlikte yumurtalara uygulanmıştır. CA grubunda polikromatik ve normokromatik eritrositlerde oluşan MN'ler değerlendirildiğinde MN oranı 1,52±0,17 olarak hesaplanmıştır. Burada C vitaminin, CP'nin %2.29±0.12 olarak hesaplanan MN oranını 1.52±0.17'ye düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yani antijenotoksik madde olarak kullandığımız C vitamininin doğru bir seçim olduğu görülmüştür.

Müller ve Streffer (1994), herhangi bir uygulamanın yapılmadığı sıçanlarda polikromatik eritrositlerinde doğal olarak meydana gelen NA ve MN'leri gözlemlemişlerdir ve %0-11 oranları arasında MN oluşumu gözlemlemişlerdir. Wolf ve Luepke (1997) ise aynı sistemi kullanmışlardır ve kontrol grubuna 150-200 µl su uygulamışlardır. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre kontrol (su) grubunda total anormallik (toplam MN ve NA oluşumu) oranının %0.0-0.3 arasında farklılık gösterebileceğini söylemişlerdir. Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) ise dömlü tavuk yumurtalarında kontrol grubuna 100 µl su enjekte ederek EII hücrelerinde doğal olarak meydana gelen MN'leri gözlemlemişler ve %0.4-1.3 oranında MN olduğunu

tespit etmişlerdir. Özparlak (2006) ise yaptığı çalışmada herhangi bir işlemin uygulanmadığı dömlü tavuk yumurtalarındaki embriyoların kanında bulunan EII hücrelerinde kendiliğinden meydana gelen %0.16 oranında NA, %0.10 oranında MN ve %0.26 oranında total anormallik olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada her iki kontrol grubuna bakıldığında da MN (%0.00±0.00) oluşumu gözlemlenmezken, çok düşük de olsa doğal olarak meydana gelen NA'lar (%0.01±0.01) gözlemlenmiştir. Aynı zamanda her iki gruptaki total anormallik (%0.01±0.01) oranları da aynıdır. Bu çalışmadan elde edilen veriler yapılan diğer çalışmalardaki oranlara yakın sayılmaktadır.

HET-MN kullanılarak yapılan çalışmalardan bahsedilecek olursa şu şekilde sıralanabilirler. Wolf ve ark. (2003), N-Nitrozodietanol Amin (NDELA), N-Nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-Nitrozodietil Amin (NDEA) adında üç kanserojen maddenin genotoksik etkilerini HET-MN'yle belirlemeye çalışmışlardır. NDEA ve NDMA maddelerinin HET-MN'yle genotoksik etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar HET-MN sonuçlarına göre NDMA'nın genotoksik etkisinin NDEA'nın genotoksik etkisinden daha yüksek olduğunu söylemişlerdir. Bu iki maddenin HET-MN'deki duyarlılığına bakıldığında, daha önce kemirgen MN testleriyle yapılan çalışmaların sonuçlarına göre çok daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. NDELA maddesinin ise HET-MN'de eritrosit oluşumunda herhangi bir olumsuz etkisinin olmamasından dolayı genotoksik bir etkisinin olmadığı söylenmiştir. Wolf ve ark. (2003), HET-MN kullanılarak yapılan deneylerden elde edilen verilerin, yapılan diğer hayvanlar üzerinde yapılan deneylerden elde edilen verileri destekleyebileceğini söylemişlerdir. Bunun nedeni ise HET-MN, *in vitro* testlerle karşılaştırıldığında *in vivo* testlere (fizyolojik olarak) çok daha yakındır ve daha fazla sistemik ve lokal etkilerin izlenmesine imkân sağlamaktadır. Wolf ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada HET-MN'nin, hayvan haklarının koruduğu yöndeki düşüncelerini tekrar dile getirmişlerdir. Daha önce yaptıkları üç çalışma sonucunda elde ettikleri verilerle bu yeni çalışmalarından elde ettikleri verileri karşılaştırdıklarında herhangi bir hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuç olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar genotoksik etkilerin belirlenmesinde HET-MN'nin önemli bir test sistemi olduğunu söylemişlerdir. Wolf ve ark. (2008) HET-MN sistemine göre; Acrylamide (ACM), Acetylaminofluorene (2-AAF), Dipotassium Monochromate (DPC), Cytarabine (AraC), Cadmium Chloride (CD), Methotrexate (MTX) gibi maddelerin genotoksik etki gösterirken, Starch (STRC), Orange G (OG), Azorubin (E122) gibi maddelerin ise genotoksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Wolf ve ark. (2008) HET-MN'yle daha önceki

çalışmalarının sonuçlarını birlikte değerlendirmişlerdir. Genotoksik madde grubunda (0.05 mg/y CP) (223 yumurtadan 249250 eritrositte) %12.4±6.8 oranında MN gözlemlerken, kontrol grubunda ise (445 yumurtadan 556500 eritrositte) %0.87±0.87 oranında MN gözlemlenmiştir. Yaptıkları bu çalışmada ise yine aynı genotoksik madde grubunda çoğunlukla yaklaşık aynı değerleri tespit etmişlerdir. Greywe ve ark. (2012), birçok bileşiğin genotoksik etkisini iki ayrı laboratuvarında (Osnabrueck Üniversitesi ve Henkel AG&Co) HET-MN'yle incelemişlerdir ve sonuçların her iki laboratuvarında da aynı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca HET-MN sonucunda elde ettikleri verilerin *in vitro* ve *in vivo* testlerin sonucunda elde ettikleri verilerle yaklaşık olarak aynı olduklarını söylemişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak HET-MN'nin diğer genotoksisite testlerine yardımcı olabileceğini vurgulamışlardır. Hothorn ve ark. (2013) ise HET-MN için Williams modelini önermişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda, daha önceki çalışmalarda kullanılan her bir doz grubu için altı tane dömlü yumurta kullanılmasının ve bu yumurtaların her birinde 1000 hücrenin değerlendirilmesinin yeterli olacağını söylemişlerdir. Kluge ve ark. (2016) atmosferik basınçlı soğuk argon plazma jetinin (kINPen MED) ve önceki modelinin (kINPen 09) mutajenik risklerini HET-MN'yle değerlendirmişlerdir. Her iki plazma kaynağı için de 10 dakikalık en uzun plazma maruziyet süresinde embriyoların ölüm oranı %40'ı geçtiğini gözlemlenmiştir ancak herhangi bir genotoksik etki tespit etmemişlerdir. Yumurtanın kan plazmasındaki antioksidan potansiyelinde, soğuk plazmaya maruz kaldıktan hemen sonra veya bir saat sonra önemli ölçüde bir azalma olmadığını gözlemlenmiştir. Çalışmada denenen kINPen MED'le en uzun plazma tedavi süresi, kliniklerde kronik yaraların tedavisi için önerilen sınırın 5-10 kat üzerindedir. Araştırmacılar kINPen 09 veya kINPen MED kullanarak herhangi bir plazma tedavi süresi için mutajenik etki olmadığını söylemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler, bu argon plazma jetlerinin veterinerlikte veya klinikte uygulanmasının genotoksik bir etkisinin olmadığını doğrulamaktadır. Özparlak ve ark. (2018), genotoksisite çalışmalarının çoğunda genotoksik madde olarak kullanılan CP (50 µg/y) ve antigenotoksik madde olarak kullanılan C vitamini'nin (50 µg/y) tavuk embriyoları üzerindeki etkilerini HET-MN'yle belirlemeyi amaçlamışlardır. Kontrol (su), CP, C vitamini ve CP+C vitamini olarak dört grup oluşturmuşlardır ve çalışmayı çift tekrarlı olarak yapmışlardır. Test bileşiklerini kuluçkanın sekizinci gününde dömlü tavuk yumurtalarına uygulamışlardır. Kuluçkanın 11. gününde de embriyoları inceleyerek her bir grubun malformasyon tiplerini, anormal embriyo oranlarını, ölü

