

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN EHRLİCH
ASSİT TÜMÖR (EAT) ÜZERİNE GİLABURU (*VIBURNUM
OPULUS*) MEYVE SUYUNUN ETKİLERİ**

**Hazırlayan
Dilek CEYLAN**

**Danışman
Prof. Dr. Ahmet AKSOY
Prof. Dr. Harun ÜLGER**

Doktora Tezi

**Haziran 2015
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN EHRLİCH
ASSİT TÜMÖR (EAT) ÜZERİNE GİLABURU (*VIBURNUM
OPULUS*) MEYVE SUYUNUN ETKİLERİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Dilek CEYLAN**

**Danışman
Prof. Dr. Ahmet AKSOY
Prof. Dr. Harun ÜLGER**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FDK-12-4178 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı Dilek CEYLAN

İmza : 

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Ehrlich Assit Tümör Üzerine (EAT) Üzerine Gilaburu (*Viburnum opulus*) Meyve Suyunun Etkileri” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Dilek CEYLAN



Danışman

Prof. Dr. Ahmet AKSOY



Prof. Dr. Harun ÜLGER


Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Ahmet AKSOY ve Prof. Dr. Harun ÜLGER danışmanlığında **Dilek CEYLAN** tarafından hazırlanan “**Farelerde Deneyisel Olarak Oluşturulan Ehrlich Assit Tümör (EAT) Üzerine Gilaburu (*Viburnum opulus*) Meyve Suyunun Etkileri**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

02/ 06/ 2015

JÜRİ:

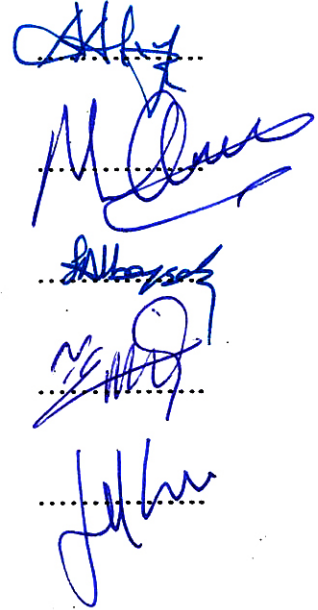
Danışman: Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Üye Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Üye Doç. Dr. Sevil ALBAYRAK

Üye Doç. Dr. Tölga ERTEKİN

Üye Doç. Dr. İ. Halil KILIÇ

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 16.06.2015 tarih ve 2015/24-13 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



02/06/2015

Prof. Dr. Kazım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın danışman hocalarım Prof. Dr. Ahmet AKSOY ve Prof. Dr. Harun ÜLGER'e, deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Doç. Dr. Tolga ERTEKİN, Doç. Dr. Sevil ALBAYRAK, ve Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ'ye teşekkür ederim.

Tezin yapılmasında büyük katkıları olan Genom ve Kök Hücre Merkezi ve DEKAM yöneticileri ile çalışanlarına, çalışmalarım süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar ve çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında hep yanımda olan desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Güler TOPRAK, Yük. Biyolog Metin KILIÇ ve Biyolog Mustafa Burak ACAR'a, hayatım boyunca yanımda olan ve ideallerimi gerçekleştirmemi sağlayan babam, annem, ablalarım, ikinci ailem olan Ceylan ailesine ve eşim Mustafa CEYLAN'a, en özeli ise varlığı ile hayatımı dolduran oğlum Mustafa Kemal'e sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca Ehrlich Assit Tümör'lü fareleri bize sağlayan Gaziantep Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN ve çalışma arkadaşlarına, bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FDK-12-4178) teşekkür ederim.

Dilek CEYLAN

Kayseri, Haziran 2015

FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KANSER ÜZERİNE GİLABURU (*VIBURNUM OPULUS*) MEYVE SUYUNUN ETKİLERİ

Dilek CEYLAN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Haziran 2015

Danışmanlar: Prof. Dr. Ahmet AKSOY, Prof. Dr. Harun ÜLGER

ÖZET

Bu çalışmada, deney gruplarına sırasıyla 1×10^6 EAT hücresi periton altına inoküle edilmiştir. İnokülasyondan iki saat sonra başlanarak 10 gün süresince deneme gruplarındaki hayvanlara 25 mg (III. Grup), 50 mg (IV. Grup) ve 100 mg (V. Grup) ekstrakt 200 μ L DPBS içerisinde çözünerek intraperitoneal (i.p.) olarak verilmiştir. Farelerdeki ağırlık artışına bakıldığında en fazla kilo artışının tümör kontrol grubundan sonra Grup III' de, en az kilo artışının Grup V' de olduğu gözlemlenmiştir. 11. günde tümör kontrol grubu ve deney gruplarının periton boşluğu içerisindeki EAT hücrelerinin bulunduğu assit sıvısı alınarak canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak *in vivo* sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Tümör kontrol grubundaki %100 olan canlılık değeri III-V gruplarda sırasıyla %88.72, %69.02 ve %51.87 olarak bulunmuştur. EAT hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi için gilaburu ekstraktının 125, 250 ve 500 μ g mL⁻¹ farklı konsantrasyonları uygulanarak % inhibisyon değerinin (IC₅₀) 199,58 μ g mL⁻¹ olduğu bulunmuştur. Karaciğer ve böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirmesinde karaciğer dokusunda tümör hücrelerine rastlanmamıştır. Böbrek dokusunda ise sağlıklı kontrol grubu normal histolojik özelliğini gösterirken tümör kontrol ve deney gruplarının seroza tabakalarında tümör hücrelerinin tutulumu görülmüştür. Biyokimyasal incelemede ise böbrek dokusunda CAT ve SOD aktivitesi gruplar arasındaki fark anlamlı bulunurken ($p < 0,05$), MDA enzim düzeyinde ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. Karaciğer dokusunda CAT aktivitesi gruplar arasında anlamlı bulunurken ($p < 0,05$), SOD ve MDA düzeyinde ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yapılan bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde gilaburu bitkisinin meyvelerinden elde edilen meyve suyu ekstraktının tümör gelişimini üzerinde yavaşlatıcı etkisinin olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Viburnum opulus*, deneysel kanser, EAT, antitümöral, antioksidan, histopatoloji.

THE EFFECTS OF GILABURU (*VIBURNUM OPULUS*) JUICE ON EXPERIMENTALLY INDUCED CANCER IN MICE

Dilek CEYLAN

Erciyes University, Institute of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, June 2015

Supervisors: Prof. Dr. Ahmet AKSOY, Prof. Dr. Harun ÜLGER

ABSTRACT

In the current study, 1×10^6 EAT cells were inoculated to each mice at the experimental group for except from group I. In the second hour after inoculation, extract were suspended with required PBS and were injected intraperitoneally to groups III, IV and V respectively 25 mg, 50 mg and 100 mg to be within 200 μ L PBS. After the tumor control group, the maximum weight gain were observed in group III, where the least weight gain were observed among group V. On the eleventh day, ascites fluid was collected from peritoneal cavity of experimental and tumor control groups. The survival rate of EAT cells was reported to be 100% viability at group II. For the other groups (Group III, IV, V) this index was found to be 88,72%, 69,02% and 51,87% respectively. In order to evaluated the *in vitro* cytotoxicity effect on EAT cells, different concentrations, of 125, 250 ve 500 μ g mL⁻¹, the extract were injected and was found 199,58 μ g mL⁻¹ as % inhibition value. All animals were sacrificed and their liver and kidney tissues were taken for pathological studies. No tumor cells were observed in the liver tissue. In the kidney tissue, healthy control group showed a normal histological feature but tumor cells were observed at serous layer of kidney tissue of tumor control group and other experimental groups. Results of biochemical investigation, CAT and SOD activity were found significant differences between groups ($p < 0,05$), while MDA level was not found significant difference in the kidney tissue ($p > 0,05$). CAT activity was found significant differences between groups ($p < 0,05$), but SOD enzyme and MDA levels were not found significant difference in the liver tissue ($p > 0,05$). According to the results of the current study, extracts obtained from gilaburu juice can have hinder effect on tumor cell growth.

Key words: *Viburnum opulus*, experimental cancer, EAT, antitumoral, antioxidant, histopathology.

İÇİNDEKİLER

FARELERDE DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KANSER ÜZERİNE GİLABURU (*VIBURNUM OPULUS*) MEYVE SUYUNUN ETKİLERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY.....	iii
ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMA VE SİMGELER.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser	4
1.1.1. Meme Kanseri.....	5
1.1.2. Kanser Tedavisi	7
1.2. Tıbbi Bitkiler	9
1.2.1. Gilaburu (<i>Viburnum opulus</i> L.).....	10
1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	12
1.3.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)	13
1.3.2. Katalaz (CAT).....	14
1.3.3. Glutatiyon Peroksidaz (GPx)	14

1.3.4. Glutatyon Redüktaz (GR).....	15
1.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	15
1.4.1. Hidroksil Radikali (OH)	16
1.4.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	16
1.4.3. Süperoksit Radikali (O ₂ ^{·-})	16
1.4.4. Nitrik Oksit (NO [·]).....	16
1.4.5. Lipit Peroksidasyonu	17
1.5. Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	17
1.6. Oksidatif Stres ve Karsinogenez	17
1.7. Kanser Çalışmalarında Deneysel Modeller	19
1.7.1. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller.....	19
1.7.2. Xenograft Model	20
1.7.3. Transgenik, Kimerik veya Knock-out Modeller	21
1.7.4. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modeller	21
1.7.4.1. Ehrlich Assit Tümör (EAT) Modeli	22
1.7.4.1.1. Ehrlich Assit Tümörü	22
1.7.4.1.2. Ehrlich Solid Tümörü.....	24

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gilaburunun Toplanması ve Ekstraktın Elde Edilmesi	25
2.2. Gilaburu Meyve Suyunun Bazı İçeriklerinin Analizi	25
2.3. Gilaburu Ekstraktının Çözünmesi ve Sterilizasyonu	26
2.4. EAT Oluşturulması.....	26
2.4.1. Deney Hayvanları.....	26
2.4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Gilaburu Ekstraktının Enjekte Edilmesi	26
2.5. Gilaburu'nun EAT Gelişimi Üzerine Etkisi	27

2.5.1. EAT Hücrelerinin Tripan Mavisi Yöntemi ile Sayımı.....	28
2.5.2. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücreleri Üzerindeki <i>in vitro</i> Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	29
2.5.2.1. EAT Hücrelerinin Yeniden Canlandırılması ve Çoğaltılması.....	29
2.5.2.2. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücrelerine Uygulanması.....	30
2.5.2.3. Tripan Mavisi Yöntemi ile <i>in vitro</i> Sitotoksitesinin Belirlenmesi.....	30
2.5.3. Biyokimyasal İncelemeler	30
2.5.3.1. Dokuların Protein Miktarı Tayini.....	31
2.5.3.2. Malondialdehit (MDA) Tayini.....	33
2.5.3.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	36
2.6. Histopatolojik Değerlendirmeler	41
2.6.1. Histolojik Doku Takibi	41
2.6.2. Histopatolojik Değerlendirme	42
2.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	43

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Gilaburu Meyve Suyunun Analiz Bulguları.....	44
3.2. Deney Süresince Grupların Vücut Ağırlık Değişimi	44
3.3. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücreleri Üzerindeki <i>in vivo</i> Sitotoksitesitesi	46
3.4. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücreleri Üzerindeki <i>in vitro</i> Sitotoksik Etkisi...47	
3.5. Biyokimyasal Bulgular	48
3.5.1. Böbrek Dokusuna Ait Enzim Düzeyleri	48
3.5.1.1. Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi	50
3.5.1.2. Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesi	51
3.5.1.3. Böbrek Dokusunda MDA Düzeyi.....	52
3.5.2. Karaciğer Dokusuna Ait Enzim Düzeyleri	53
3.5.2.1. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivitesi	55

3.5.2.2. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivitesi.....	56
3.5.2.3. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyi	56
3.6. Histopatolojik Bulgular	57
3.6.1. Böbrek Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme.....	58
3.6.2. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme	60

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Tartışma ve Sonuç.....	61
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	89

KISALTMA VE SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum Sülfat
$\cdot\text{OH}$	Hidroksil Radikali
AChE	Asetilkolinesteraz
BSA	Bovine Serum Albümin
CAT	Katalaz
CuCl_2	Bakır Klorür
dH_2O	Distile Su
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EAT	Ehrlich Assit Tümör
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HAc	Asetik Asit
i.p.	İntraperitoneal
KPO_4	Potasym Fosfat

MDA	Malondialdehit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	Nitroblue Tetrazolium
nBu-Pri	n-Butanol-Piridin
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂	Singlet Oksijen
O ₂ •-	Süperoksit Radikali
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
s.c.	Subkutan
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik Asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XO	Ksantin Oksidaz

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Bradford standart eğim grafiği için gerekli reaktiflerin tüplere konulması.....	32
Tablo 2.2.	Protein tayin yöntemi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması	32
Tablo 2.3.	MDA standart eğim grafiği için gerekli reaktiflerin tüplere konulması	35
Tablo 2.4.	MDA enzim düzeyi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması.	35
Tablo 2.5.	CAT aktivitesi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması	37
Tablo 2.6.	SOD standart eğim grafiği için gerekli reaktiflerin tüplere konulması	39
Tablo 2.7.	SOD aktivitesi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması	40
Tablo 2.8.	Parafin doku takip (PAS) yöntemi aşamaları	41
Tablo 2.9.	Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yönteminin aşamaları	42
Tablo 3.1.	Gilaburu meyve suyunun içerikleri.....	44
Tablo 3.2.	Gilaburu meyve suyunun mineral madde miktarları	44
Tablo 3.3.	Deney öncesinde ve deney sonrası tüm grupların ortalama ağırlık değerleri	45
Tablo 3.4.	Ortalama ağırlık değişimlerinin uygulama grupları arası anlamlılık (p) değerleri	46
Tablo 3.5.	Deney gruplarında EAT hücrelerinin ortalama sayısı ve yüzde canlılık değeri	47
Tablo 3.6.	EAT hücresi canlılık yüzdelерinin gruplar arası anlamlılık (p) değeri ..	47
Tablo 3.7.	Gilaburu ekstraktının EAT hücreleri üzerindeki <i>in vitro</i> ortalama % sitotoksik etkisi ve IC ₅₀ değeri.....	48
Tablo 3.8.	Deney gruplarının böbrek dokusuna ait enzim düzeylerinin ortanca (25. ve 75. yüzdelikleri) değeri.....	49
Tablo 3.9.	Böbrek dokusuna ait enzim düzeylerinin gruplar arası anlamlılık (p) değeri.....	49
Tablo 3.10.	Böbrek dokusuna ait gruplar arası enzim düzeylerinin anlamlılık (p) değeri	53

Tablo 3.11. Deney gruplarının karaciğer dokusuna ait enzim düzeylerinin ortalama (25. ve 75. yüzdelikleri) değerleri.....	54
Tablo 3.12. Karaciğer dokusuna ait enzim düzeylerinin gruplar içi anlamlılık (p) değerleri.....	54
Tablo 3.13. Karaciğer dokusuna ait gruplar arası enzim düzeylerinin içi anlamlılık (p) değerleri.....	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Ülkemizde bütün yaş gruplarının her iki cinsiyeti için total ölümlerin yüzde oranı.....	5
Şekil 1.2.	Ülkemizde farklı yaş gruplarına bağlı olarak kadınlarda görülen ilk 10 kanserin yüzde değerleri	6
Şekil 1.3.	Ülkemizde meme kanserinin kadınlarda yaş grubuna göre dağılımı.....	7
Şekil 1.4.	Gilaburu (<i>Viburnum opulus</i> L.) meyvesi	11
Şekil 2.1.	Deney gruplarının periton boşluğu içerisindeki EAT hücrelerinin enjektör yardımı ile alınması	29
Şekil 2.2.	Bradford standart eğim grafiği.....	33
Şekil 3.1.	Grupların günlük ortalama ağırlık değişimi.....	46
Şekil 3.2.	Grupların böbrek dokusuna ait CAT aktiviteleri	50
Şekil 3.3.	Grupların böbrek dokusuna ait SOD aktiviteleri	51
Şekil 3.4.	MDA standart eğim grafiği.....	52
Şekil 3.5.	Grupların böbrek dokusuna ait MDA düzeyleri	53
Şekil 3.6.	Grupların karaciğer dokusuna ait CAT aktiviteleri	55
Şekil 3.7.	Grupların karaciğer dokusuna ait SOD aktiviteleri	56
Şekil 3.8.	Grupların karaciğer dokusuna ait MDA düzeyleri	57
Şekil 3.9.	EAT hücrelerinin histopatolojik görüntüsü	58
Şekil 3.10.	Böbrek dokusunun sağlıklı kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik bulguları	59
Şekil 3.11.	Karaciğer dokusunun sağlıklı kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik bulguları	60

GİRİŞ

Kanser, yıllardır tüm dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Bu yaygın hastalığın, hem hastaya, hem çevresine hem de topluma getirdiği maddi ve manevi yükler nedeniyle de tıp dünyasının olduğu kadar tüm insanlığın sorunu haline gelmiştir [1]. Kanser hastalığının ortaya çıkması, gelişimi ve sonuçları bir hastadan diğerine çok değişken olan bir durumdur. Bu durum, hücresel ve moleküler düzeyde de değişkendir. Kanser; hücrelerin metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirerek aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan, çok basamaklı bir süreçtir [2].

Kanser teşhisinden sonra kanseri önlemede uygulanan en yaygın yöntem kemoterapidir. Kemoterapi, insanda kanser gelişimini önleyici sentetik veya doğal maddelerin ayrı ayrı ya da birlikte kullanımı olarak tarif edilir [3]. Kemoterapi ile tedavi sürecinin, hastanın yaşam süresi, yaşam kalitesi ve ağrılara başlangıç safhasında olumlu yanıt verdiği gözlenmiştir [4, 5]. Ancak kemoterapi ile tedavi sürecinde ve kemoterapinin ileri evrelerinde bazı yan etkilerinin olduğu söylenmektedir. Kemoterapi sürecinde veya sonrasında hastalarda kemik iliğinin baskılandığının ve buna bağlı olarak aneminin ortaya çıktığı, ikincil tümör oluşumu ve tümör metastazı gibi yan etkilere sebep olduğu tespit edilmiştir [6]. Ayrıca kansere karşı geliştirilen ilaçların normal hücrelere de toksik etki göstermesi, kanser hücrelerinin, kanser ilaçlarına karşı geliştirdiği direnç nedeniyle bu hastalığın tedavisi için yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni tedavi yöntemlerinin aranmasıyla aktif bir araştırma alanı doğmuş olup bu çalışmalarda meyve, sebze, otlar ve baharatlar gibi tıbbi bitkilerden yaygın bir şekilde yararlanıldığı görülmüştür [7]. Yapılan çalışmalara bakıldığında ilaçların yan etkilerinden dolayı, antioksidan özelliği olduğu bilinen bitkilerin kanser tedavisinde kullanımına dair yönelimde artış görülmektedir. Bitki kaynaklı doğal ürünlerden bazıları, anti tümör ve antioksidan aktiviteleri içeren çeşitli farmakolojik özelliklerinden dolayı yıllardır ilgiyi üzerinde toplamaktadır [8-11]. Bitkisel kaynaklarda, antikanser ve antioksidan özellik

gösteren fitokimyasalları kullanmada en iyi yaklaşımlardan biri modern bilimin ışığı altında, etkinliği ve güvenilirliği test edilmiş bitkilerin seçimidir. Yüzyıllardır, insanlar birçok hastalığın tedavisinde tıbbi özelliklere sahip doğal ürünleri kullanmayı denemişlerdir. Halk arasında birçok bitki bilinçli ya da bilinçsiz şekilde önerilmekte veya tüketilmektedir. Ancak bu bitkilerin özellikleri ve bileşenleri bilimsel olarak araştırılmadığı için kişi bu bitkileri kullandığında tedaviden daha çok zarar görebilmektedir [12]. Bitkisel kaynakların kullanımı gün geçtikçe daha da artmaktadır ve bu ürünler kalıtsal adaptif bir mekanizmayla yan etki göstermeden metabolize edilir. Ancak bu durum sentetik ilaçlar için geçerli değildir. Bu da alternatif tıp sistemlerinin örneğin Ayurveda (Yaşam bilgisi)'nın kabul edilebilirliğinin artışı için dayanak oluşturur [13].

Doğal kaynaklar arasından antikanser ajanlarının araştırılması tüm dünyada başarılı bir şekilde devam etmektedir. Günümüzde pek çok araştırmacı tıbbi bitkilerin bileşenleri ve ekstraktlarını elde ederek enfeksiyon ve kanser hastalıklarına karşı olan etkilerini *in vivo* ve *in vitro* deney modelleri kullanarak araştırmaktadır. Ekstraktların etkileri en yaygın olarak antibakteriyal aktivite, sitotoksikite ve canlılık testleri ile ortaya konulmaya çalışılmaktadır [14-16]. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen etnofarmakolojik bilgiler, potansiyel olarak antikanser özellik gösteren bitkilerin araştırılması için yardımcı kaynak olarak bildirilmektedir [17].

Viburnum opulus L. (Gilaburu) Adoxaceae [18] familyasına ait olan bir türdür. *V. opulus* Orta Anadolu bölgesinde, özellikle Kayseri yöresinde gilaburu olarak adlandırılmaktadır. Kayseri ve civarında oldukça sık tüketilmekte fakat Türkiye genelinde çok fazla bilinmemektedir. Literatüre bakıldığında gilaburunun iyi bir besin kaynağı olmasının yanında farklı bölümlerinden elde edilen bileşiklerin antioksidan özelliklerinin olduğu, polifenolik ve askorbik asit bileşiklerinin oldukça yüksek olduğu belirtilmiş, insan bağışıklık sistemini geliştirme özelliğinden dolayı birçok hastalığı önlemede etkili olabileceği öne sürülmüştür [19-23]. Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada gilaburu suyunun doğal diyet olarak kullanılmasının kanser hastalığının gelişmesini engelleyebileceği belirtilmiştir [24].

Kanser oluşum sürecinin ortaya çıkarılmasında, insandaki kanser gelişimi ve patogenezi altında yatan mekanizmaların değerlendirilmesinde deneysel kanser modellerinin

önemli fikirler verebileceği bilinmektedir [25]. Deneysel kanser araştırmalarında en sık kullanılan modellerden biri de Ehrlich Assit Tümör (EAT) modelidir. EAT kolaylıkla bir fareden diğerine enjekte edilebilmesi, regresyon göstermemesi, hızla yayılması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilen bir modeldir [11].

Yapılan bu çalışmada, literatür çalışmaları göz önüne alınarak, antioksidan özellik gösteren ve antikanserojen etkisinin olabileceği [19-25] rapor edilen, gilaburu bitkisinin meyvesinden elde edilen toz ekstraktın, EAT deneysel kanser modeli üzerinde *in vivo* ve *in vitro* antikanserojen etkisi araştırılacaktır.

1. BÖLÜM

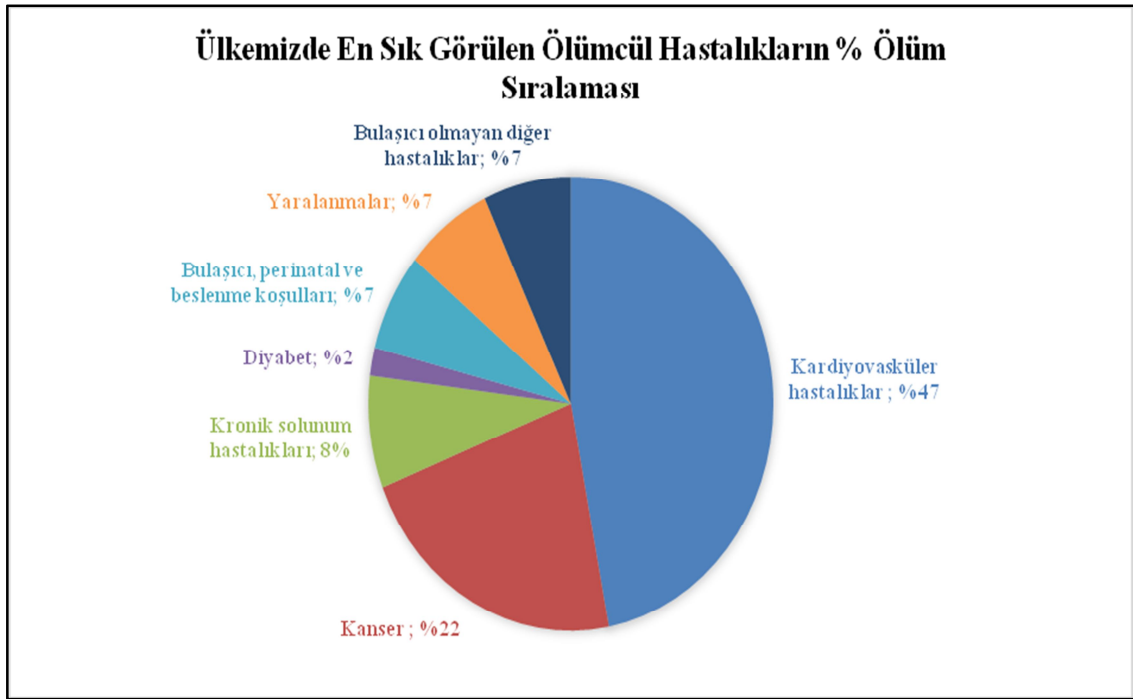
GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser

Kanser, dünya çapında önemli sağlık sorunlarından biridir. 20. yüzyılın en korkutucu sağlık problemi olan kanser, 21. yüzyılda da gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde problem olmaya devam etmektedir. İstatistik çalışmalarına bakıldığında kadınlarda sıklıkla meme, mide, kolon ve rektum kanseri yaygın olarak görülürken, erkeklerde ise akciğer, kolon, rektum ve prostat kanseri daha sık görülmektedir [26].