embriyo oranlarını, canlılık oranlarını ve rölatif embriyo oranlarını belirlemişlerdir. Ayrıca embriyoları Alizarin Red-S yöntemiyle boyayarak kemik gelişimlerini belirlenmiştir. Çift tekrarlı olarak gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda iki denemeden elde ettikleri sonuçların birbiriyle uyumlu olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda, bileşiklerin (test ettikleri dozlarda) hiçbir grupta önemli düzeyde bir teratojenik veya embriyotoksik etki göstermediğini ve Alizarin Red-S yöntemiyle boyanan embriyoların kemik gelişimlerinin makroskobik düzeyde etkilenmediğini tespit etmişlerdir. Çelik ve Özparlak (2019), doğada yetişen *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın sulu ekstraktının genotoksik ve antigenotoksik etkisini HET-MN'yle incelemişlerdir. Kuluçkanın sekizinci gününde döllu tavuk yumurtalarına üç farklı dozda *G.lucidum*'un sulu ekstraktı, antigenotoksik madde olarak C vitamini (50 µg/y) ve genotoksik madde olarak CP (50 µg/y) ayrı ayrı ve birlikte uygulamışlardır. Kuluçkanın 11. gününde embriyolardan periferik kan alarak frotiler hazırlamış ve modifiye May-Grünwald Giemsa metoduyla boyamışlardır. Daha sonra da eritrosit hücrelerindeki (EII hücrelerindeki) MN ve NA oranlarını ışık mikroskobu kullanarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri verilere göre *G. lucidum*'un sulu ekstraktının herhangi bir genotoksik etki göstermediğini hatta genotoksik etkiyi azaltarak antigenotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Langhasa ve ark. (2022), Bisfenol A (BPA)'nın genotoksik ve sitotoksik etkisini HET-MN ve Comet testiyle değerlendirmeyi amaçlamışlardır. BPA'nın artan konsantrasyonlardaki (1, 10, 20, 30, 40 ve 50 mM/yumurta) dozlarını kuluçkanın sekizinci, dokuzuncu ve 10. günlerinde döllu tavuk yumurtalarına uygulamışlardır. Deneyde döllu tavuk yumurtaları BPA maddesine 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman diliminde maruz bırakılmıştır. Araştırmacılar yaptıkları deneyler sonucunda, BPA'nın verilen dozuna ve zaman dilimine bağlı olarak artan bir ölüm oranı gözlemlemişlerdir. Ayrıca MN ve NA oranlarında da önemli düzeyde bir artış gözlemlemişlerdir. Böylece araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda, BPA'nın genotoksik ve sitotoksik etki gösterdiği doğrulamışlardır. Reisinger ve ark. (2019), Maul ve ark. (2022) ve Reisinger ve ark. (2022) klasik *in vitro* genotoksisite testlerinin, genotoksisiteyi göstermede hassas olduğunu ve bununla birlikte üç farklı test sonucu birleştirildiğinde ise yüksek oranda hatalı pozitif sonuçlar elde edildiğini söylemişlerdir. Bu sebeple bunlar göze alındığında, son yıllarda yapılan çalışmalarda Reisinger ve ark. (2019), Maul ve ark. (2022), Reisinger ve ark. (2022) HET-MN'nin bir hayvan deneyi olarak kabul edilmeksizin test edilecek maddelerin ADME gibi sistemik bir ortamda test edilmesine

imkan sağladığını vurgulamışlardır. Bu araştırmacılar HET-MN'nin, klasik *in vitro* testlerden elde edilen pozitif bulguları kontrol etmek için kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Reisinger ve ark. (2022) HET-MN'yle 30'dan fazla kimyasal maddeyi üç farklı laboratuvarında çift tekrarlı test etmişler ve %91 gibi yüksek bir doğruluk oranıyla HET-MN'nin özgüllük ve duyarlılık oranlarını sırasıyla %98 ve %84 olarak hesaplamışlardır. Maul ve ark. (2022)'da HET-MN için ilk doğrulama çalışmasını gerçekleştirerek bu test hakkında daha fazla ayrıntı sunmuşlardır. Yayınlarına kan hücrelerindeki mikroskobik analiz için renkli bir atlasta eklemişlerdir. Ayrıca test bileşiklerinin bu test sisteminde izlediği yolu vurgulamışlardır; test bileşiklerinin yumurta zarını geçtiği, alttaki korioallantoik membrana ait kan damarlarından alındığını, kan dolaşımıyla dağıtıldığını, gelişmekte olan karaciğer ve vitelus kesesinde metabolize edildiği ve son olarak embriyoların idrar kesesine karşılık gelen allantoise test bileşiklerinin metabolik atıklarının atıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca diğer genotoksisite testleri için ilgi çekici bir istatistiksel model olan Umbrella-Williams testiyle HET-MN'nin birleştirilebileceğini söylemişlerdir. HET-MN kullanılarak yapılan tüm bu çalışmalara bakıldığında, genotoksisitesi belirlenecek olan ksenobiyotiklerin metabolik aktivasyonuna olanak tanıyan, NA'ların da değerlendirilebildiği, etik ve hayvan hakları açısından uygun, hızlı, basit ve ucuz bir test sistemi olarak HET-MN, tek başına alternatif olamasa da memeli hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda deneme ve hayvan sayısını azaltacağından dolayı büyük bir önem kazanmaktadır.

Propolisin genotoksik etkileriyle ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Özkul ve ark. (2005), insan lenfositlerinde *in vitro* olarak propolisin antikarsinojenik etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla propolisin farklı konsantrasyonlarını (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 and 1.0 ml) test etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonuçlarına göre MN oranları ortalama 1.47 ± 0.38 ile 4.02 ± 0.64 arasında hesaplanırken MI oranları 19.45 ± 2.22 ile 0.28 ± 0.33 arasında hesaplanmıştır. Propolis konsantrasyonlarından oluşan gruplar ile kontrol grubu arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Araştırmacılar farklı konsantrasyonlardaki propolisin, periferik insan lenfositlerinde kanserojen bir etki oluşturmadığı sonucuna varmışlardır. Ancak artan MN oranları, propolisin yüksek konsantrasyonlarda kanserojen etkili olabileceğini göstermiştir. Tavares ve ark. (2006), Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde Brezilya yeşil propolisinin genotoksisitesini belirlemeyi amaçlamışlardır ve MI ile kromozom aberasyon frekansı gibi parametreleri

değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar sonuçları değerlendirdiklerinde, uygulanan en yüksek propolis dozunun kromozom aberasyon frekansında az fakat önemli derecede bir artış gösterdiğini, ancak uygulanan en düşük propolis dozunun kromozom hasarını önemli derecede azalttığını söylemişlerdir. Bu değerlendirmelere göre propolisin yüksek dozlarda genotoksik etki gösterirken düşük dozlarda antigenotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Özkul ve ark. (2006), SCE yöntemiyle Bursa propolisinin insan lenfositleri (*in vitro*) üzerindeki genotoksik etkisini araştırmışlardır. On sağlıklı (beş erkek ve beş kadın), alkol kullanmayan ve sigara içmeyen gönüllüden kan alarak inkübe etmişlerdir ve bu kan örneklerini propolisin artan konsantrasyonlarına (5, 25, 50 ve 250 mg/ml) maruz bırakmışlardır. Yapılan deneyler sonucunda SCE oranlarını ortalama olarak $10.398 \pm 1.47 - 21.522 \pm 2.08$ hesaplamışlardır. Kontrol grubu ile propolisin artan konsantrasyonlarını oluşturan gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Sonuçlara bakıldığında ise artan SCE oranları, Bursa propolisinin yüksek dozlarda genotoksik etki gösterebileceğini doğrulamıştır. Pereira ve ark. (2008) Brezilya yeşil propolisinin mutajenitesiyle (*in vivo*) ilgili veri eksikliğini göz önüne alarak bu ürünün genotoksitesini farelerin periferik kan hücrelerinde Comet ve MN yöntemlerini kullanarak test etmişlerdir. Test dozlarını (1000, 1500 ve 2000 mg/kg) sondayla farelere vermişlerdir. MN ve Comet testleri, Brezilya yeşil propolisinin kan hücrelerinde genotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri sonuçlara göre Brezilya yeşil propolisinin akut tüketiminin, farelerin periferik kan hücrelerinde mutajenik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Senedese ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinde (*in vitro*) kromozomal anormallik analizi ve Wistar sıçanlarında (*in vivo*) MN testiyle, yanıkların tedavisinde kullanılan yeşil propolis ekstraktıyla (%1.2, 2.4 ve %3.6) takviye edilmiş topikal formülasyonların olası mutajenik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Yanık tedavisi için kullanılan farklı konsantrasyonlarda yeşil propolis içeren topikal formülasyonların, her iki test sisteminde de mutajenik etkisinin olmadığını ancak *in vitro* testte %3.6 propolis jelinin sitotoksik olduğunu görmüşlerdir. Montoro ve ark. (2012) etanollü propolis ekstraktının artan konsantrasyonlarda *in vitro* olarak ($0-2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) insan lenfositleri üzerindeki genetik hasarı değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar propolisin yüksek konsantrasyonlarda MI ve Proliferasyon İndeksini (PI) önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. SCE oranları ise propolisin yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etkiye sahip olabileceğini göstermiştir. Hücrelerin çözücü olarak kullanılan etanole

maruz bırakılması MI'yı, hücre proliferasyon kinetiğini ve SCE oranını hiçbir şekilde değiştirmemiştir. Araştırmacılar yaptıkları değerlendirmeler sonucunda propolisin yüksek konsantrasyonlarda *in vitro* olarak insan periferik lenfositleri için sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu düşüncesine varmışlardır. Bayram ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada propolisin (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1,0 mg/petri) genotoksik ve antigenotoksik etkisini, Ames/*Salmonella* ve *E.coli* WP2 kısa süreli test sistemiyle belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmacıların canlılık testinden elde ettikleri sonuçlara göre propolis, 1.0 mg/petri'den daha yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksikken daha düşük konsantrasyonlarda herhangi bir toksisitesi yoktur. Genotoksisite testi sonuçlarına göre ise 1.0 mg/petri'ye kadar propolis konsantrasyonu *Salmonella typhimurium* TA1535, 1537 ve *E.coli* WP2uvrA suşları üzerinde herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir. Antigenotoksisite testi sonuçlarına göre ise propolisin aynı suşlar üzerinde NaN₃, 9-AA ve MNNG'yle indüklenen mutajeniteye karşı önemli ölçüde antigenotoksik etki göstermiştir. Cruz ve ark. (2016) çalışmalarında Portekiz propolisinin etanollü ekstraktının antioksidan etkisi ve çift doza bağlı genotoksik ve antigenotoksik etkilerini Comet testiyle belirlemeyi amaçlamışlardır. Comet testiyle elde ettikleri sonuçlar, propolisin daha düşük konsantrasyonlarda antigenotoksik olduğunu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise genotoksik olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar propolisin genotoksik etkisinin yüksek konsantrasyonlardaki sitotoksisitesiyle ilişkili olduğu söylemişlerdir. Diklorofloresinle akış sitometrisi analizinde ise propolisin *in vivo* hücre içi antioksidan aktiviteyi indüklediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar genel olarak sonuçları değerlendirdiklerinde propolisin antigenotoksik olduğunu fakat daha yüksek konsantrasyonlarda ise toksik olduğunu belirtmişlerdir. Bu ikili etkinin ise kaempferol, pinobanksin ve pinocembrin gibi antioksidan bileşiklerle birlikte kafeik asit fenil ester (CAPE) ve krisin gibi DNA sentezini ve hücre çoğalmasını engelleyen bileşiklerin varlığıyla ilişkili olduğunu söylemişlerdir.

Janus yolu, bazı bileşiklerin hücrelerde biri pozitif diğeri negatif olmak üzere ikili etki gösterdikleri bir tür cevap verme yöntemidir. Örneğin bazı bileşikler janus yolunda sergiledikleri cevaplarla genotoksik etki gösterirken koşullar değiştirildiğinde antigenotoksik etki gösterebilmektedir. Birçok kimyasalın bir doku tipinde genotoksik etki gösterirken başka bir doku tipinde antigenotoksik etki gösterebileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Janus yolunda bileşiklerin gösterdikleri ikili etkiler ise farklı hücre çeşitlerine, hücrelerin maruz bırakıldığı test edilecek madde dozlarına ve

hücrelerin test maddesine maruz bırakıldığı süreye göre değişebilmektedir. Propolisin yapısındaki çoğu flavonoid ise janus yolunda ikili etki gösteren bileşiklerdir (Lin ve ark. 2014, Yıldız ve Ünal 2022).

Bozkuş ve ark. (2021) Türkiye'nin dört farklı bölgesinden topladıkları ham propolisden ürettikleri su bazlı organik Türk propolisi ürününün içeriğini HPLC-DAD'la analiz ettiklerinde 10.20 µl/mg konsantrasyonunda klorojenik asit, 204.00 µl/mg konsantrasyonunda kafeik asit, 7.75 µl/mg konsantrasyonunda 3,4,5-tri-O-kafeoilkuinik asit ve 28.90 µl/mg konsantrasyonunda Trans-sinamik asit tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerden kafeik asit yüksek dozlarda genotoksik etki gösterdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bhalli ve ark. 2019). Yani su bazlı organik Türk propolisi CP'yle birlikte uygulandığında sinerjik etki göstererek yüksek dozda CP'nin genotoksitesini artırırken düşük dozda CP'nin genotoksitesini azaltarak antigenotoksik etki göstermesi, yapısında yüksek konsantrasyonda bulunan kafeik asitin janus yolunda sergilediği cevaplarla ilişkili olabilir.

Fikri ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada gebelikte propolis uygulamasının fetal gelişim üzerine etkisini incelemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla gebe fareleri, kontrol, propolisin sulu ekstraktının düşük ile yüksek dozu ve propolisin etanollü ekstraktının düşük ile yüksek dozu olmak üzere beş gruba ayırmışlardır. Propolisin dozlarını farelere gebeliğin 18. gününde uygulamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda propolisin etanollü ve sulu ekstraktlarının düşük dozda fetal gelişimi engellemezken yüksek dozlarda fetüslerin ağırlıklarını önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda kullandığımız su bazlı organik Türk propolisi de embriyoların ağırlıklarında azalmaya sebep olmuştur. Bunlara ek olarak araştırmacılar iskelet gelişimini incelemek için fetüslerin kemiklerini Alizarin Red-S'le boyamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışma sonucunda ise propolisin etanollü ekstraktının yüksek dozunun kemiklerin kalınlığını önemli ölçüde azaltırken propolisin sulu ekstraktının yüksek dozunun orta düzeyde azalmaya sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan su bazlı organik Türk propolisi ise tavuk embriyolarının iskelet gelişimi üzerinde makroskobik olarak olumsuz bir etki göstermemiştir. Araştırmacılar yaptıkları tüm bu çalışmalar sonucunda propolisin düşük dozunun hamilelik sırasında tüketiminin nispeten güvenli olduğunu rapor etmişlerdir.

Liu ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada kafeik asidin farelerde üreme ve gelişimsel toksisite üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu doğrultuda araştırmacılar hamile farelere gavaj yoluyla 0.15, 5 ve 150 mg/kg/gün dozlarında kafeik asit vermişlerdir. Bu

uygulamalar sonucunda 5 mg/kg/gün ve 150 mg/kg/gün dozlarında verilen kafeik asitin gebeliğin altıncı gününden önce uygulandığında embriyoların implantasyonunu etkilediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca 150 mg/kg/gün dozunda verilen kafeik asitin fetal kilo alımını azalttığını gözlemlemişlerdir. Yavru gelişimi üzerinde hiçbir maternal toksisite, fetal teratogenez veya doğum sonrası etki gözlenmemiştir. Bu koşullar altında hamile fareler için gözlemlenmeyen yan etki düzeyi sadece 0.15 mg/kg/gün dozu olmuştur. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da kullandığımız su bazlı organik Türk propolisi embriyo ağırlığını azaltmıştır fakat teratojenik ve embriyotoksik bir etki göstermemiştir. Bunun sebebi ise Bozkuş ve ark. (2021)'nin rapor ettiği su bazlı organik Türk propolisi içerisinde bulunan yüksek konsantrasyondaki kafeik asitin (204.00 µl/mg) varlığından da kaynaklı olabilir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

HET-MN sonuçlarına göre su bazlı organik Türk propolis test edilen üç dozda da (500, 250, 50 µg/y) genotoksik bir etki göstermemiştir.

Antigenotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yüksek dozdaki propolis (500 µg/y) CP'yle birlikte uygulandığında sinerjik etki gösterip CP'nin etkisini arttırmıştır. Ortanca dozdaki propolis (250 µg/y) CP'yle birlikte uygulandığında CP'nin etkisini azaltmıştır. Düşük dozdaki propolis (50 µg/y) CP'yle birlikte uygulandığında ise CP'nin etkisini istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltıp antigenotoksik etki göstermiştir.

Su bazlı organik Türk propolisinin tavuk embriyoları üzerindeki teratojenik ve embriyotoksik etkileri ele alındığında, propolis grupları kontrol grubuyla kıyaslandığında canlı embriyo ağırlıkları ve rölatif embriyo ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Embriyolarda ölüm gözlenmediği için propolisle ilgili herhangi bir embriyotoksik etki söz konusu değildir.

5.2. Öneriler

CP, alkilleyici bir antineoplastik ilaç olarak kanser hastalarını tedavi ederken kemoterapi aşamasında kullanılmaktadır ancak bu madde karsinojenite, mutajenite, teratojenite gibi toksik etkilere de sahiptir. Yaptığımız HET-MN çalışmasında ise su bazlı organik Türk propolisinin yüksek dozu CP'yle sinerjik etki göstermiştir. Bu sebeple propolis, kemoterapi gören hastalarda vücut direncini arttırmak ve vücut fonksiyonlarını desteklemek gibi amaçlarla kullanılırken daha dikkatli olunmalıdır.

Bazı bileşikler hasarı hem indükleyebilmektedir hem de önleyebilmektedir. Bu nedenle kanser gibi hastalıkları engellemek amacıyla propolis kullanılacaksa ilk önce kullanılacak propolisin hangi koşullar altında sağlığı desteklediğinin ve genom hasarını önlediğinin bilinmesi gerekir. Doğal ürünlerin bile bilinçli kullanılması gerekir.

Su bazlı organik Türk propolisinin içerisinde yüksek konsantrasyonda kafeik asitin bulunmasından ve kafeik asitin canlı embriyo ağırlıklarını azaltmasından dolayı propolisin hamilelerde kullanılmasına dikkat edilmeli, doktor kontrolünde kullanılmalı hatta kullanılmaması gerekmektedir. Ayrıca propolisin fetal gelişim üzerine olan etkileri

göz önüne alındığında düşük dozlarının kullanımının nispeten güvenilir olduğuna, yüksek dozlarının kullanımının ise dikkat gerektirdiği anlaşılmaktadır.