Kanser, büyüme özellikleri bozulmuş anormal hücrelerin organizmada hızlı bir şekilde kontrolsüz çoğalması olarak karakterize edilen hastalık grubudur. Eğer bu hızlı çoğalma kontrol altına alınamazsa, ölüm ile sonuçlanabilir. Kanser hastalığı multifaktöriyel olup, sigara kullanımı, mikroorganizmalar, kimyasallar ve radyasyon gibi dış etkenler ile kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık mekanizmaları ve metabolizma gibi iç etkenler nedeni ile de oluşabilir. Bu faktörlerin birlikte meydana gelmesi veya tek başına olması kanserin gelişmesi için yeterli olabilir. Bu etkilere maruz kalarak kanserin saptanabilir hale gelmesi on yıl veya daha fazla zamanı almaktadır [27]. Kanser ve diğer bazı hastalıkların meydana gelme olasılığında genlerin, bu hastalıklara karşı yatkınlığının olup olmadıkları konusundaki çalışmalar devam etmektedir. Kanser hastalığının oluşumunu ve ilerlemesini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki aksaklığın, nesilden nesile geçmesi ve kanserojen maddelere maruz kalan bireylerin kansere yakalanma riski normal bireylere oranla çok daha fazladır [28].

Ülkemizde 2000’li yıllardan önce en sık görülen hastalıklar sıralamasında kanser 4. sırada yer alırken günümüzde kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir (Şekil 1.1) [27, 29].

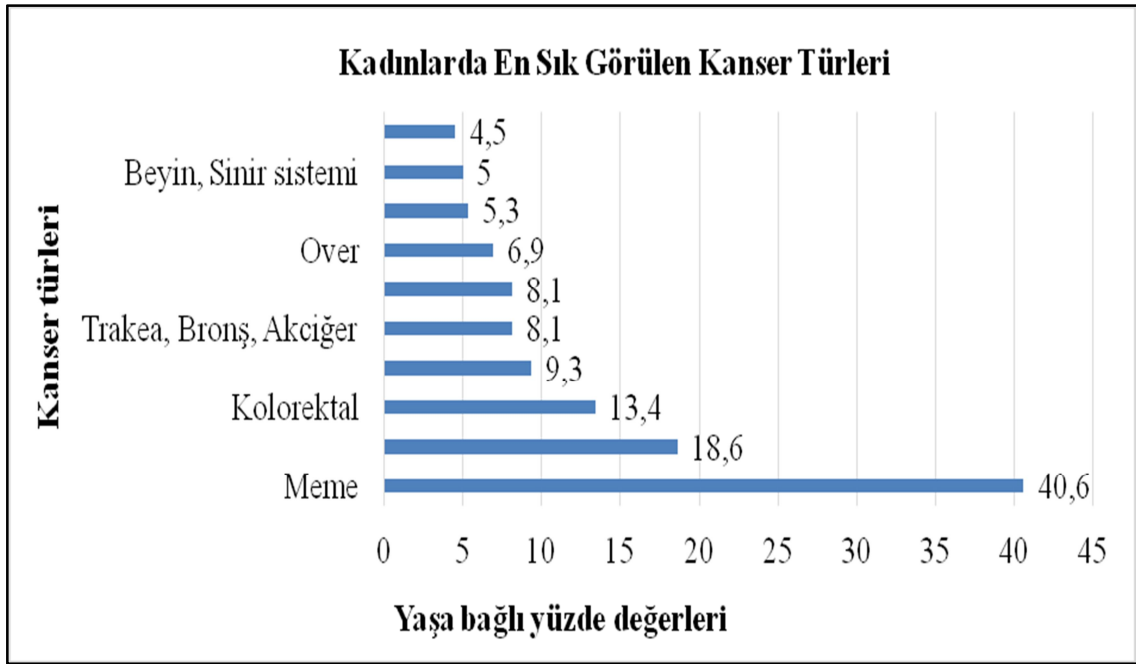


Şekil 1.1. Ülkemizde bütün yaş gruplarının her iki cinsiyeti için total ölümlerin yüzde oranı [27].

1.1.1. Meme Kanseri

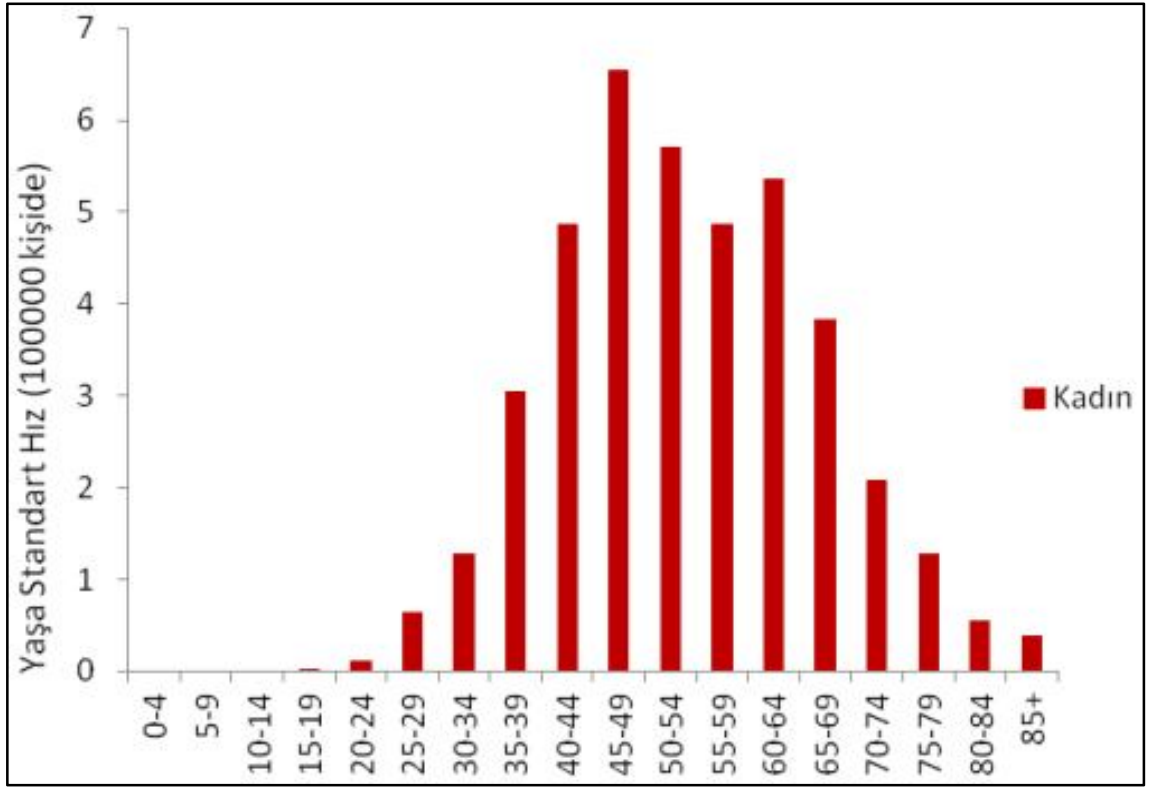
Meme dokusunda süt üreten lobüllerin oluşumunu sağlayan kök hücreleri içeren duktal lobüllerde hormon duyarlı hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler östrojen ve progesteron hormonlarından sorumludur. Bireyin tümör baskılayıcı genleri somatik mutasyon veya bir mikrop hattı ile karşılaşırsa terminal duktal lobüllerde bulunan kök hücreler malignitenin ortaya çıkmasına neden olur. Ergenlik dönemi boyunca hormon düzenlenmesini ve hücre çoğalması için DNA replikasyonunu sağlayan bu kök hücreler genelde erken yaşlara kadar hareketsiz olup tümör oluşumuna neden olmazlar. Bununla birlikte p53 geninde veya diğer genlerde bir hasar meydana gelirse bu kök hücreler replikasyonu uygun bir şekilde kontrol edemez. Hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması da proto-onkogenlerin aktivasyonunu hızlandırır. Belirli bir meme kanseri tipinde onkogenlerin aktivasyonuna rağmen meme kanserinin ortaya çıkmasında birden fazla tümör baskılayıcı genin mutasyonu söz konusudur. *BRCA1*, *BRCA2* ve *p53* genlerinde meydana gelen mutasyonlar meme kanseri riskini artırmıştır ancak bu durum meme kanserinin ortaya çıkmasında %6-8 kadar etkili olmuştur [30].

Meme kanseri kadınlarda en çok görülen malignitedir ve kadınlarda kansere bağlı ölümler içinde ilk sırada yer almaktadır. Ölüm oranının yüksek olmasının farklı nedenleri vardır. Kanser ilişkili ölüm oranının %90'ı metastaz durumu ile ilgilidir [31]. Ülkemizde farklı yaş gruplarına bağlı olarak kadınlarda görülen ilk 10 kanserin yüzde değerleri Şekil 1.2.'de gösterilmiştir [32]. Meme kanseri erkeklerde ise nadir olarak görülür. Erkeklerde görülen meme kanseri tüm meme kanserleri içerisinde % 0,6 oranında yer alırken erkeklerde görülen tüm maligniteler içerisinde ise %1'in altında bir yer almaktadır [33].



Şekil 1.2. Ülkemizde farklı yaş gruplarına bağlı olarak kadınlarda görülen ilk 10 kanserin yüzde değerleri [29].

Meme kanseri sıklığının yaşla ilişkisine bakıldığında, menapoz döneminde azalma görülmesine rağmen, menapoz sonrası yıllarda sürekli devam eden bir artış ortaya çıkarken; 45-49 yaş ve 70-74 yaşları arasında ise en sık olarak ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde meme kanserinin kadınlarda yaşa göre dağılımı Şekil 1.3'de görülmektedir [29].



Şekil 1.3. Ülkemizde meme kanserinin kadınlarda yaş grubuna göre dağılımı [29].

1.1.2. Kanser Tedavisi

Kanser hastalığının tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapi, immun terapi ve hedeflenmiş terapi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır [27]. Güncel kanser tedavisi cerrahi yöntemle neoplastik hücrelerin alınmasından sonra kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi yöntemlerinin uygulanmasını içermektedir. Kemoterapi ve radyoterapinin amacı tümör hücrelerine etki ederek onların ölmesini sağlamaktır. Bu hücreler diğer sağlıklı hücrelerden çok daha hızlı çoğaldıkları ve genç kaldıkları için radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilme yöntemine çok daha duyarlıdır [34]. Kemoterapik ilaçlar etkilerini hücre bölünmesini inhibe ederek yapmaktadır [35]. Günümüzde kemoterapinin cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kullanılması, birçok kanser türünde iyileşme oranını artırmıştır [36].

Son 25 yıldır kemoterapi ile tedavinin ilerletilmesi ile ilişkili araştırmalar artarak kanser hastalarının daha uzun yaşaması sağlanmıştır. Klinik çalışmalara bakıldığında, kanser hastaları için kaliteli hayat ve yaşam süresinin yeni kemoterapötikler ile arttığı ve bu hastaların yeni terapötik opsiyonlara açık olduğu görülmüştür. Her durumda, tedavinin

etkisi, direk olarak hedefe yönelik tedavinin kanser hücrelerini saptayarak, mümkün olduğu kadar sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürmesine bağlıdır. Hastanın yaşam kalitesi ve nihai yaşam beklentisindeki değişikliğin derecesi direk olarak hedefe yönelik terapi ile değişmektedir. Hedefe yönelik terapide, kanser hastalarının tedavisindeki seçicilik kemoterapötik ilaçların doğasının sağlıklı hücreler üzerinden çok daha yoğun olarak tek tip kanser hücrelerine etki etmesine bağlıdır. Ancak bu yoğun ilaçların çok büyük dozlarının hastaya verilmesi sistematik olarak bazı yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bazı zamanlar kanseri tamamen yok etme şansına sahip olmasına rağmen, bu yoğun yan etkiler hastanın terapiye devam etmesini engelleyebilecek derecede olabilir [35]. Kansere karşı yeni ajanların çalışılması, bu yeni ajanlar ile eski ajanların birlikte kullanılmasına dair kanser tedavisindeki gelişmeler hızlı bir şekilde devam etmektedir. Kanser tedavisindeki bu gelişmelerde belirlenen ajanların spesifik olmayan dozlarından kaynaklanan toksik etkinin giderilmesi önemlidir [37].

Radyoterapi ve bazı kemoterapötikler kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olmalarına karşı tedavinin ölümle sonuçlanması oranı çok yüksektir [38]. Çoğu kemoterapötik ilaçların etkisinde serbest radikallerin rolü büyüktür. Bu nedenle kemoterapi ile serbest radikallerin üretimi daha fazla olup oksidatif strese yol açmaktadır [39]. Ayrıca birçok antikanser ajanı, kanser hücrelerine karşı seçiciliğinin yetersiz olması nedeniyle dar bir terapötik özellik göstermektedir [40, 41].

Kemoterapötik ajanların bu yan etkilerinden dolayı bitkilere yönelik araştırmalar daha da ilgi çekmiştir. Diyetlerde yer alan ve 8000 üzerinde çeşidi olan polifenol bileşikler ile insanlarda bulunan çeşitli hastalıkların engellenmesi arasındaki ilişki son yıllardaki araştırmaların ilgi odağıdır. Bu polifenolik bileşiklerin çeşitli kanser tiplerine karşı engelleyici etkilerinin olduğu gösterilmiştir [42]. Kanser kemoterapisinin nihai amacı normal etkili sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerini öldürülebilen seçici ilaçlar geliştirmektir. Bu nedenle hem etkili hem de güvenli yeni kemoterapötik ilaçları geliştirmek için çok yoğun çalışmalara ihtiyaç vardır [43].