Propolisin istenmeyen zararlı etkilerinden kaçınmak için içerisinde propolis bulunan ek gıda ve tıbbi ürünlerin dikkatli bir şekilde formüle edilmesi ve bu ürünlerin biyolojik olarak incelenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada HET-MN'yle su bazlı organik Türk propolisinin üç farklı dozu test edilebilmiştir. Etkilerinin daha iyi anlaşılması için başka test yöntemleriyle farklı dozlarının test edilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abd EAYM, Abu Almaaty AH, Omar NA, Abdeen AM, ve Zakaria MM (2019). Evaluation of protective effects of propolis against aluminium silicate toxicity in rats. *Genetika* **51**:299-312.
- Abdellatif MM, Elakkad YE, Elwakeel AA, Allam RM, ve Mousa MR (2021). Formulation and characterization of propolis and tea tree oil nanoemulsion loaded with clindamycin hydrochloride for wound healing: *In vitro* and *in vivo* wound healing assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal* **29**:1238-1249.
- Acun S, ve Gül H (2020). Fonksiyonel bir ürün olan propolisin sağlık üzerine etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi* **20**:189-208.
- Adıgüzel SK, ve Çavaş T (2017). Trifluralin, treflan ve etil metan sülfonatın *Oreochromis niloticus*' ta oluşturduğu genotoksik hasar üzerine askorbik asitin antigenotoksik etkisi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* **6**:10-19.
- Afata TN, Nemo R, Ishete N, Terefe G, ve Dekebo A (2022). Phytochemical investigation, physicochemical characterization, and antimicrobial activities of ethiopian propolis. *Arabian Journal of Chemistry* **15**:103931.
- Ahlmann M, ve Hempel G (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: Implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **78**:661-671.
- Ahmad MS, ve Afzal M (2004). Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* **149**:107-115.
- Albayrak S, ve Albayrak S (2008). Propolis: Doğal antimikrobiyal madde. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* **37**:201-215.
- Aldemir O, ve Memmedov H (2019). Propolisin bileşenlerinden olan kafeik asit fenil esterinin antiinflamatuar etkileri. *Arıcılık Araştırma Dergisi* **11**:43-47.
- Aliyazıcıoğlu Y, Demir S, Turan I, Çakıroğlu TN, Akalın I, Değer O, ve Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica* **62**:388-396.
- Almuhayawi MS (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi journal of biological sciences* **27**:3079.
- Ames BN (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* **221**:1256-1264.
- Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, ve Ghramh HA (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi journal of biological sciences* **26**:1695-1703.
- Arias E (1996). Effects of the phenoxy herbicide MCPA on SCE frequency and cell kinetics in developing chick embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **33**:25-29.
- Arias E (2003). Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**:338-343.
- Ashby J (1985). Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the international programme on chemical safety's collaborative study on *in vitro* assays. Elsevier, 752 p.

- Atlı Şekeroğlu Z, ve Şekeroğlu V (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi* **4**:221-229.
- Ayhancı A, Uyar R, Aral E, Kabadere S, ve Appak S (2008). Protective effect of zinc on cyclophosphamide-induced hematoxicity and urotoxicity. *Biological Trace Element Research* **126**:186-193.
- Azarshinfam N, Tanomand A, Soltanzadeh H, ve Rad FA (2021). Evaluation of anticancer effects of propolis extract with or without combination with layered double hydroxide nanoparticles on Bcl-2 and Bax genes expression in HT-29 cell lines. *Gene Reports* **23**:101031.
- Bakkaloğlu Z, ve Arıcı M (2019). Farklı çözücülerle propolis ekstraksiyonunun toplam fenolik içeriği, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri. *Akademik Gıda* **17**:538-545.
- Bakou K, Stephanou G, Andrianopoulos C, ve Demopoulos N (2002). Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes from two age groups of women. *Mutagenesis* **17**:233-239.
- Baldrick P (2021). Genotoxicity test battery an assessment of its utility in early drug development. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **868-869**:503388.
- Balta D (2017). Kültür *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın genotoksik antigenotoksik etkilerinin tavuk yumurtası mikronükleus testiyle belirlenmesi. Yüksek Lisans, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Bartkova J, Hořejší Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, ve Lukas C (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**:864-870.
- Bayram NE, Karadayı M, Güllüce M, Bayram S, Sorkun K, Öz GC, Aydoğan MN, Koç TY, Alaylar B, ve Salih B (2015). Genotoxic and antigenotoxic evaluation of propolis by using *in vitro* bacterial assay systems. *Mellifera* **15**:29-36.
- Bayram S, Bayram NE, Gerçek YC, ve Sorkun K (2016). Anticytotoxic and antimutagenic effects of propolis on human lymphocytes *in vitro*. *Mellifera* **16**:38-46.
- Benkovic V, Horvat Knežević A, Đikić D, Lisičić D, Oršolić N, Bašić I, ve Kopjar N (2009a). Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* **60**:129-138.
- Benkovic V, Knezevic AH, Dikic D, Lisicic D, Orsolice N, Basic I, Kosalec I, ve Kopjar N (2008). Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine* **15**:851-858.
- Benkovic V, Knezevic AH, Orsolice N, Basic I, Ramic S, Viculin T, Knezevic F, ve Kopjar N (2009b). Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents: *In vitro* study on human white blood cells. *Phytotherapy Research* **23**:1159-1168.
- Benković V, Kopjar N, Knežević AH, Đikić D, Bašić I, Ramić S, Viculin T, Knežević F, ve Orolić N (2008). Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells *in vitro*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**:1778-1785.
- Bhalli JA, Neft R, Noteboom J, Tebbe CC, Chan M, Kuhn K, Pearce G, Jordan L, ve Beevers C (2019). Caffeic acid genotoxicity: Correlation of the pig-a assay with regulatory genetic toxicology *in vivo* endpoints. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **60**:837-844.

- Bhunya S, ve Jena G (1992). Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (γ -BHC): An *in vivo* study in chicks. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **272**:175-181.
- Bhunya S, ve Jena G (1993). Studies on the genotoxicity of monocrotophos, an organophosphate insecticide, in the chick *in vivo* test system. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **292**:231-239.
- Block G (1991). Vitamin C and cancer prevention: The epidemiologic evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition* **53**:2705-2825.
- Blom JM, Tamarkin L, Shiber JR, ve Nelson RJ (1995). Learned immunosuppression is associated with an increased risk of chemically-induced tumors. *Neuroimmunomodulation* **2**:92-99.
- Boller K, ve Schmid W (1970). Chemische mutagenese beim säuger. Das knochenmark des Chinesischen hamsters als *in vivo*-testsystem. Hämatologische befunde nach behandlung mit trenimon. *Humangenetik* **11**:35-54.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Yp, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch Volders M, Zeiger E, ve Ban S (2001). Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **37**:31-45.
- Bouchelaghem S (2021). Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* **29**:1936-1946.
- Bozkuş TN, Değer O, ve Yaşar A (2021). Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **44**:77-86.
- Bramwell VH, Mouridsen H, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Verwey J, Dombernowsky P, Onsrud M, Thomas D, ve Sylvester R (1987). Cyclophosphamide versus ifosfamide: Final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **23**:311-321.
- Brown LP, Flint OP, Orton TC, ve Gibson GG (1986). Chemical teratogenesis: Testing methods and the role of metabolism. *Drug Metabolism Reviews* **17**:221-260.
- Budai, P., Fejes, S., Várnagy, L., Somlyay, I. ve Takács, I., 2001, Teratogenicity test of dimethoate containing insecticide formulation and heavy elements (Cu, Cd) in chicken embryos after administration as single compounds or in combination, *Mededelingen (Rijksuniversiteit Te Gent. Fakulteit Van De Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 66 (2b), 885-889.
- Budai, P., Fejes, S., Varnagy, L., Szabo, R. ve Keserü, M., 2002, Embryonic toxicity of a dimethoate containing insecticide formulation and Cu-sulphate in chicken after individual or combined administration, *Mededelingen (Rijksuniversiteit Te Gent. Fakulteit Van De Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 67 (2), 99-103.
- Büyüknacar HS, Kumcu EK, Göçmen C, ve Önder S (2008). Effect of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *European Journal of Pharmacology* **586**:293-299.
- Byers T, ve Perry G (1992). Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annual Review of Nutrition* **12**:139-159.

- Campoccia D, Ravaioli S, Santi S, Mariani V, Santarcangelo C, De Filippis A, Montanaro L, Arciola CR, ve Daglia M (2021). Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: *In vitro* cytotoxicity toward cancer and normal cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **141**:111895.
- Canedo A, de Jesus LWO, Bailão EFLC, ve Rocha TL (2021). Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution* **290**:118019.
- Catalán J, Falck GC-M, ve Norppa H (2000). The X chromosome frequently lags behind in female lymphocyte anaphase. *The American Journal of Human Genetics* **66**:687-691.
- Cavallasca JA, Costa CA, Maliandi Mdel R, Contini LE, Fernandez de Carrera E, ve Musuruana JL (2015). Severe infections in patients with autoimmune diseases treated with cyclophosphamide. *Reumatol Clin* **11**:221-223.
- Chang TK, ve Waxman DJ (1993). Cyclophosphamide modulates rat hepatic cytochrome P450 2C11 and steroid 5 α -reductase activity and messenger RNA levels through the combined action of acrolein and phosphoramidate mustard. *Cancer Research* **53**:2490-2497.
- Chatelanat O, Van Delden C, Adler D, Guerne P-A, Nendaz M, ve Serratrice J (2018). Risk factors and prophylaxis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-negative patients. *Revue Medicale Suisse* **14**:1829-1833.
- Cimini D, Fioravanti D, Salmon E, ve Degrossi F (2002). Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells. *Journal of Cell Science* **115**:507-515.
- Cole R, Taylor N, Cole J, ve Arlett C (1979). Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *Nature* **277**:317-318.
- Collins AR (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* **26**:249-261.
- Colvin OM (1999). An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr Pharm Des* **5**:555-560.
- Conte FL, Pereira AC, Brites G, Ferreira I, Silva AC, Sebastiao AI, Matos P, Pereira C, Batista MT, Sforcin JM, ve Cruz MT (2022). Exploring the antioxidant, anti-inflammatory and antiallergic potential of Brazilian propolis in monocytes. *Phytomedicine Plus* **2**:100231.
- Countryman PI, ve Heddle JA (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **41**:321-332.
- Cruz JPP, Dos Santos NCN, Pithon MM, ve Cerqueira EdMM (2021). Biomonitoring of children and adolescents using orthodontic appliances made of acrylic resins through micronucleus testing of exfoliated buccal and palatal mucosa cells. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **160**:193-199.
- Cruz M, Antunes P, Paulo L, Ferreira A, Cunha A, Almeida Aguiar C, ve Oliveira R (2016). Antioxidant and dual dose-dependent antigenotoxic and genotoxic properties of an ethanol extract of propolis. *RSC Advances* **6**:49806-49816.
- Cui J, Duan X, Ke L, Pan X, Liu J, Song X, Ma W, Zhang W, Liu Y, ve Fan Y (2021). Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review. *Fitoterapia* **157**:105106.
- Çalışkol MM (2013). Azerbaycan yöresine ait propolis örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Çavaş T, ve Könen S (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* **22**:263-268.
- Çelemlı ÖG, Temizer İK, Gölşan Z, ve Sorkun K (2016). *Castanea sativa*; A source of Turkish propolis: Plant anatomy, palynology and chemistry. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* **44**:7-14.
- Çelik B, ve Özparlak H (2019). Determination of genotoxic and antigenotoxic effects of wild-grown Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) using the hen's egg test for analysis of micronucleus induction. *Biotechnic & Histochemistry* **94**:628-636.
- Çelik I, Oğuz H, Demet O, Boydak M, Dönmez H, Sur E, ve Nizamlıoğlu F (2000). Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *British Poultry Science* **41**:401-409.
- Çelik K, Demir E, Baytekin H, Yılmaz M, Kroll B, Palkova Z, Dautarte A, Slupczynska M, Kalmış H, Çelik H, Çömez Yİ, Saran MS, ve Özcan MA (2017). Apiterapi el kitabı, Ankara.
- Dan DC, Fischer R, Adler S, Förger F, ve Villiger P (2014). Cyclophosphamide: As bad as its reputation? Long-term single centre experience of cyclophosphamide side effects in the treatment of systemic autoimmune diseases. *Swiss Medical Weekly* **144**:14030.
- Davies, W. J. ve Freeman, S. J., 1995, Chick embryotoxicity screening test (CHEST I and II), *In Vitro Toxicity Testing Protocols*, 307-310.
- De Lima ROA, Bazo AP, Said RA, Sforcin JM, Bankova V, Darros BR, ve Salvadori DM (2005). Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **45**:8-16.
- De Oliveira Sartori AG, Cesar ASM, Woitowicz FCG, Saliba ASMC, Ikegaki M, Rosalen PL, Coutinho LL, ve de Alencar SM (2022). Plant genetic diversity by DNA barcoding to investigate propolis origin. *Phytochemistry* **200**:113226.
- Demir S (2010a). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması, Trabzon.
- Demir S (2010b). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Doğan N, ve Hayoğlu İ (2012). Propolis ve kullanım alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* **16**:39-48.
- Dornelas CA, Cavalcanti BC, Magalhães HIF, Jamacaru FVF, Furtado FNN, Juanes CdC, Melo NdOR, ve Moraes MOd (2014). Potential chemoprotective effects of green propolis, L-lysine and celecoxib on bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Wistar rats subjected to bladder chemical carcinogenesis. *Acta Cirurgica Brasileira* **29**:423-428.
- Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, ve Evers BM (1997). Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* **122**:927-935.
- Emadi A, Jones RJ, ve Brodsky RA (2009). Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* **6**:638-647.
- Enzel Y, Ely LL, Mishra S, Ramesh R, Amit R, Lazar B, Rajaguru S, Baker V, ve Sandler A (1999). High-resolution holocene environmental changes in the thar desert, northwestern India. *Science* **284**:125-128.

- Ertürk Ö, ve Güler N (2013). Halk ilaçlarında propolisin tarihi kullanımı ile onun biyolojik aktivitesi ve kimyasal kompozisyonu. *Uludağ Arıcılık Dergisi* **13**:33-40.
- Evans HJ, Neary GJ, ve Williamson FS (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on vicia faba roots and the effect of oxygen. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* **1**:216-229.
- Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD, ve Gangai MP (1979). The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *The Journal of Urology* **122**:163-164.
- Falck GC-M, Catalán J, ve Norppa H (2002). Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutagenesis* **17**:111-117.
- Fejes S, Budai P, Várnagy L, Molnar T, Szabo R, ve Fancsi T (2002). Toxicity of a mancozeb containing fungicide formulation and CU-sulphate to chicken embryos after administration as single compounds or in combination. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakuliteit Van De Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen)* **67**:105-109.
- Fenech M (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **455**:81-95.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, ve Zeiger E (2003). Human project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **534**:65-75.
- Fenech M, ve Morley AA (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **147**:29-36.
- Fikri AM, Sulaeman A, Handharyani E, Marliyati SA, ve Fahrudin M (2019). The effect of propolis administration on fetal development. *Heliyon* **5**:02672.
- Fischer AH, Zhao C, Li QK, Gustafson KS, Eltoum IE, Tambouret R, Benstein B, Savaloja LC, ve Kulesza P (2010). The cytologic criteria of malignancy. *Journal of Cellular Biochemistry* **110**:795-811.
- Ford JH, Schultz CJ, ve Correll AT (1988). Chromosome elimination in micronuclei: A common cause of hypoploidy. *American Journal of Human Genetics* **43**:733-740.
- Frei B, England L, ve Ames BN (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**:6377-6381.
- Fritz G, ve Kaina B (2006). Rho GTPases: Promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets* **6**:1-14.
- Fu J-Y, Xia Y, ve Zheng Y-Y (2004). Antimutagenicity of propolis against some mutagens *in vivo* and *in vitro*. *Biomedical and Environmental Sciences* **17**:469-475.
- Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T, ve Fujiwara K (2000). Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. *Hepatology Research* **17**:223-236.
- Garzarella EU, Navajas-Porras B, Pérez-Burillo S, Ullah H, Esposito C, Santarcangelo C, Hinojosa-Nogueira D, Pastoriza S, Zaccaria V, ve Xiao J (2022). Evaluating the effects of a standardized polyphenol mixture extracted from poplar-type propolis on healthy and diseased human gut microbiota. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **148**:112759.

- Ghisalberti E (1979). Propolis: A review. *Bee World* **60**:59-84.
- Giri S, Giri A, ve SB P (2002). Genotoxic effects of malathion in chick *in vivo* micronucleus assay. *Cytologia* **67**:53-59.
- Gniewosz M, Pobiega K, Olbryś N, Kraśniewska K, ve Synowiec A (2023). The effect of ethanol propolis extracts on inhibition of growth of *Fusarium solani* on hen eggs. *Applied Sciences* **13**:315.
- Goncharova R, ve Kuzhir T (1989). A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **214**:257-265.
- Greywe D, Kreutz J, Banduhn N, Krauledat M, Scheel J, Schroeder KR, Wolf T, ve Reisinger K (2012). Applicability and robustness of the hen's egg test for analysis of micronucleus induction (HET-MN): Results from an inter-laboratory trial. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **747**:118-134.
- Guha B, Das JK, ve Khuda-Bukhsh AR (2007). Ameliorative effects of vitamin supplementation on ethyl methane sulphonate-induced genotoxicity in a fish, *anabas testudineus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **68**:63-70.
- Guha B, ve Khuda Bukhsh A (2002). Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate. *Chemosphere* **47**:49-56.
- Gülbol Duran G (2007). *In vitro* koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungal ve leyişmanyasidal etkilerinin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay.
- Güney F, ve Yılmaz M (2013). Propolisin kimyasal içeriği ile antibakteriyel, antiviral, antitümör, antifungal ve antioksidan aktivitesi. *Arıcılık Araştırma Dergisi* **10**:25-28.
- Halliwell B (2001). Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **475**:29-35.
- Hamburger V, ve Hamilton HL (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* **88**:49-92.
- Hamilton JW, ve Bloom SE (1986). Correlation between induction of xenobiotic metabolism and DNA damage from chemical carcinogens in the chick embryo *in vivo*. *Carcinogenesis* **7**:1101-1106.
- Hamilton JW, Denison MS, ve Bloom SE (1983). Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo [a] pyrene) hydroxylase activity in the chicken embryo *in ovo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**:3372-3376.
- Hando JC, Nath J, ve Tucker JD (1994). Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* **103**:186-192.
- Hashizume R, Noda A, Itoh M, Yamamoto Y, Masui S, Oka M, ve Nakamura T (1992). Studies on teratological testing using chicken embryos-effects of solvents, injection sites and the age of the embryo. *Experimental Animals* **41**:349-356.
- Hayashi M (2016). The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test—. *Genes and Environment* **38**:1-6.
- Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, Vanparys P, ve MacGregor J (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **18**:277-291.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW ve Salamone MF (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report