Bitkiler sofistike geleneksel tıp sistemlerinin gelişmesinde etkin bir rol oynamıştır. Dünya sağlık örgütünün (WHO) tahminlerine göre bazı Afrika ve Asya ülkelerinde populasyonun yaklaşık % 80'i, birinci basamak sağlık hizmetleri için geleneksel tıp

sistemini kullanmaktadır. Aynı zamanda gelişmekte olan ülkelerde populasyonun %70-80'i bitkisel ürünleri ikinci basamak sağlık hizmetlerinde de kullanmaktadır [44]. Bilim insanlarının yaptığı çalışmalara bakıldığında kansere karşı bitkisel kökenli ilaç keşfi ile klinik kullanımda mevcut olan birçok antikanser ilaçlarının gelişmesi ile sonuçlanmıştır. Bunun yanı sıra bitkisel ilaç keşfi ile antikanser özellik gösteren bitkilerin çeşitli bileşenlerinin kompleks sinerjistik etkileşimlerinin anlaşılması, yeni ve güvenli ilaçların tasarımı için platform sağlamıştır [45].

Bitkilerden üretilen antikanser ajanlar kanser tedavisinde önemli role sahiptir. Bitkilerden elde edilen bileşikler direk olarak ilaç görevi yapamaz ancak potansiyel antikanser ajanların gelişmesini kolaylaştırırlar. Bitki kökenli bileşikler örneğin paklitaksel, kamfotesin önemli ölçüde kanser araştırmalarını etkilemiştir. Bitkiler, yeni ve etkili terapi ile hastalığın mekanizmasını anlamak ve gelecekte daha etkili antikanser ilaçların keşfedilmesi için araştırmacılara olanak sağlamıştır [46].

1.2. Tıbbi Bitkiler

Tıbbi bitkiler denildiğinde, etken madde yönünden geniş bir alanı kapsamaktadırlar. Yüzyıllardan beri, bitkilerden elde edilen doğal bileşikler, hayvanlar ve mikroorganizmalar, bilimsel bir temel olmadan çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır [47]. Antik ağlardan modern zamanlara kadar, insan hastalıklarını tedavi edebilmek için tıp, eczacılık ve biyoloji alanlarında bitkilerden yararlanılmıştır. Bitkiler, iekler, yapraklar, ağaç kabukları, tohumlar, yağlar ya da kökler hakkında tarihsel metinlere bakıldığında bu metinlerin Sümerlerden eski Mısırlılara, Ortaçağ Avrupası'na kadar yüzyıllardır geri izlenebilir olduğu görülmektedir [48]. Eski zamanlardan beri bitkilerin, tıbbın geleneksel formu olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Tıbbi bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin de farmakoloji için yeni kimyasalların gelişmesinde temel olarak kullanılan biyolojik aktif bileşiklerin çoğunun kaynağı olduğu kanıtlanmıştır [49]. Bu yüzyılda tıp biliminin muazzam bir şekilde gelişmesine rağmen, günümüzde ilaç endüstrisinin ürettiği ilaçların pahalı oluşu ve sentetik ürünlerin bazı yan etkilerinin ortaya çıkması, insanların çareyi tekrar doğal bitkisel ürünlerde aramasına neden olmuş ve organik kökenli tedavi için yeni arayışlar başlamıştır [50, 51].

Son çalışmalara bakıldığında ortaçağ Avrupa tıbbında kullanılmış ya da hala kullanılan bitkilerin, kanser dahil pek çok hastalığın tedavisinde çözüm olabileceği grlmştir.

Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısı, eski çağlardan beri devamlı bir artış göstermektedir [47]. Bitkilerin kanser tedavisinde kullanılması çok uzun bir tarihe dayalıdır. Antikanser ilaç geliştirilmesinde 3000'den fazla bitki kullanıldığı [52] ve vinka alkaloidler (vinkristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin), taksanlar (paklitaksel, doksetaksel), podofillotoksin ve türevleri (etopozit, tenipozit) kamptotesin ve türevleri (topotekan, irinotekan), antrasiklinler (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, idarubisin), ve diğerlerinin [53] yer aldığı güncel antikanser ajanlarının %60'ının doğal kaynaklı olduğu belirtilmiştir [54]. Hala da günümüzde kanser hastalığının tedavisi için bitkilerden farmakolojik olarak aktif bileşiklerin izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları devam etmektedir [55].

Tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ekstre, drog vb. ürünler tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tıbbi bitkilerden elde edilen ekstrelerin çoğunun biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları hakkındaki bilimsel veriler hala yetersizdir. Bu nedenle, tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ürünlerin biyolojik etkilerinin bilimsel olarak araştırılmasına olan ilgi her geçen gün artmaktadır [56,57]. En yeni klinik bilimsel çalışmalar bitkilerin içerdiği sekonder metabolitlerin ve türevlerinin incelendiği uygulamalardır [58].

1.2.1. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.)

Gilaburu (*Viburnum opulus* L.), Adoxceae [18] familyasına ait, kökeni Avrupa, Kuzey Afrika ve Kuzey Asya'ya dayanan, dünyanın hemen her yanında dekoratif amaçlı olarak kullanılan bir çalı bitkisinin meyvesidir (Şekil 1.4). Dünyada European cranberrybush, American cranberrybush, cranberry tree, guelder rose, wild guelder rose, gueldres-rose, cherry-wood, rose elder, snowball bush, crampbark tree ve whitten tree gibi alternatif isimlerle, Türkiye'de ise bölgeden bölgeye değişen gilaburu, gileburu, girabolu, girebolu, gülebru ve gili gili gibi adlarla anılmaktadır [59].

Viburnum cinsine ait türler Batı ve Doğu Avrupa bölgesinde yaygın bir şekilde yetişmektedir. Avrupa bölgeleri dışında Kuzey Asya bölgesinde de yetişmektedir [60]. Gilaburu Türkiye'nin Orta Anadolu Bölgesinde yetişen önemli bir bitkidir. Gilaburu genellikle yazın sıcak ve kuru iklim koşullarında yetişmektedir. Gilaburunun yetişmesi hızlıdır ve derin sürgünleri sayesinde uzun süren hayat döngüsü vardır ve ekiminin 2-3

yıl sonrasında meyve vermeye başlar. Meyveleri yaz sonunda küre şeklinde, demetler halinde ve her demette 30-40 kadar meyve olacak şekilde yetişir (Şekil 1.4) [18, 61]. Meyve suyu verimliliği ise %43,5 civarındadır [61].



Şekil 1.4. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesi [18]

Orta Anadolu bölgesinde gilaburu meyveleri toplandıktan sonra, meyveleri yıkanır ve 3 ay süre ile su içerisinde bekletilir. Bu işlem sonunda meyveler daha olgun hale gelir. Meyveler geleneksel yöntemler kullanılarak ezilerek sıkılır 1:4 oranında sulandırılıp şeker ilave edilerek tüketilir [62]. Bir diğer kullanım şekli de Nisandan Ağustosa kadar geçen zamanda dallarının kabukları soyularak kurutulur ve kaynatılarak içilir. Gilaburu 2. sınıf şifalı bir bitkidir. Gilaburunun kabuk ve meyveleri astım, epilepsi, yüksek tansiyon, bazı kalp problemleri, sinir sistemi bozukluklarında, egzema gibi deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Böbrek taşı ve kumunun eritilmesinde, karaciğer ve safra hastalıklarının tedavi edilmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu bitkinin ana dalları kullanılarak menstrüal sancı ve kramplarının iyileştiği bildirilmiştir [63].

Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında *Viburnum* bitkisinin bazı türlerinin dallarından, yapraklarından ve meyvelerinden hazırlanan su, metanol ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada *V.opulus* türünün *V. lantana* türünden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur [64]. Sağdıç ve ark. [65] gilaburunun kurutulmuş meyve ekstraktının antioksidan ve antimikrobiyal

aktivitelerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise ahududu (*Rubus ideaus* cv. Heritage,), gilaburu (*Viburnum* spp.), mürver (*Sambucus* spp.) kuşburnu (*Rosa canina* var. *canina* L.) gibi üzüksü meyvelerin antioksidan kapasiteleri karşılaştırıldığında en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan meyvenin gilaburu olduğu görülmüştür [66]. Gilaburu meyvesinden elde edilen ekstrakt incelendiğinde askorbik asit ve polifenolik bileşiklerin oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu bitki türünün insan bağışıklık sisteminde rol oynadığı ve daha birçok hastalığı önlemede etkili olduğunu öne sürülmüştür [67]. Cesoniene ve ark., *V. opulus*'un biyolojik çeşitliliği ve biyokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Total fenolik bileşikleri, askorbik asit miktarlarını karakterize etmişlerdir. Biyolojik olarak aktif olan bu bileşiklerin *V. opulus* türünün meyvesinde büyük miktarlarda bulunması, bu türün güçlü antioksidanlar olarak kullanılabileceklerini önermişlerdir [60]. Gilaburunun meyvesinin içerdiği fenolik bileşiklere bakıldığında gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, sirinjik asit, kumarik asit, vanilik asit ve quersetin yönünden zengin olduğu ve bunlara ek olarak gilaburu meyvesinin bileşiminde organik asitlerden malik, suksinik, tartarik, fumarik ve asetik asitlerinin bulunduğu bildirilmiştir [68]. Bu bitkinin, metabolik süreçler sonucunda bitkilerde oluşan organik asitler ve fenolik bileşikler yönünden zengin olması antioksidan olarak kullanılabileceğini göstermiştir [66]. Gilaburu meyvesinin suyunun incelendiği çalışmalarda ise gilaburu meyve suyunda bulunan glikoz, fruktoz, sakaroz gibi bazı şekerlerin ve C vitamini yönünden zengin olmasıyla bağışıklık sistemini uyaran bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [68]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada gilaburu suyunun etkisi deneysel olarak oluşturulan fare kolon kanseri üzerinde denenmiş ve kanser oluşumu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ancak kanser gelişimini engellediği rapor edilmiştir [24]. *V. opulus* türünün yüksek antimikrobiyal potansiyeli ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu, antioksidanların, serbest oksijen radikaller tarafından meydana gelen oksidatif stres sonucunda DNA hasarının neden olduğu hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde serbest oksijen radikalleri yakalayarak bu hastalıkların oluşum riskini azaltmada etkin olabileceği belirtilmiştir [69].

1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Yaşamımız için vazgeçilmez olan oksijen belli koşullar altında insan sağlığına olumsuz etki edebilir. Bu etki, oksijenin moleküler durumu ile ilgili olup, aerobik metabolizma

sürecinde oksijenin moleküler formunun azalmasından dolayı türevlenen potansiyel olarak reaktif moleküllerin oluşmasıdır. Serbest radikaller enzimlerin çeşitli etkileri ile oluşabilirler. Normal koşullar altında serbest radikallerin konsantrasyonları fizyolojik antioksidanlar ile kontrol altına alınmaktadır. Serbest radikallerin aşırı derecede üretilmesiyle antioksidanların tükenmesi sonucunda serbest radikaller lipitlere, proteinlere, şekerlere ve DNA'ya oksidatif hasar yüklemektedir. Bu redüksiyon-oksidasyon eşitsizliği oksidatif stres olarak bilinmektedir ve bu durum doku hasarı süreci ve gelişmesine neden olarak, çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynamaktadır [70]. İşte tam da bu noktada antioksidanlar devreye girer. Bu zararlı etkiler antioksidan enzimlere ek olarak enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından dengelenebilir. Bu antioksidan koruma sistemleri serbest radikalleri direk olarak ortadan kaldırdıkları için biyolojik sistemler için maksimum koruma sağlarlar. İyi bir antioksidan, spesifik olarak serbest radikalleri yok etmeli, metallere kuvvetli bir şekilde bağlanmalı, antioksidan ağı içerisinde diğer antioksidanlar ile etkileşimde olmalı, gen ekspresyonu üzerinde pozitif etkiye sahip olmalı, kolayca absorbe edilmeli, fizyolojik olarak doku ve vücut sıvısı içerisinde uygun seviyede konsantrasyona sahip olmalı ve hem zar hem de membran bölgelerinde çalışır olmalıdır. Antioksidan koruma sistemindeki enzimler süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazdır [71]. Antioksidan koruma sistemindeki enzimatik olmayan antioksidanlar ise ürik asit, C vitamini, flavonoidler, A vitamini, melatonin, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubikinon (koenzim Q10), bilirubin, mannitol, E vitamini, lipoik asit ve hemopeksin gibi bileşiklerdir [72].