- of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **123**:61-118.
- Hirata Y, Motoyama M, Kimura S, Takashima M, Ikawa T, Oh-Hashi K, ve Kamatari YO (2021). Artepillin C, a major component of Brazilian green propolis, inhibits endoplasmic reticulum stress and protein aggregation. *European Journal of Pharmacology* **912**:174572.
- Hothorn LA, Reisinger K, Wolf T, Poth A, Fieblinger D, Liebsch M, ve Pirow R (2013). Statistical analysis of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN assay). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **757**:68-78.
- Ibrahim MEE-D, ve Alqurashi RM (2022). Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts. *International Journal of Food Microbiology* **361**:109463.
- Irigoitia Y, Navarro A, Yamul D, Libonatti C, Tabera A, ve Basualdo M (2021). The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science & Technology* **115**:297-306.
- Jelinek R (1977). The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In: *Methods in Prenatal Toxicology*, 381-386.
- Jelinek R, ve Marhan O (1994). Validation of the Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST). A comparative study. *Functional and Developmental Morphology* **4**:317-323.
- Jelinek R, Peterka M, ve Rychter Z (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian Journal of Experimental Biology* **23**:588-595.
- Jeng S-N, Shih M-K, Kao C-M, Liu T, ve Chen S-C (2000). Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. *Food and Chemical Toxicology* **38**:893-897.
- Jeong J, Oh D, ve Goh M (2022). Synthesis, antibacterial activity, and enzymatic decomposition of bio-polyurethane foams containing propolis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **109**:182-188.
- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kosai P, ve Kim M (2010). Micronucleus test: The effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (*Puntius altus*). *Research Journal of Environmental Toxicology* **4**:103-112.
- Johnson EM (1986). False positives/false negatives in developmental toxicology and teratology. *Teratology* **34**:361-362.
- Kashiwakura J-i, Yoshihara M, Saitoh K, Kagohashi K, Sasaki Y, Kobayashi F, Inagaki I, Kitai Y, Muromoto R, ve Matsuda T (2021). Propolis suppresses cytokine production in activated basophils and basophil-mediated skin and intestinal allergic inflammation in mice. *Allergology International* **70**:360-367.
- Kaya B (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology* **27**:241-246.
- Kaya B (2004). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology* **27**:241-246.
- Kaya B, Creus A, Velázquez A, Yanikoğlu A, ve Marcos R (2002). Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **520**:93-101.
- Kaya B, Marcos R, Yanikoğlu A, ve Creus A (2004). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **557**:53-62.

- Kemper F, ve Luepke N (1986). Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food Chem Toxicol* **24**:647-648.
- Keskin M (2018). Alginat-propolis mikrokapsüllerin *in vitro* sindirim sisteminde salınımının ham propolis ile kıyaslanması. *Uludağ Arıcılık Dergisi* **18**:94-100.
- Kim CH, Kim MY, Lee S-W, ve Jang K-S (2019). UPLC/FT-ICR MS-based high-resolution platform for determining the geographical origins of raw propolis samples. *Journal of Analytical Science and Technology* **10**:1-12.
- King M-T, ve Wild D (1979). Transplacental mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood. *Human Genetics* **51**:183-194.
- Kinlen L, Peto J, Doll R, ve Sheil A (1981). Cancer in patients treated with immunosuppressive drugs. *British Medical Journal* **282**:474.
- Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, Stope MB, ve Kramer A (2016). Investigating the mutagenicity of a cold argon-plasma jet in an HET-MN model. *PLoS One* **11**:160667.
- Korkmaz A, Topal T, ve Oter S (2007). Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol* **23**:303-312.
- Könen S (2007). Triflularin ve askorbik asit kombinasyonlarının oreochromis niloticus üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Kuley E, Yazgan H, Özogul Y, Ucar Y, Durmus M, Özyurt G, ve Ayas D (2021). Effectiveness of *Lactobacilli* cell-free supernatant and propolis extract microcapsules on oxidation and microbiological growth in sardine burger. *Food Bioscience* **44**:101417.
- Kumova U (2002). Önemli bir arı ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi* **2**:10-24.
- Lähdetie J, ve Parvinen M (1981). Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **81**:103-115.
- Laleni NC, Gomes PDC, Gkatzionis K, ve Spyropoulos F (2021). Propolis particles incorporated in aqueous formulations with enhanced antibacterial performance. *Food Hydrocolloids for Health* **1**:100040.
- Landino LM, Koumas MT, Mason CE, ve Alston JA (2006). Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**:347-352.
- Langthasa P, Barhoi D, Devi S, Giri A, ve Giri S (2022). Genotoxic and cytotoxic potential of Bisphenol A in the early developing stages of chick embryo (*Gallus gallus domesticus*) evidenced by HET-MN and comet assay. *Research Journal of Biotechnology* **17**:19-28.
- Latt SA, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schreck R, Tice R, ve Whitfield B (1981). Sister-chromatid exchanges: A report of the GENE-TOX program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **87**:17-62.
- Leonardi S, Poma AM, Colafarina S, D'Aloisio F, Scatigna M, Zarivi O, Mastrantonio R, Tobia L, ve Fabiani L (2020). Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: A cross-sectional study in L'Aquila, Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **203**:110989.
- Lialiaris TS (2013). Sister chromatid exchange. Life Sciences, Dimokrition University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

- Liao N, Sun L, Wang D, Chen L, Wang J, Qi X, Zhang H, Tang M, Wu G, ve Chen J (2021). Antiviral properties of propolis ethanol extract against norovirus and its application in fresh juices. *LWT* **152**:112169.
- Lin Y, Wang F, ve Zhang G-L (2014). Natural products and their derivatives regulating the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Journal of Asian Natural Products Research* **16**:800-812.
- Liu Y, Qiu S, Wang L, Zhang N, Shi Y, Zhou H, Liu X, Shao L, Liu X, ve Chen J (2019). Reproductive and developmental toxicity study of caffeic acid in mice. *Food and Chemical Toxicology* **123**:106-112.
- Longchar A, ve Prasad SB (2016). Ascorbic acid (vitamin C) ameliorates cisplatin-induced hematotoxicity in tumor-bearing mice. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **5**:1870-1891.
- Luepke N (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* **23**:287-291.
- MacGregor JT, Wehr CM, ve Gould DH (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis* **2**:509-514.
- Martin F, Lauwerys B, Lefebvre C, Devogelaer J-P, ve Houssiau F (1997). Side-effects of intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus* **6**:254-257.
- Maul K, Fieblinger D, Heppenheimer A, Kreutz J, Liebsch M, Luch A, Pirow R, Poth A, Strauch P, ve Dony E (2022). Validation of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): Detailed protocol including scoring atlas, historical control data and statistical analysis. *Mutagenesis* **37**:76-88.
- Mauldin JM (1993). Quality control procedures for the hatchery. *Poultry Science* **93**:1-24.
- Mei L, Ji Q, Jin Z, Guo T, Yu K, Ding W, Liu C, Wu Y, ve Zhang N (2022). Nano-microencapsulation of tea seed oil via modified complex coacervation with propolis and phosphatidylcholine for improving antioxidant activity. *LWT* **163**:113550.
- Memmedov H, Aldemir O, ve Aliyev E (2017). Propolisin antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi. *Arıcılık Araştırma Dergisi* **9**:56-62.
- Memmedov H, Aldemir O, ve Aliyev E (2018). Propolisin antikanser etkisi. *Arıcılık Araştırma Dergisi* **10**:20-27.
- Mendez Pfeiffer P, Juarez J, Hernandez J, Taboada P, Virués C, Alday E, Valencia D, ve Velazquez C (2022). Polymeric nanoparticles for the delivery of sonoran desert propolis: Synthesis, characterization and antiproliferative activity on cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **215**:112475.
- Mills KA, Chess-Williams R, ve McDermott C (2019). Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: Chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction *in vitro*. *Arch Toxicol* **93**:3291-3303.
- Milošević-Đorđević O, Grujičić D, Radović M, Vuković N, Žižić J, ve Marković S (2015). *In vitro* chemoprotective and anticancer activities of propolis in human lymphocytes and breast cancer cells. *Archives of Biological Sciences* **67**:571-581.
- Mizuno S, Miyata R, Mukaide K, Honda S, Sukito A, Sahlan M, Taniguchi T, ve Kumazawa S (2021). New compound from the plant origin of propolis from Lombok, Indonesia and its antibacterial activity. *Results in Chemistry* **4**:100276.

- Monach PA, Arnold LM, ve Merkel PA (2010). Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: A data-driven review. *Arthritis Rheum* **62**:9-21.
- Monteil J, Hadj-Sassi A, Dargelos É, Guzman-Barrera N, Poque E, ve Leal-Calderon F (2022). Method to prepare aqueous propolis dispersions based on phase separation. *Food Chemistry* **389**:133072.
- Montoro A, Soriano J, Barquinero J, Almonacid M, Verdú G, Sahuquillo V, Villaescusa J, ve Sebastià N (2012). Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* **50**:216-221.
- Moore F, Urda G, Krishna G, ve Theiss J (1995). An *in vivo/in vitro* method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. studies with cyclophosphamide. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **335**:191-199.
- Müller W-U, ve Streffer C. (1994). Micronucleus assays. In: *Advances in Mutagenesis Research*. Springer. 1-134.
- Nath J, Tucker JD, ve Hando JC (1995). Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* **103**:725-731.
- Neto JC, Paulino ET, Rodrigues AKBF, da Silva JCG, Bernardino AC, dos Santos Oliveira JM, do Nascimento TG, de Souza Oliveira W, Santos JCC, ve Smaniotto S (2022). Cardioprotective effect of hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Phytomedicine Plus* **2**:100190.
- Neumann N, Hözle E, Lehmann P, Rosenbruch M, Klauic A, ve Plewig G (1997). Photo hen's egg test: A model for phototoxicity. *British Journal of Dermatology* **136**:326-330.
- Nishigori H, Mizumura M, ve Iwatsuru M (1992). The hen's fertile egg screening test (HEST): A comparison between the acute toxicity for chick embryos and rodents of 20 drugs. *Cell Biology and Toxicology* **8**:255-265.
- Novotna B, ve Jelinek R (1986). A comparison of mutagenic and embryotoxic effects of cyclophosphamide on the chick embryo. *Environmental mutagenesis* **8**:241-252.
- Novotna B, ve Jelinek R (1990). Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide on the chick embryo: Chromosomal aberrations and cell proliferation in affected and unaffected tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* **10**:341-350.
- Onur E, Gökmen GG, Nalbantsoy A, ve Kışla D (2022). Investigation of the supportive therapy potential of propolis extract and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 milk combination against breast cancer in mice. *Cytokine* **149**:155743.
- Ożarowski M, ve Karpiński TM (2023). The effects of propolis on viral respiratory diseases. *Molecules* **28**:359.
- Ozturk IC, Ozturk F, Gul M, Ates B, ve Cetin A (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function* **27**:309-315.
- Özcan M (1992). Hidrokinon'un gelişim toksisitesinin döllenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Özcan PÖ (2011). Propolisin antimutajenik etkilerinin *Drosophila melanogaster*'de araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özkul Y, Eroglu HE, ve Ok E (2006). Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **61**:638-640.

- Özkul Y, Silici S, ve Eroğlu E (2005). The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* **12**:742-747.
- Öznurlu Y (2003). Yumurtaya verilen Aflatoksin B1'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Özparlak H (2006). Yumurtaya verilen organik insektisit fipronilin tavukların embriyonik ve kuluçka sonu erken dönem gelişim üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Özparlak H, Arslan A, ve Güler GÖ (2011). Organik insektisit fipronil'in genotoksik etkilerinin civciv mikronucleus test sisteminde belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* **37**:1-8.
- Özparlak H, Çelik B, ve Balta D (2018). Yumurtaya verilen siklofosfamid ve C vitamini'nin tavuk embriyoları üzerindeki bazı etkileri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* **44**:157-173.
- Pant K, Thakur M, Chopra HK, Dar BN, ve Nanda V (2022). Assessment of fatty acids, amino acids, minerals, and thermal properties of bee propolis from Northern India using a multivariate approach. *Journal of Food Composition and Analysis* **111**:104624.
- Peixoto M, Freitas AS, Cunha A, Oliveira R, ve Almeida-Aguiar C (2021). Antioxidant and antimicrobial activity of blends of propolis samples collected in different years. *LWT* **145**:111311.
- Pereira AD, de Andrade SF, de Oliveira Swerts MS, ve Maistro EL (2008). First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology* **46**:2580-2584.
- Pereira L, Cunha A, ve Almeida-Aguiar C (2022). Portuguese propolis from Caramulo as a biocontrol agent of the apple blue mold. *Food Control* **139**:109071.
- Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, ve Gallo P (2008). Cyclophosphamide-based combination therapies for autoimmunity. *Neurological Sciences* **29**:233-234.
- Pickering MT, ve Kowalik TF (2006). Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene* **25**:746-755.
- Pilario KE, Tielemans A, ve Mojica E-RE (2022). Geographical discrimination of propolis using dynamic time warping kernel principal components analysis. *Expert Systems With Applications* **187**:115938.
- Pool B, Bos R, Niemeyer U, Theuvs J, ve Schmähl D (1988). *In vitro/in vivo* effects of Mesna on the genotoxicity and toxicity of cyclophosphamide—a study aimed at clarifying the mechanism of Mesna's anticarcinogenic activity. *Toxicology Letters* **41**:49-56.
- Prelusky DB, Hamilton RM, Foster BC, Trenholm LH, ve Thompson BK (1987). Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70**:1049-1055.
- Premkumar K, ve Bowlus CL (2003). Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **542**:99-103.
- Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, Selvaraj J, ve Balasubramanian K (2013). Diethyl Hexyl Phthalate (DEHP) is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: Protective role of antioxidant vitamins (C & E). *Journal of Cellular Biochemistry* **114**:558-569.
- Reisinger K, Dony E, Wolf T, ve Maul K. 2019. Hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN).in A. Dhawan and M. Bajpayee, editors. Genotoxicity

- Assessment Methods and Protocols. Springer Science+Business Media, LLC, Part of Springer Nature, New Delhi, Delhi, India.
- Reisinger K, Fieblinger D, Heppenheimer A, Kreutz J, Liebsch M, Luch A, Maul K, Poth A, Strauch P, ve Dony E (2022). The hen's egg test for micronucleus-induction (HET-MN): Validation data set. *Mutagenesis* **37**:61-75.
- Roberto MM, Jamal CM, Malaspina O, ve Marin-Morales MA (2016a). Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genetics and molecular biology* **39**:257-269.
- Roberto MM, Matsumoto ST, Jamal CM, Malaspina O, ve Marin-Morales MA (2016b). Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by *in vitro* study with HTC cells. *Toxicology In Vitro* **33**:9-15.
- Rocha MP, Amorim JM, Lima WG, Brito JCM, ve da Cruz Nizer WS (2021). Effect of honey and propolis, compared to acyclovir, against *Herpes Simplex Virus* (HSV)-induced lesions: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Ethnopharmacology* **287**:114939.
- Rodrigues CRF, Plentz LC, Marcucci MC, Dihl RR, ve Lehmann M (2016). *In vivo* evaluation of mutagenic and recombinogenic activities of Brazilian propolis. *Food and Chemical Toxicology* **96**:117-121.
- Rosenbruch M (1994). Early stages of the incubated chicken egg as a model in experimental biology and medicine *Altex* **11**:199-206.
- Rosenbruch M (1997). The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *Altex* **14**:111-113.
- Rosenbruch M, ve Holst A (1990). The chick embryo yolk-sac blood vessel system as an experimental model for irritation and inflammation. *Toxicology In Vitro* **4**:327-331.
- Rushdi AI, Adgaba N, Bayaqoob NI, Al-Khazim A, Simoneit BR, El-Mubarak AH, ve Al-Mutlaq KF (2014). Characteristics and chemical compositions of propolis from ethiopia. *SpringerPlus* **3**:1-9.
- Russo A, Troncoso N, Sanchez F, Garbarino J, ve Vanella A (2006). Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo [a] pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sciences* **78**:1401-1406.
- Salleh SNAS, Hanapiah NAM, Johari WLW, Ahmad H, ve Osman NH (2021). Analysis of bioactive compounds and chemical composition of malaysian stingless bee propolis water extracts. *Saudi journal of Biological Sciences* **28**:6705-6710.
- Samanta S, ve Dey P (2012). Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology* **40**:84-90.
- Sameni HR, Yosefi S, Alipour M, Pakdel A, Torabizadeh N, Semnani V, ve Bandegi AR (2021). Co-administration of 5FU and propolis on AOM/DSS induced colorectal cancer in BALB-c mice. *Life Sciences* **276**:119390.
- Santos GS, Tsutsumi S, Vieira DP, Bartolini P, ve Okazaki K (2014). Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with 60Co gamma-radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **762**:17-23.
- Sarıkahya NB, Gören AC, Okkalı GS, Çöven FO, Orman B, Kırıcı D, Yücel B, Kışla D, Demirci B, ve Altun M (2021). Chemical composition and biological activities

- of propolis samples from different geographical regions of Turkey. *Phytochemistry Letters* **44**:129-136.
- Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, ve Gollin SM (2000). Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**:303-308.
- Schmid W (1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis. Springer.31-53.
- Selvaraju GD, Rekha UV, Sumathijones C, Cheema MS, Jayamani DR, Dharani R, Sneha S, Yamuna M, Gayathiri E, ve Yadav S (2022). Fabrication and characterization of surgical sutures with propolis silver nano particles and analysis of its antimicrobial properties. *Journal of King Saud University-Science* **34**:102082.
- Senedese JM, Rodrigues AR, Furtado MA, Faustino VD, Berretta AA, Marchetti JM, ve Tavares DC (2011). Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2011**:315701.
- Seven İ, Taylan A, ve Seven PT (2007). Propolis ve hayvan beslemede kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **18**:79-84.
- Sezginer H, ve Dane F (2016). Toksik maddelerin genotoksik analiz yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* **9**:50-55.
- Shakoury N, Aliyari MA, Salami M, Emam-Djomeh Z, Vardhanabhuti B, ve Moosavi-Movahedi AA (2022). Encapsulation of propolis extract in whey protein nanoparticles. *LWT* **158**:113138.
- Shehata MG, Ahmad FT, Badr AN, Masry SH, ve El-Sohaimy SA (2020). Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Sciences* **65**:209-217.
- Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, ve Wahl GM (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of Cell Biology* **140**:1307-1320.
- Silveira MAD, De Jong D, Berretta AA, dos Santos Galvão EB, Ribeiro JC, Cerqueira-Silva T, Amorim TC, da Conceição LFMR, Gomes MMD, ve Teixeira MB (2021). Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **138**:111526.
- Song M, Wang K, Lu H, Yan S, Wu L, ve Xue X (2021). Composition and distribution of α -dicarbonyl compounds in propolis from different plant origins and extraction processing. *Journal of Food Composition and Analysis* **104**:104141.
- Soós Á, Bódi É, Várallyay S, Molnár S, ve Kovács B (2022). Element composition of propolis tinctures prepared from hungarian raw propolis. *LWT* **154**:112762.
- Suárez GAP, Galindo NJP, ve Cuervo OHP (2022). Obtaining Colombian propolis extracts using modern methods: A determination of its antioxidant capacity and the identification of its bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids* **182**:105538.
- Sur E (2001). Yumurtaya verilen Aflatoksin B1 (AFB1)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Surek M, de Fátima Cobre A, Fachi MM, Santos TG, Pontarolo R, Crisma AR, Felipe KB, ve de Souza WM (2022). Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. *LWT* **161**:113370.