1.3.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi (SOD, EC1.15.1.1), en etkili hücre içi antioksidanlardan biridir. SOD, $O_2^{\cdot-}$ nin O_2 'ye ve daha az reaktif bir tür olan H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler. Bu enzim 1939 yılının başlarında izole edilmiştir fakat 1969 yılında Mccord ve Fridovich tarafından antioksidan aktivitesi kanıtlanmıştır [73]. SOD aktif metal bölgesinin doğasındaki farklılık ve aminoasitlerin alt ünitelerinin sayılarındaki farklılıklar, kofaktörler ve diğer özellikleri nedeni ile birkaç farklı izoformda bulunur. İnsanda SOD'un üç farklı formu bulunmaktadır: hücre dışı SOD (EC-SOD), sitozolik Cu, Zn-SOD ve mitokondrial Mn- SOD formlarıdır [74].

Cu, Zn-SOD 32 kDa ağırlığında ve tanımlanmış iki alt üniteden oluşur. Cu, Zn-SOD spesifik olarak süperoksit anyonunu oksijen ve suya dismutasyonun katalizler. Her bir alt ünite bakır ve çinko iyonları tarafından oluşturulan metal kümelerin bağlanması için aktif bölge içerir. Mitokondrial Mn-SOD (96 kDa) homotetramer yapıda olup her alt ünite bir manganez atomu bulunmaktadır [71]. Mn-SOD antitümör aktiviteye sahip olan en etkili antioksidan enzimdir. Farklı hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar Mn-SOD'un aşırı ifade edilmesi sonucunda tümör büyümesinin gerilediği görülmüştür [75]. Hücre dışı süperoksit dismutaz, bakır ve çinko içeren glikoprotein, heparin ve heparin sülfat içeren belirli glikozaminoglikanlar için yüksek afinite gösteren tetramerik yapıdır [71].

1.3.2. Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi (EC 1.11.1.6) bitkiler, hayvanlar ve aerobik canlılarda bulunur. Katalaz peroksizom olarak adlandırılan hücre organelinde bulunmaktadır. Bu enzim hidrojen peroksitin moleküler oksijene ve suya dönüşmesinde çok etkilidir. Katalaz bütün enzimler içinde en yüksek dönüştürme oranına sahiptir. Katalazın bir molekülü hidrojen peroksitin 6 milyon molekülünü suya ve oksijen molekülüne dakikada dönüştürebilir [71].

1.3.3. Glutatiyon Peroksidaz (GPx)

Glutatiyon metabolizması antioksidan koruma için en önemli metabolizmalardan biridir. Glutatiyon peroksidaz enziminin iki farklı formu bulunmaktadır. Bunlardan biri selenyum bağımlı glutatiyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), diğeri ise selenyum bağımsız olan glutatiyon-S-transferazdır (EC 2.5.1.18), Bu iki enzimin alt ünitelerinin sayıları, katalitik mekanizmaları ve selenyumun aktif merkez bölgeye bağlanma niteliği birbirlerinden farklıdır [71].

Bütün GPx enzimlerinin, selenolez (Se-OH) oluşumu ile peroksidazları indirgemek için iki elektron eklediği bilinmektedir. GPx, hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunan tripeptit glutatiyon (GSH) ile birlikte hareket etmektedir. GPx'in katalitik reaksiyonu için substrat H_2O_2 ya da organik peroksit olan $ROOH$ 'dır. GPx peroksitleri, GSH'ın okside olmasıyla eş zamanlı olarak suya dönüşmektedirler. GPx oksidatif stresin düşük

seviyelerine karşı korumanın ana kaynağı ve substrat olarak kullanılan H_2O_2 için katalaz ile yarış içerisinde [76].

1.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR) aynı zamanda glutasyon-disülfid redüktaz (GCT) olarak da bilinen insanda GSR geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Glutasyon redüktaz (EC 1.8.1.7) oksidatif strese karşı dirençte önemli bir molekül olan glutasyon (GSH) formundan sülfidril, glutasyon disülfid (GSSG)'e azalmasını katalizler. Glutasyon redüktazın fonksiyonu dimerik yapıda olan disülfid oksidoredüktaz olarak glutasyonun iki molekülü için, glutasyon disülfid bir molekülünü azaltmak için NADPH ve flavin adenin dinükleotid (FAD) prostetik grubu kullanır [77].

1.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen serbest radikaller, hem zararlı hem de yararlı etkilere sahiptirler [76]. ROS sayesinde hücrel sinyal iletiminin fonksiyonun düzgün çalışması ve enfeksiyöz ajanlara karşı hücrel cevabın doğru olarak verilmesi sağlanmaktadır. Ayrıca ROS'un düşük konsantrasyonlarında mitojenik cevabın indüklenmesi sağlanır. ROS'un yüksek konsantrasyonlarda olması ise nükleik asitler, proteinler, lipitler ve membranları içeren hücrel yapıya zarar vermektedir [78]. Serbest radikaller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya molekül olarak tanımlanır. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki moleküller ise tek elektronludur. Elektronların bu dizilimi kararsız olduğundan tek elektronlu bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir elektron ile iletişime girerek, hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar. Serbest radikaller fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozarlar [79]. İki serbest radikalın birbiri ile reaksiyonu sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkarken, her iki serbest radikalda ortadan kaldırılır. Buna karşın, bir serbest radikal, serbest radikal olmayan bir molekül ile reaksiyona girerse diğer bir serbest radikal oluşur. Bu özelliğinden dolayı serbest radikaller zincir reaksiyonu oluşturabilirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sırasında oluşmaktadır [80].

1.4.1. Hidroksil Radikali (OH)

Hidroksil radikali sulu çözeltiler içerisinde yarılanma ömrü 1sn'den bile çok daha kısadır ve bu nedenle oksijen radikalleri içinde en reaktif radikaldir. Bu özelliği nedeniyle en toksik radikal olup, kaynağından fazla uzaklaşmadan en yakın hedefleri etkiler [81].

1.4.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksidin önemli miktarlarda üretiminin mitokondride olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Hidrojen peroksit molekülü eşleşmemiş elektron içermemektedir ve bu nedenle radikal bir tür değildir. Fizyolojik koşullar altında hidrojen peroksit üretiminin, organizma tarafından alınan total oksijenin yaklaşık %2' si kadar olduğu tahmin edilmektedir [82].

1.4.3. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Moleküler oksijene fazladan bir elektron bağlanmasıyla onu redükleyerek süperoksit serbest radikal anyonunu meydana getirir. Zayıf bir oksidan olarak O₂⁻ kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz. Milisaniyelik bir yarı ömürle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. O₂⁻, oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi buna karşı organizmayı korur. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması, geçiş metal iyonlarını redüklemesi ve nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturmaktır [83].

1.4.4. Nitrik Oksit (NO[•])

Nitrik oksit (NO[•]), nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizması, düz kas gevşemesi ve bağışıklık regülasyonunu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerin büyük bir kısmında önemli oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak görev yapan reaktif radikaldir [84]. Bu küçük molekül orbitalinde eşleşmemiş bir elektron bulunduran radikaldir ve yarılanma ömrü çok kısadır. Nitrik oksit biyolojik dokularda spesifik nitrik oksit sentezi tarafından oluşturulur [85].

1.4.5. Lipit Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, lipitlerin oksidatif olarak yıkılmasıdır. Hücre membranındaki lipitlerden serbest oksijen radikallerin elektron çalması ile hücre hasarı meydana gelir. Bu süreç serbest radikal zincir reaksiyon mekanizması ile gerçekleşmektedir. Lipid peroksidasyonun da en çok doymamış yağ asitleri etkilenmektedirler. Çünkü onlar yapılarında özellikle reaktif hidrojenleri bulunduran metilen köprüleri ($-\text{CH}_2-$) ile birden fazla çift bağ içermektedirler. Bu bağların kırılmasıyla lipid peroksidasyonun son ürünleri olan serbet radikallerin ikincil habercisi olarak görev yapan, temel bioaktif markır olan tiyobarbitürik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE) gibi son reaktif aldehytler oluşur ve hücre düzeyinde hasarı başlatırlar. MDA hücrede toksik strese neden olan birçok reaktif elektrofilik türlerden biridir [86].

1.5. Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türleri hem hücre içi, hem de hücre dışı bileşikler tarafından üretilebilir. Potansiyel hücre içi kaynaklar mitokondri, sitokrom p450 metabolizması, peroksizomlardır. Hücre dışı kaynaklar ise genotoksik olmayan karsinojenleri içeren çevresel ajanlar, direk veya dolaylı olarak hücrelerde serbest radikal üretimine neden olabilir. Hücrede serbest radikal üretiminin artması ve hücrenin çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalmasını takiben oksidatif stres ve hasarın indüklenmesi meydana gelir. Bu nedenle “Reaktif Oksijen Türleri” (ROS) endojen ve eksojen kaynaklı oluşabilir [87]. Fagositik hücreler, nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller gibi yapılar endojen kaynaklar iken, güneş ışığı, UV- ışınları, sigara dumanı, ozon, kükürt dioksit, egzoz gazları da ROS üreten eksojen kaynaklardır [88].

1.6. Oksidatif Stres ve Karsinogenez

Reaktif oksijen türleri prensip olarak bütün hücrenel bileşenleri aktif olarak harekete geçirebilir ya da tamamen yok edebilir. Reaktif oksijen türleri kademeli olarak ortaya çıkan hücre dışı sinyalleri hücre içine sekonder taşıyıcı olarak iletebilir ve aynı zamanda, hücrenel yaşlanmayı ve ölümü hızlandırabilir olması nedeniyle de kararsız yapısını kanıtlamıştır [76]. Bir insan hücresi gün içerisinde hidroksil radikali ve diğer reaktif türlerinden yaklaşık olarak 1.5×10^5 oksidatif tepki almaktadır [89]. Reaktif

oksijen türlerinden hidroksil radikali DNA molekülerinin bütün bileşenleri ile reaksiyona girerek hem pürin hem de pirimidin bazlarının ve aynı zamanda deoksiriboz omurgasının değişmesine neden olmaktadır. Bu oksidatif hasar sonucunda genetik materyalin sürekli olarak değişmesi, mutagenез, karsinogenез ve yaşlanmanın ilk adımını temsil etmeye başlar. Aslında çeşitli kanser dokularında serbest radikaller aracılığı ile DNA hasarının olduğu tahmin edilmektedir. ROS tarafından indüklenmiş DNA hasarı tek ya da çift sarmal kırılmalarını, deoksiriboz modifikasyonlarını ve DNA çapraz bağlanmalarına sebep olabilir. Bu DNA hasarı ile karsinogenез ile ilişkili olan genomik tutarsızlık, replikasyon hataları, sinyal transdüksiyon yolunun ve transkripsiyonun indüklenmesi veya tutuklanması ortaya çıkabilir [90]. En ciddi insan hastalıklarının birçoğu, dokulardaki oksidatif hasarın ne kadar kararlı olup olmadığı ile ilişkilidir. Bireysel düzeyde bu hasar hastanın oksidatif stres durumu olarak tanımlanır. Oksidatif stres, ortalama tüketilen oksijen oranı için reaktif oksijen türlerinin üretiminin normal oranda olmasına dayanır. Oksidatif stres durumu, kanser, kalp hastalığı, diyabet ve alzheimer hastalığı gibi, ilerleyen yaş durumuna bağlı olan hastalıkların birçoğu ve aynı zamanda, yaşlanmanın kendisi ile ilişkilidir. Genel olarak bireyin oksidatif stres durumunun yüksek olması hastalığın gelişmesi için daha yüksek risktir [91]. Birçok farklı insan hastalıkları ve fonksiyon bozukluklarının oksidatif stres ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [91]. Oksidatif stresin yaşa bağımlı kanserin gelişimiyle ilişkili olması muhtemeldir. Tümörün gelişimi sürecinde reaktif oksijen türlerinin, kanser hücrelerinin onkogenik fenotiplerini koruması ve indüklenmesinde etkili olduğu öne sürülmüştür. Karsinogenез sürecinde normal hücreler ile çeşitli kanser hücreleri karşılaştırıldığında hücrel redoks tepkimenin oksidatif stres tarafından indüklendiği ya da bu redoks tepkimenin onkogenik bir uyarım olduğu belirtilmiştir. Çeşitli tümörlerde DNA mutasyonu karsinogenез için çok önemli bir adımdır ve bu durumun oksidatif DNA lezyonlarını kat kat artırdığı ve DNA hasarının olmasının karsinogenез süreci başlattığı bildirilmiştir [76]. Oksidatif stres ile reaktif oksijen türler DNA'ya direk olarak zarar verebilir. Dahası mutajenik olup aynı zamanda apoptozu baskılayarak hasarlı hücrelerin çoğalmasını teşvik ederek yerleşmelerini ve metastaz oluşturmalarına neden olabilirler [92]. ROS'dan kaynaklanan oksidatif hasarı yok etmek için hücrenin antioksidan koruma sisteminin olmasına rağmen, oksidatif hasarın hayat döngüsü boyunca birikmesi DNA'ya proteinlere ve lipitlere etkili bir şekilde hasar vermesi yaşa bağımlı olarak kanser, damar sertleşmesi, eklem iltihabı, sinir sistemi hastalıkları ve diğer hastalıkların

gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kanser sürecinde oksidatif stresin artmasıyla antioksidan koruma sisteminin arttığı bilinmektedir [93]. İnsandaki karsinogenez süreci ve patogenezi altında yatan mekanizmaların içyüzünün kavranmasında, bu süreç boyunca hücrenin antioksidan koruma mekanizmasının nasıl değiştiğini anlamada deneysel hayvan modelleri kullanılarak oluşturulan, deneysel tümör modelleri önemli katkılar sağlayabilir.