- Surjyo B, ve Anisur KB (2004). Protective action of an anti-oxidant (L-Ascorbic acid) against genotoxicity and cytotoxicity in mice during p-DAB-induced hepatocarcinogenesis. *Indian J Cancer* **41**:72-80.
- Surjyo B, ve Rahman KA (2004). Protective action of an anti-oxidant (L-Ascorbic acid) against genotoxicity and cytotoxicity in mice during p-DAB-induced hepatocarcinogenesis. *Indian Journal of Cancer* **41**:72.
- Şekeroğlu V, ve Şekeroğlu ZA (2011a). Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* **68**:241-252.
- Şekeroğlu ZA, ve Şekeroğlu V (2011b). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi* **4**:221-229.
- Tamayo Arango LJ, Suárez Avendaño PA, Cano Valderrama AI, Cuartas Martínez BA, Yepes Ciro SA, Mejía Giraldo CA, ve Lenis Sanin YY (2012). Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **25**:620-624.
- Tates A, Dietrich A, De Vogel N, Neuteboom I, ve Bos A (1983). A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals. *Mutation Research Letters* **121**:131-138.
- Tavares DC, Barcelos GRM, Silva LF, Tonin CCC, ve Bastos JK (2006). Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in chinese hamster ovary cells. *Toxicology In Vitro* **20**:1154-1158.
- Tejs S (2008). The ames test: A methodological short review. *Environmental Biotechnology* **4**:7-14.
- Tempel K-H, Ignatius A, ve Stammberger I (1992). A short-term test for nucleotoxicity that uses chick embryo cells treated *in vitro* and *in vivo*—physico-chemical and biochemical investigations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **103**:73-78.
- Todd LA, ve Bloom SE (1980). Differential induction of sister chromatid exchanges by indirect-acting mutagen-carcinogens at early and late stages of embryonic development. *Environmental Mutagenesis* **2**:435-445.
- Tohamy AA, Abdella EM, Ahmed RR, ve Ahmed YK (2014). Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology* **66**:283-297.
- Türkez H (2011). The role of ascorbic acid on titanium dioxide-induced genetic damage assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Experimental and Toxicologic Pathology* **63**:453-457.
- Türkez H, ve Aydın E (2012). The protective role of ascorbic acid on imazalil-induced genetic damage assessed by the cytogenetic tests. *Toxicology and Industrial Health* **28**:648-654.
- Türkez H, Geyikoğlu F, Yousef MI, Toğar B, ve Vançelik S (2013). Propolis alleviates 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced histological changes, oxidative stress and DNA damage in rat liver. *Toxicology and Industrial Health* **29**:677-685.
- Türkez H, Yousef MI, ve Geyikoglu F (2010). Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food and Chemical Toxicology* **48**:2741-2746.
- Türkez H, Yousef MI, ve Geyikoglu F (2012). Propolis protects against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* **50**:2142-2148.
- Udroiu I (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* **79**:201-204.

- Ural M, Özgüner M, Şenal D, Sütçü R, ve Delibaş N (2005). Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* **12**:28-35.
- Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, ve Kalender Y (2009). Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology* **47**:1903-1908.
- Ünal M, Öztürk O, Selçuk MY, ve Oruç MA (2020). Propolis-literatür ne diyor? *Bozok Tıp Dergisi* **10**:215-223.
- Vadillo Rodríguez V, Cavagnola MA, Pérez-Giraldo C, ve Fernández-Calderón MC (2021). A physico-chemical study of the interaction of ethanolic extracts of propolis with bacterial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **200**:111571.
- Valadares B, Graf U, ve Spanó M (2008). Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila Melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* **46**:1103-1110.
- Varanda EA, Monti R, ve Tavares DC (1999). Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct and indirect acting mutagens. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* **19**:403-413.
- Varga T, Cravedi J, Fuzesi I, ve Varnagy L (2002). Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide. *Revue de Médecine Vétérinaire* **153**:275-278.
- Varga T, Hlubik I, Várnagy L, Budai P, ve Molnár E (1999). Embryonic toxicity of insecticide Sumithion 50 EC and herbicide Fusilade S in pheasants after individual or combined administration. *Acta Veterinaria Hungarica* **47**:123-128.
- Varnagy L (1999). Degradation of some pesticides in avian embryos. *Acta Veterinaria Hungarica* **47**:117-122.
- Varnagy L, Budai P, Molnár E, Füzesi I, ve Fancsi T (2001). Teratogenicity testing of BI 58 EC (38% dimethoate) in chicken embryos with special respect to degradation of the active ingredient. *Acta Veterinaria Hungarica* **49**:355-361.
- Vatan Ö (2012). Bazı bitkisel doğal bileşiklerin olası genotoksik/antigenotoksik etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* genotoksite test yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılması. Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Vesely D, ve Vesela D (1991). Use of chick embryos for prediction of embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. *Veterinarni Medicina* **36**:175-181.
- Vică ML, Glevitzky M, Tit DM, Behl T, Hegheduş-Mîndru RC, Zaha DC, Ursu F, Popa M, Glevitzky I, ve Bungău S (2021). The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. *Food Bioscience* **41**:101014.
- Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiwa K, ve Tanaka M (2001). FR167653 improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* **101**:146-151.
- Wilmer JL, ve Bloom SE (1991). A cytogenetic approach for detecting the selective toxicity of drugs in avian embryonic B and T lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **253**:161-172.
- Wilson III DM, ve Thompson LH (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **616**:11-23.

- Wolf T, ve Luepke N-P (1997). Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **394**:163-175.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Banduhn N, Eschrich D, Scheel J, ve Luepke N-P (2008). The hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): Novel analyses with a series of well-characterized substances support the further evaluation of the test system. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **650**:150-164.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, ve Luepke N-P (2002). Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **514**:59-76.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, ve Luepke N-P (2003). Investigating genotoxic and hematotoxic effects of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethanolamine in the hen's egg-micronucleus test (HET-MN). *Food and Chemical Toxicology* **41**:561-573.
- Wytenbach CR, ve Thompson SC (1985). The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: Malformations detected by histological examination. *American Journal of Anatomy* **174**:187-202.
- Yalçın CÖ, Aliyazıcıoğlu Y, Demir S, Turan İ, Bahat Z, Mısır S, ve Değer O (2016). Evaluation of the radioprotective effect of Turkish propolis on foreskin fibroblast cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **12**:990-994.
- Yıldırım Z, Hacıevliyagil S, Kutlu NO, Aydın NE, Kürkçüoğlu M, Iraz M, ve Durmaz R (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacological Research* **49**:287-292.
- Yıldız BM, ve Ünal F (2022). Propolisin kimyasal bileşimi ve biyolojik etkileri. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi* **3**:14-32.
- Yılmaz L, Özcan Yılsay T, ve Akpınar Bayazıt A (2004). Propolisin kimyasal bileşimi, biyolojik özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkisi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi* **6**:34-38.
- Yücel B, Topal E, Akçiçek E, ve Kösoğlu M (2014). Propolisin insan sağlığına etkileri. *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi* **24**:41-49.
- Yüzbaşıoğlu D, Avuloğlu Yılmaz E, ve Ünal F (2016). Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. *TÜBAV Bilim Dergisi* **9**:17-28.
- Yüzbaşıoğlu D, Zengin N, ve Ünal F (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda* **39**:179-186.
- Zulhendri F, Perera CO, Chandrasekaran K, Ghosh A, Tandean S, Abdulah R, Herman H, ve Lesmana R (2022). Propolis of stingless bees for the development of novel functional food and nutraceutical ingredients: a systematic scoping review of the experimental evidence. *Journal of Functional Foods* **88**:104902.
- Zullkiflee N, Taha H, ve Usman A (2022). Propolis: Its role and efficacy in human health and diseases. *Molecules* **27**:6120.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Semra ARABA
Uyruğu : T.C.

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: İbni Sina Anadolu Lisesi	2014
Üniversite	: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik	2019
Yüksek Lisans	:	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

Sertifika ve Katılım Belgeleri

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
HPLC-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kullanım Sertifikası
GC-Gaz Kromatografisi Kullanım Sertifikası
FTIR-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Kullanım Sertifikası
UV-VIS Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi Kullanım Sertifikası
GLP-İyi Laboratuvar Uygulamaları Sertifikası
GMP-İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası
Metot Validasyon Sertifikası
TS EN ISO/IEC 17025:2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Akreditasyonu Sertifikası
ISO 22716:2017 Kozmetik Sektöründe İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası
BScience 2022 Evreni Anlama Sanatı: Temel Bilimler Kongresi Katılım Belgesi
BEEO Propolis-Çeşitli Kronik Hastalıklarda Beslenme Nasıl Düzenlenmeli?
Beslenmede Arı Ürünlerinin Önemi Eğitimi Katılım Belgesi
BEEO Propolis- Arı Ürünleri ile Sağlıklı Beslenme ve Güncel Çalışmalar Eğitimi Katılım Belgesi
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Topluluğu- IV. GENÇOMÜ Öğrenci Kongresi Katılım Belgesi
SciGether Bilim Günleri Katılım Belgesi IEEE YTÜ- Bioform VIII Katılım Belgesi
YTÜ Biyoteknoloji ve Genetik Klubü-Biyoteknoloji V4 Konferansı Katılım Belgesi

YAYINLAR

- Araba S., Özparlak H. 2022. Propolis. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi **48**:1-9.
- Araba S., Özparlak H. 2022. Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testi'ni Uygulama Protokolü. BScience 2022 Evreni Anlama Sanatı: Temel Bilimler Kongresi Özet kitapçığı, 43, 11-12 Ekim Konya