1.7. Kanser Çalışmalarında Deneysel Modeller

Kanser için kullanılan tedavi yöntemleri, önceki çalışma alanlarının teknik ve eğitimlerini kullanarak sistematik olarak sürekli gelişmektedir. Aslında, ilaç geliştirme araştırmalarında, hayvan modelleri önemlidir [94]. Hayvan modelleri hücre tabanlı deneyler ile yeni geliştirilen ajanların insanlarda görülen kanserlerde kullanımına olanak sağlayan bir köprü vazifesi görür. Hastalık gelişimi ve progresyonun incelenmesine, yeni tedavilerin test edilmesine olanak sağlar. Hazırlanan modeller insan patolojisine olabildiğince yakın olmalıdır. Kullanılan hayvanlar genellikle kemirgenlerdir. Sıklıkla fare ve sıçanlar tercih edilir. Bu hayvanların üretimi kısa ve kolaydır. Bakımları ucuzdur ve bazı özellikleri genetik olarak değiştirilebilir [95]. Yeni hücre kültürü ve moleküler biyoloji tekniklerine rağmen hayvan modelleri, tedavi için uygulanan ajanlarının kesilmesi veya devam ettirilmesi durumunda metabolizmanın koruma tepkisinin öğrenilmesi için kullanılmaktadır. Deneysel kanser araştırmalarında son üç yüz yıldır özellikle kimyasal karsinojenler ile transplante ve spontane tümör modelleri ön plana çıkmıştır. Bu modellerin sıklıkla tercih edilmelerinin nedeni diğer modellerden daha kolay uygulanabilir olup özelliklerinin daha iyi tanımlanmış olması ve saklanabilir olması, en önemlisi ise araştırma merkezlerinde kolayca üretilebilir olmalarıdır [94].

1.7.1. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller

Kimyasal karsinojenler 20. yüzyılın ortalarında deneysel hayvan çalışmaları ile ilerletilmiştir. Karsinogenezin ilk basamağı normal hücrelerin kimyasal veya fiziksel karsinojenlere maruz bırakılarak tümörün başlamasıdır. Kimyasal karsinojenler, seçici büyüme avantajı kazandıran duyarlı hücrelerde genetik ve epigenetik değişikliklere neden olurlar. Bu hücreler neoplastik hücreler içerisine göç edebilir, genomik olarak stabil yapıları bozulabilir ve klonal genişleme altında kalabilirler. Bu karsinojenler DNA'da ve normal hücreler etrafında bulunan düzgün çoğalmalarını sağlayan diğer

hücresel makromoleküllerde genetik hasar meydana getirirler [96]. Kimyasal ve fiziksel karsinojenler deney hayvanlarına enjekte edilmelerine göre farklı kanser modellerini ortaya çıkarırlar. Karsinojenler subkutan, intraperitoneal, intravenöz veya intramusküler şekilde verilebilir [94]. Yapılan çalışmalara bakıldığında çok yüksek sıcaklıklarda organik bileşikler tarafından üretilen polisklik aromatik hidrokarbon olan oldukça karsinojenik özellik gösteren 3-methylcholanthrene maddesi [97] ve 1×10^6 hücre 0,1 ml solüsyon içerisinde homojen bir şekilde DBA/2 cinsi farelere intraperitoneal olarak verilmiştir ve lenfositik lösemi modeli oluşturulmuştur ve bu model P388 leukemia modeli olarak adlandırılmıştır. 3-methylcholanthrene maddesi DBA/2 cinsi farelere 0.1 ml etil eter içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde verilmiştir ve lenfoid lösemi modeli oluşturulmuştur ve bu model L1210 leukemia modeli olarak adlandırılmıştır. Bu her iki kanser modelinin farklı cins farelere pasajı yapılmıştır. Bu kanser modelleri yıllar boyunca ilaç tedavileri için kullanılmıştır. Her iki modelin avantajı da insan tümör ksenografi ya da transgenik modeller ile karşılaştırıldıklarında hızlı bir şekilde tekrarlanabilir ve nispeten daha az maliyet gerektirmeleridir [98]. Başka bir çalışmada yine polisklik aromatik hidrokarbon yapıda olan mutajenik, karsinojenik ve immun baskılayıcı özellikleri olan 7,12-Dimethylbenzanthracene (DMBA), dişi sprague dawley cinsi ratlara oral olarak verilmiştir. DMBA'nın verilmesinde 90 gün sonra dişi ratların %90'ında meme bezlerinde kanser oluşmuştur. Bu model DMBA tarafından indüklenmiş meme tümörü olarak adlandırılmıştır [99]. Farklı bir çalışmada 1,2 Dimethylhydrazine (DMH) kullanılmıştır. Dimethylhydrazine ait iki izomerlerinden biri olan 1,2 Dimethylhydrazine, DNA metilleyici ajan olarak görev yapan potansiyel karsinojen olan bir maddedir. Balb/c farelere 12 hafta boyunca DMH subkutan olarak enjekte edilmiştir ve sonuçta da DMH ile indüklenmiş kolon kanseri modeli oluşmuştur [24]. Bir diğer çalışmada Mutajen X (MX) kullanılarak midede adenokarsinom tipi kanser modeli oluşturulmuştur [100]. Mutajen X ya da 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-5H-furan-2-one olarak bilinen bu madde doğal humik asit ile klorinin reaksiyonu sonucunda üretilir. MX'in bütün dünyada klorlu içme suyunda bulunduğu bilinmekte olup çevresel karsinojen olarak kabul edilmektedir [101].

1.7.2. Xenograft Model

Bu modelde insan hücrelerini reddetmeyecek, bağışıklık sistemi çökertilmiş farelerde kanserin kökenlendiği organ içerisine ya da deri altına insan tümör hücreleri transplante

edilmektedir. Bu ksenograft modeli atimik nude farelere hızlı bir şekilde uygulanabilmektedir. Atimik nude fareler dışında bağışıklık sistemi baskılanmış veya bağışıklık sistemi yetersiz olan farelere de uygulanabilir. Bu modelde tümörün gelişmesi transplante edilen tümörün büyüklüğüne ya da enjekte edilen hücre sayısına göre değişmektedir. Yaklaşık olarak tümör 1-8 hafta içinde ya da bazı durumlar da 1-4 ay veya daha uzun süre de gelişmeye başlamaktadır. Bu süre içerisinde *in vivo* çalışmalar için terapötik ajanların etkilerinin gözlemlenmesi mümkündür. Kolon ve akciğer kanserlerinin oluşması ve *in vivo* çalışmalarda terapötiklerin değerlendirilmesinde ortotopik xenograft model tercih edilmektedir [102].

1.7.3. Transgenik, Kimerik veya Knock-out Modeller

İnsan meme kanseri altında yatan patogenezi anlayabilmek için transgenik fareler tercih edilmektedir. Bu model ile hormonal etkilerden, kullanılan kemoterapötik ilaçların etkilerine kadar araştırma yapılabilir. Bu modeller transgenik promotörlerin meme bezine hedef transgenin ekspresyonu için kullanılmaktadır. Transgenik fare modellerinin avantajlı olmalarının nedeni deney hayvanına kendinden farklı olan genlerin eklenerek tümör oluşumunu daha kolay hale getirmeleridir. Bu nedenle bu modelin karsinogenez süreci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Transgenik modeller dışında belirli bazı spesifik genlerin yok edilerek deney hayvanının kansere yatkınlığının fazlalaştırıldığı knock-out modelleride *in vivo* çalışmalarda tercih edilmektedir [103].

1.7.4. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modeller

Bu tümör modelinde kendiliğinden oluşan tümör hücrelerinin bir fareden diğer bir fareye transplantasyonu söz konusudur. Tümör hücrelerini enjeksiyon şekline göre solid ve assit formları bulunmaktadır. Tümör hücresinin subkutan olarak enjekte edilmesi solid tümörü, intraperitoneal olarak enjekte edilmesi ise assit tümörü oluşturmaktadır. Tümör hücrelerinin subkutan olarak uygulandığı durumlarda tümör daha uzun sürede fark edilir ve farelerin ölümleri daha uzun süre de olur. Transplantasyonun gerçekleşmesi için her iki deney hayvanında aynı genetik kökene sahip olması gerekmektedir. Bu modelde tümörün ilerleme sürecinde hiçbir şekilde baskılanmamış bağışıklık sisteminin katkılarını ve eş zamanlı olarak donör ve alıcı arasındaki durumu araştırmaya uygun olmalıdır. Örneğin Balb/c türü farenin meme dokusundan türemiş

olan 4T1 hücreleri, genetik olarak benzer bir farenin yağ dokusu içerisine eş zamanlı olarak enjekte edildiğinde akciğer, karaciğer, kemik ve beyine metastaz oluşturduğu görülmüştür [104].

1.7.4.1. Ehrlich Assit Tümör (EAT) Modeli

Son 20-30 yıl içinde transplante edilebilen tümör üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu araştırmaların asıl amacı kanser terapisi için deney hayvanlarında deneysel tümörler için yeni teknikleri ilerletmek olmuştur. Modellemenin amacı için deneysel tümörler büyük önem taşımaktadır ve Ehrlich assit (karın bölgesinde sıvı toplanması) tümör (EAT) en yaygın olanıdır. EAT ilk olarak dişi bir farede spontane bir şekilde meme kanseri olarak görünmüştür [105]. Daha sonra Ehrlich ve Apolant tarafından bir fareden bir fareye eş zamanlı olarak transplante edilerek deneysel tümör olarak kullanılmıştır [106]. 1932 yılında Loewental ve Jahn, farenin peritonu içerisindeki sıvıyı kanser hücreleri ile birlikte likit formundan dolayı ehrlich assit karsinom olarak adlandırmışlardır [107]. Lettre ve arkadaşları 2. Dünya Savaşı boyunca bu kanser hücre hattının kalitatif ve kantitatif kanser için uygun test sistemi haline getirmeye çalışmışlardır [108]. 1948 den sonra da EAT hücreleri araştırmaları dünya çapında hızlı bir şekilde artmıştır. EAT hücrelerinin, tümör spesifik antijenlere (TSTA) ihtiyaç duymaması, %100 kötü huylu tümör olması, çok kısa ömürlü olması, regresyon göstermemesi ve hızlı çoğalması, yüksek transplante özelliğinin olması, hiperdiploid yapıda olması ve farklılaşmamış kanser olmasından dolayı tercih edilme oranı fazladır [105].

1.7.4.1.1. Ehrlich Assit Tümörü

Tümör hücrelerinin peritoneal boşluk içerisine enjekte edilmesinden sonra çoğalan neoplastik hücreleri içeren efüzyonun gerçekleşmesi assit terimi ile ifade edilir. Genellikle bu tür tümör modellerinde dereceli olarak çoğalma gözlenirken, tekrarlayan pasajlarla tümör virülansı artar. Differansiasyon gitgide kaybolur ve gelişmeyi kontrol eden başlıca mekanizmalardan serbest kalır ve sonunda, heterotransplantabilite kabiliyeti kazanarak assit formuna dönüşür. Assit sıvısı gri-beyaz renkli veya bazen de hafif kanlı viskoz halinde olup 1cc içerisinde 10 milyon neoplastik hücre içermektedir [109].

Ehrlich assit formunun elde edilmesiyle birlikte, assit sıvısı araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Çok fazla tercih edilmesinin nedeni EAT hücresini içeren süspansiyonun homojen şeklinde olması ve bunun sonucunda kantitatif olarak belirli hücrenin bir başka fareye transplante edilmesidir. Assit sıvısının kullanılması ile transplante edilen hücrenin sayısının belirlenmesinin yanı sıra tümör büyüklüğü de temel sayaç sistemleri ile belirlenebilir [110].

Farenin peritoneal boşluğu içerisindeki süspansiyonda yetişen hücreler *in vitro* koşullarda sentetik yüzeylere tutunamazlar [111]. Assit sıvısının farenin peritonu içerisine enjekte edilmesinden 4-6 gün sonra yaklaşık 5-12 cc assit teşekkül eder [105]. Assit sıvısının inokülasyonundan sonra hücreler iki fazda yetişir. İlk faz çoğalmanın katlanarak olduğu proliferasyon fazı, ikinci faz ise hücre sayısının sabit kaldığı dinlenme fazını takiben olan plato fazıdır [112]. Yapılan çalışmalara bakıldığında 3×10^6 EAT hücresinin peritoneal boşluğa enjekte edilmesinden sonra 9. güne kadar hücreler sürekli olarak artmıştır. Hücreler 9. ve 10. günden sonra proliferasyon fazından plato fazına geçmeye başlamıştır [113]. Başka bir çalışmaya göre 10^7 EAT hücresinin peritoneal boşluğa enjekte edilmesinden sonra hücreler 4 faz sergilemiştir. Hücreler 4-5 gün boyunca logaritmik fazda kalmıştır. Plato fazında, 5. ve 13. günler arasında, hücre sayısı hemen hemen sabit kalmıştır. 13. ve 15. günler arasında geçici proliferasyon fazına girmiştir. 15. ve 18. günler arasında ise ikinci plato fazına geçerek hücre sayısı tekrar sabit hale gelmiştir [114]. Proliferasyon fazından plato fazına kadar, yapısal bozulma [115] mitokondri sayısının azalması, DNA ve RNA sentezinin azalması, bazların nükleozitlerin, purin ve pirimidin nükleotidlerinin hücre içerisinde kaybolması, ATP konsantrasyonunun düşmesi, protein sentezinin azalması, [116] timidin kinaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak timidinin artması, [117] glutatyon (GSH) konsantrasyonunun azalması, [118] trigliseridler kolesterol ve serbest yağ asitlerinin artması gibi morfolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelmektedir [119].

EAT hücrelerinin sayıları çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleriyle artar ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu çoğalmaya paralel olarak assit sıvısı da birikir belli bir zaman sonra da konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç hem de tümörün organizmaya verdiği hasar sonucunda ölür. Sıvı EAT bazı ilaçların özellikle de kemoterapide kullanılan ilaçların tümörler üzerindeki etkilerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir tümör modeli olmuştur [119].

1.7.4.1.2. Ehrlich Solid Tümörü

Ehrlich solid tümörü Ehrlich ve Apolant tarafından geliştirilmiştir [108]. Ehrlich tümörü hücrelerinin deri altı verilmesiyle bir haftada yaklaşık 1cm çapında tümör elde edilir. Bu büyüklüğe ulaştığında tümörün ortasında bir miktar nekrotik saha vardır. Tümör hücreleri eşit büyüklükte değildir ve çapları 20- 30 mikrondur [109]. Tümörün en dış kısmında ise fibröz bir kapsül bulunduğu belirtilmektedir [111]. Solid tümörün oldukça yavaş büyümesi yüksek oranda hücre ölümünden kaynaklanmaktadır [119]. Tümörün tutma oranının yüksek oluşu, hızlı gelişmesi ve infiltratif büyüme göstermesi yüksek derecede maling olduğunu gösterir [109]. Hipotetraploid Ehrlich hücreleriyle yapılan çalışmalarda katı ve sıvı formların mitoz oranları ile iki kat olma sürelerini incelemiştir ve katı tümör hücrelerinde iki kat olma zamanının uzadığını, mitoz oranının ise azaldığını bulmuşlardır [111]. Solid tümör elde etmek için subkutan olarak tümör hücre süspansiyonunun 1×10^6 ml'lik hücre süspansiyonu deri altına enjekte edildiğinde, bir haftalık bir süre sonunda ölçülebilecek düzeyde solid tümör saptanabilir. Hiçbir tedavi yapılmazsa 35- 40 gün içinde farelerde ölüm gözlenir [94].

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma sırasında hayvanlar üzerinde uygulanan metodun hayvan hakları ve hayvan deneyleri etiğine uygunluğu, Erciyes Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulunun 12.08.2012 tarih ve 12/89 numaralı kararı ile onaylanmış (Ek 1) ve çalışma Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) gerçekleştirilmiştir.

2.1. Gilaburunun Toplanması ve Ekstraktın Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan gilaburu Akdeniz Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet AKSOY tarafından teşhis edilmiştir. Gilaburu meyveleri Kayseri ili Sarioğlan ilçesinden meyvenin hasat zamanı olan Ekim ayı içerisinde tek bir ağaçtan 2 Ekim 2013 tarihinde elle toplanmıştır. Toplanan gilaburu meyvesi içinde bulunan yaprak, çöp vb. gibi kısımlar ayıklanarak 5 kg tartılıp ayrılmıştır. Gilaburu meyvesi plastik kaplar içerisinde Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne getirilerek aynı gün içerisinde geleneksel yolla meyveleri ezilmiş ve süzülerek meyve suları elde edilmiştir. Daha sonra 6000/dk devirde 10°C de 10 dakika santrifüj (Sigma 3C-30) edilip posaları ayrılarak elde edilen gilaburu meyve suyunun az bir kısmı fiziksel içeriğinin analizi için +4°C'ye kaldırılmıştır. Kalan kısım ise 30 mL'lik hacimler halinde alçak basınçta (0.001 mm Hg), -25°C bulunan liyofilizatör (Labconco) ile kurutularak toz haline getirilmiştir. Gilaburu ekstraktı uygulama gününe kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. Gilaburu Meyve Suyunun Bazı İçeriklerinin Analizi

Gilaburu meyve suyundan 200 mL alınarak cam şişede soğuk ve karanlık ortam içerisinde, analiz edilmesi için Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne gönderilerek gilaburu suyunun pH, titrasyon asitliği, C

vitamini, toplam fenolik madde miktarı ve mineral (sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum) miktarları analiz edilmiştir.

2.3. Gilaburu Ekstraktının Çözünmesi ve Sterilizasyonu

Gilaburu ekstraktı uygulama gününde DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) tamponu ile her deney grubu için istenilen konsantrasyonları sağlayacak şekilde farklı hacimlerde çözdürülmüştür. Çözünme işleminden sonra farelere enjekte edilmeden önce ilk olarak 0,45 µm'lik daha sonra 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Gilaburu ekstraktının çözünmesi her enjeksiyon gününde taze olarak hazırlanmıştır.

2.4. EAT Oluşturulması

Gaziantep Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilen donör hayvanlar Erciyes Üniversitesi, DEKAM'a getirilmiştir. Steril enjektör yardımıyla donör farenin periton boşluğundan, içinde EAT hücrelerinin bulunduğu assit sıvısı alınarak DPBS içerisinde süspanse edilip, bu süspansiyonun bir kısmı tripan mavisini ile boyanıp mikroskop altında canlı hücre sayısı tespit edilmiş ve alıcı farelere verilmesi gereken assit sıvısı miktarı belirlenmiştir. Alıcı farelerin her birine intraperitoneal yolla 200 µl assit sıvısı (10^6 tümör hücresi) enjekte edilerek assit (sıvı) tümör oluşumu sağlanmıştır.

2.4.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen, 8 haftalık, 45 tane erkek Balb/c cinsi fare DEKAM'dan temin edilmiştir.

Fareler 5 gruba ayrılarak her bir grup ayrı kafeslerde olacak şekilde, nem oranı %50-60, ısı $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ve ışık periyodu 12/12 gece/gündüz olan ortamda tutulmuştur. Farelere standart fare yemi ve içme suyu olarak çeşme suyu günlük olarak verilmiştir. Farelerin ağırlık değişimleri hassas terazi ile çalışma başlangıcından bitimine kadar ölçülmüştür.

2.4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Gilaburu Ekstraktının Enjekte Edilmesi

Her grupta bulunan farelere hiçbir işlem yapılmadan önce farelerin tüy özellikleri ve ağırlıkları not edilmiştir.

Grup I (Sağlıklı Kontrol grubu, n=7): Bu grupta bulunan toplam 7 fareye günlük olarak 10 gün süre ile intraperitoneal olarak % 0.9 izotonik NaCl çözeltisinden 200 µL enjekte edilmiştir.

Grup II (Tümör Kontrol Grubu, n=9) Bu grupta bulunan toplam 9 fareye intraperitoneal olarak 1×10^6 EAT hücresi sadece bir defa olmak üzere 200 µL enjekte edilmiştir.

Grup III (Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu, n=9) Bu grupta bulunan toplam 9 fareye intraperitoneal olarak 1×10^6 EAT hücresi sadece bir defa olmak üzere 200 µL enjekte edilmiştir. Kanseri hücrelerinin enjekte edilmesinden 2 saat sonra 25 mg gilaburu ekstraktı 200 µL DPBS tamponu içerisinde çözülüp steril hale getirildikten sonra günlük olarak 10 gün süre ile her fareye intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

Grup IV (Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu, n=9) Bu grupta bulunan toplam 9 fareye intraperitoneal olarak 1×10^6 EAT hücresi sadece bir defa olmak üzere 200 µL enjekte edilmiştir. Kanseri hücrelerinin enjekte edilmesinden 2 saat sonra 50 mg gilaburu ekstraktı 200 µL DPBS tamponu içerisinde çözülüp steril hale getirildikten sonra günlük olarak 10 gün süre ile her fareye intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

Grup V (Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu, n=9) Bu grupta bulunan toplam 9 fareye intraperitoneal olarak 1×10^6 EAT hücresi sadece bir defa olmak üzere 200 µL enjekte edilmiştir. Kanseri hücrelerinin enjekte edilmesinden 2 saat sonra 100 mg gilaburu ekstraktı 200 µL DPBS tamponu içerisinde çözülüp steril hale getirildikten sonra günlük olarak 10 gün süre ile her fareye intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

2.5. Gilaburu'nun EAT Gelişimi Üzerine Etkisi

Gilaburu ekstraktının tümör gelişimi üzerine etkisi, sırasıyla gruplardaki farelerin günlük fizyolojik kontrolü ve ağırlık artışına, periton sıvısından alınan tümör hücresi sayısına, böbrek ve karaciğer dokularının antioksidan değerlerine ve dokuların patolojisine bakılarak değerlendirilmiştir.

Son gilaburu enjeksiyonundan bir gün sonra (11. gün) bir miktar (50 µl) intraperitoneal sıvı bir enjektörle alınarak tümör hücre sayımları yapılmıştır. Aynı gün ketamin (0,1 mg kg⁻¹) ve xylazin (0,05 mg kg⁻¹) ile intramüsküler genel anestezi altında karaciğer ve böbrek dokuları alındıktan sonra hayvanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir [120]. İzole edilen karaciğer ve böbreğin sol lobuna ait doku örnekleri 50 mM potasyum fosfat (KPO₄) tamponu içine alınarak biyokimyasal analizler için hazırlanmıştır. Ayrıca histopatolojik değerlendirmeler için alınan organ parçaları içinde %10'luk formaldehit bulunan cam şişelere transfer edilerek fikse edilmiştir.

2.5.1. EAT Hücrelerinin Tripan Mavisi Yöntemi ile Sayımı

Gilaburu ekstraktının enjekte edilmesi 10. gün sonunda bitmiştir. 11. gün sağlıklı kontrol grubu dışında EAT hücresi enjekte edilen farelerin periton boşluğu içerisindeki EAT hücrelerinin bulunduğu assit sıvısı alınarak DPBS içerisine süspanse edilmiştir (Şekil 2.6). Bu süspansiyondan endorf tüpünün içerisine 50 µl alınmıştır ve bu hücre süspansiyonu üzerine 50 µl % 0,4'lük tripan mavisi ilave edilmiştir. [121]. Tripan mavisiyle boyanmış olan bu solüsyondan thoma laminin sayma alanlarına 10 µl eklenerek tamamen dolması sağlanmıştır ve üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu altında canlı olan hücreler sayılmıştır. Ölü hücreler maviye boyanmış olduğu için kolayca fark edilmiş ve sayıma dahil edilmemişlerdir. Thoma laminin her iki sayma alanından 5'er büyük kare seçilerek içindeki canlı hücreler sayılmıştır. Ortalamasını almak amacıyla sayılan tüm hücreler toplanarak 10'a bölünür ve thoma laminin bir sayma alanında 16 büyük kare bulunduğu için çıkan sonuç 16 ile çarpılmıştır. Bu sonuç ise 10⁶ ile çarpıldığında 1ml'deki hücre sayısı bulunmuştur [122]. Hücre sayımı yapıldıktan sonra tümör kontrol grubundan bir kısım hücre *in vitro* sitotoksite çalışmaları için %10 DMSO bulunan besi ortamına alınarak dondurma tüplerine konulmuştur. Dondurma tüplerine konulan hücreler kademeli olarak (-20 °C ve -80°C) dondurulmuş ve denemelerde kullanılıncaya kadar sıvı azot tankında (-196 °C) saklanmıştır.



Şekil 2.1. Deney gruplarının periton boşluğu içerisindeki EAT hücrelerinin enjektör yardımı ile alınması

2.5.2. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücreleri Üzerindeki *in vitro* Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

2.5.2.1. EAT Hücrelerinin Yeniden Canlandırılması ve Çoğaltılması

%10 Dimetil sülfoksit (DMSO) bulunan besi ortamında sıvı azotta dondurulup saklanmış olan EAT hücreleri, sitotoksisite çalışmalarında kullanılmak üzere yeniden canlandırılmıştır. Bu amaçla, dondurulmuş hücreler 37 °C'de su banyosunda çözündürülmüştür. Çözündürülen hücreler %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 glutamin ve %1 penisilin içeren RPMI 1640 besi ortamına yeniden ekilmiştir. Hücreler, 25 cm²'lik kültür flasklarında 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

25 cm²'lik kültür flasklarında çoğaltılan EAT hücreleri, kültür flasklarında %80-90 yoğunluğa ulaştığında hücreler, kapaklı bir tüp içerisinde toplanarak 1800 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra santrifüj edilen hücreler, besiyeri ile tekrar süspanse edilmiştir. Tekrar süspanse edilen hücrelerden 50 µl alınarak eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerine aynı miktarda tripan mavisi (trypan blue) ilave edilmiştir. Daha sonra hazırlanan bu karışımdan örnek alınarak thoma lamında inceleme ve sayım yapılmış, 1 mL'deki toplam hücre sayısı ve yüzde

canlılık oranı belirlenmiştir. Canlılık oranı (%) belirlenirken hücrelerin tripan mavisi ile boyanma oranları göz önüne alınmıştır. Bu şekilde toplam hücre sayısı ve yüzde canlılık oranı belirlendikten sonra, 6-kuyucuklu flasklara ekim yapmak için her kuyucukta 150.000 hücre/mL olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapılmış ve steril koşullarda kapaklı tüpler içerisinde seyreltmeler yapılarak, denemelerde kullanılmak üzere 3 mL besi ortamında 450 bin hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve 24 saat inkübatörde bekletilmiştir.

2.5.2.2. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücrelerine Uygulanması

Gilaburu ekstraktı 125, 250, 500 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarda olacak şekilde DPBS tamponu ile farklı hacimlerde çözdürülmüştür. Çözünme işleminden sonra hücrelere uygulanmadan önce ilk olarak 0,45 µm'lik daha sonra 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Bu işlemden sonra gilaburu ekstraktı kültür ortamına ilave edilerek 48 saat süre ile bekletilmiştir.

2.5.2.3. Tripan Mavisi Yöntemi ile *in vitro* Sitotoksitenin Belirlenmesi

Ekstraktın 125, 250, ve 500 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarının EAT hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi amacı ile ependorf tüpü içerisinde alınan 50 µl hücre süspansiyonu üzerine 50 µl % 0,4'lük tripan mavisi ilave edilerek, boyama sonrasında ışık mikroskopunda her bir ekstraktın her bir konsantrasyonu için canlı ve ölü hücre sayımı yapılmıştır. Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Yüzde sitotoksitenin oranı aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir [120].

$$\% \text{ Sitotoksitenin} = [(\text{Toplam Hücre} - \text{Canlı Hücre}) / \text{Toplam Hücre}] \times 100$$

EAT hücrelerinin % 50'sinin ölümüne sebep olan ekstrakt konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri de, uygulanan ekstrakt konsantrasyonlarına karşı yüzde sitotoksitenin grafikleri çizilerek hesaplanmıştır. Kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak, sitotoksitenin %50'nin altında bulunan konsantrasyonlar ise; etkisiz olarak kabul edilmiştir.

2.5.3. Biyokimyasal İncelemeler

İzole edilen karaciğer sol lob ve böbrek sol lob doku örnekleri 50 mM potasyum fosfat (KPO₄) tamponu içinde cam-cam homojenizatör kullanılarak 1/10, w/v oranı kullanılarak homojenize edilmiştir. Biyokimyasal analizler için hazırlanan bu dokular

3000 g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen homojenizatlar analize kadar -80°C de saklanmıştır.

Doku homojenizatlarında, total protein miktarı belirlenmiştir. Ayrıca malondialdehit (MDA) seviyesi, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tayini yapılmıştır.

2.5.3.1. Dokuların Protein Miktarı Tayini

Prensip

Doku homejenatlarında total protein analizi Bradford yöntemine göre gerçekleştirilmiştir [123].

Reaktifler

1. Comassie Brilliant Blue G 250
2. %96 Etanol
3. % 85 Orto-fosforik asit
4. dH_2O
5. 1 mg mL^{-1} Bovine Serum Albümine (BSA) mg mL^{-1}

Reaktiflerin Hazırlanması

1. **Comassie Brilliant Blue G 250:** 500 mg tartılarak 250 mL %96'lık etanol içerisinde çözülmüştür.
2. **% 85 Orto-fosforik asit:** %85'lik stok şişeden 500 mL alınarak hazırlanan Comassie Brilliant Blue G 250 çözeltisine ilave edilmiştir. Son hacim 1 L olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Analize kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.
3. **BSA:** BSA'dan 10 mg tartılarak 10 mL distile su ile çözülmüştür ve küçük hacimlere ayrılarak analize kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Hazırlanmış olan bu 5X'lik Bradford solüsyonu 1:5 oranında distile su ile dilüe edilerek 1X oranında kullanılmıştır.

Standart Eğim Grafiğinin Elde Edilmesi

Günlük Standart

Stok BSA'dan 10 mg tartılarak 10 mL dH₂O ile çözülmüştür. 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 mg mL⁻¹'lik çalışma standartları hazırlanmıştır. Bu standartlar Tablo 2.1'de verildiği gibi tüplere konulmuştur.

Tablo 2.1. Bradford standart eğim grafiği için gerekli reaktiflerin tüplere konulması

Standartlar mg mL ⁻¹	dH ₂ O (µL)	1 mg mL ⁻¹ stok BSA (µL)	1X Bradford Ayracı (mL)
Kör	500	-	5
0,01	495	5	5
0,02	490	10	5
0,03	485	15	5
0,04	480	20	5
0,05	475	25	5

Standartlar 10 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir ve vortekslenerek 595 nm'de absorbansı spektrofotometre ile okunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Yöntem

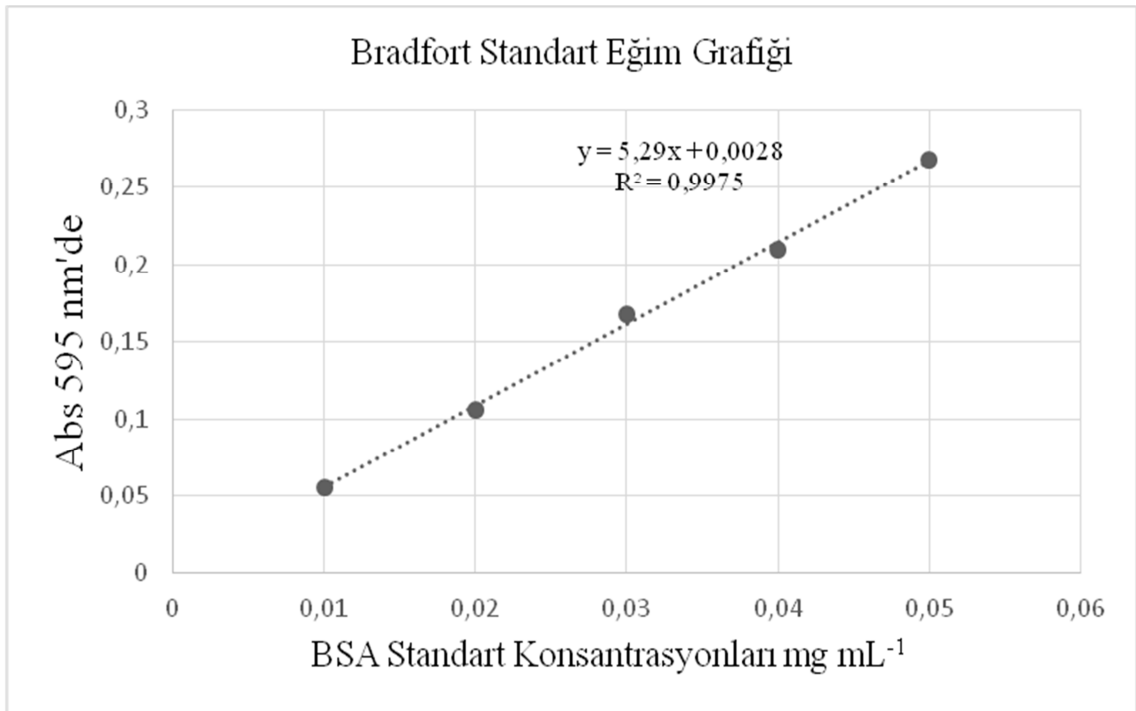
Reaktifler Tablo 2.2' de belirtilen hacimlerde tüplere konulmuştur.

Tablo 2.2. Protein tayin yöntemi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması

Çözeltiler	Örnek
Örnek (µL)	50
dH ₂ O (µL)	450
1X Bradford Ayracı (mL)	5

Örnekler 10 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir ve vortekslenerek 595 nm'de absorbansı spektrofotometre ile okunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı yapılmıştır.

Hesaplama: Sonuçlar Bradford standart eğim grafiği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Serum dilüsyon oranı 1/50 olarak kullanılmıştır. Standart eğim grafiği 50 seyreltme oranı ile çarpılarak hesaplanmıştır. Bradford standart konsantrasyonları ve absorbansları ve eğim grafiği Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bradford standart eğim grafiği

2.5.3.2. Malondialdehit (MDA) Tayini

Prensip

Dokulardaki lipid peroksidasyonu, Ohkawa ve ark. tarafından geliştirilen yöntemle göre belirlenmiştir [124].

Reaktifler

1. SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
2. HAc: Asetik asit (pH 3.5)
3. TBA: Tiyobarbitürik Asit (pH 3.5)
4. nBu-Pri: n-Butanol-Piridin çözeltisi (15/1)
5. TMP: Stok standart: 1,1,3,3 tetrametoksipropan (yoğunluk: 0.99 g/mL)

Reaktiflerin Hazırlanması

1. **%8.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS):** Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 8,1 g tartılarak distile suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.
2. **%20 Asetik asit (HAc) (pH 3.5):** 20 mL Asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH: 3,5'e doymuş NaOH ile ayarlanmıştır.
3. **%0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3.5):** 0,8 g Tiyobarbitürik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH: 3,5' e doymuş sodyum hidroksit (NaOH) ile ayarlanmıştır.
4. **n-Butanol-Piridin (nBu-Pri) çözeltisi (15/1):** n-Butanol'den 15 mL Piridin'den 1 mL alınarak 15/1 oranında karışım hazırlanmıştır.
5. **Stok standart: 1,1,3,3 tetrametoksipropan (yoğunluk: 0.99 g/mL):** Stok standarttan 17,1 µL alınıp 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. (100 nmol/mL'lik günlük standart oluşturulmuştur).

Standart Eğim Grafiğinin Elde Edilmesi

Günlük Standart

Stok standarttan 17,1 µl alınıp 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. (100 nmol/mL'lik günlük standart oluşturulmuştur). Standartların konsantrasyonları 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/mL'lik olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu standart eğim grafiği için gerekli reaktifler Tablo 2.3'de belirtilen hacimlerde tüplere konulmuştur.

Tablo 2.3. MDA standart eğim grafiği için gerekli reaktiflerin tüplere konulması

Çözeltiler (mL)	Kör	10*	20*	30*	40*	60*	80*	100*
Standart	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
HAc	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
dH ₂ O	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
95°C de 30 dk inkübe edildikten sonra 5-10 dk soğutulmuştur								
dH ₂ O	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

* = nmol/mL

Reaksiyon içeriği kuvvetle vortekslenmiştir ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantta bulunan organik kısım alınıp 532 nm absorbandsda spektrofotometre ile okunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Yöntem

Reaktifler Tablo 2.4’de belirtilen hacimlerde tüplere konulmuştur.

Tablo 2.4. MDA enzim düzeyi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması.

Çözeltiler(mL)	Kör	Standart	Örnek
Standart (10 nmol/mL)	—	0.1	—
Örnek	—	—	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2
HAc	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
dH ₂ O	0.8	0.7	0.7
95°C’de 30 dk inkübe edildikten sonra soğutulmuştur.			
dH ₂ O	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri	5.0	5.0	5.0

Reaksiyon içeriği kuvvetle vortekslenmiştir ve 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm’de absorbansı spektrofotometre ile okunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

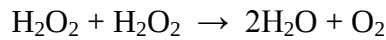
Hesaplama: Sonuçlar standart eğriden $y = ax + b$ denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler total protein miktarlarına bölünerek nmol/mg cinsinden verilmiştir.

2.5.3.3. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Prensip

Katalaz aktivitesi Aebi tarafından önerilen metoda göre yapılmıştır [125]. Enzimatik aktivite tayini, hidrojen peroksidin 240 nm’deki absorbansının enzim ile etkileşmesinden sonra azalmasının zamana bağlı olarak ölçülmesiyle yapılmıştır. Hidrojen peroksit için molar ekstinksiyon katsayısı $0,0396 (0,04) \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ dir [125].

CAT



Reaktifler

1. 50 mM pH:7.0 Fosfat tamponu:
2. 30 mM H_2O_2 :

Reaktiflerin Hazırlanması

1. Fosfat Tamponu (50 mM pH:7.0): a) 6.81 g KH_2PO_4 ve b) 8.90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp, hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. Kullanılacağı vakit a’dan 1 hacim b’den 1.55 hacim alınarak karıştırılmıştır.

2. H_2O_2 (30 mM): % 30’ luk hidrojen peroksitten direk alınarak kullanılmıştır.

Yöntem

Reaktifler Tablo 2.5’de belirtilen hacimlerde tüplere konulmuştur.

Tablo 2.5. CAT aktivitesi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması

Çözeltiler	Kör	Örnek
Fosfat Tamponu (µL)	978	—
Örnek (µL)	20	20
H ₂ O ₂ (µL)	—	2

240 nm de H₂O₂'nin absorbans azalması 3 dk. boyunca takip edilerek reaksiyon oranı yani dakikadaki absorbans değişimi bulunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Hesaplama: Sonuçlar, Ü/mg protein olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Katalaz aktivitesi (Ü/mL)} = \frac{\Delta OD \times V_t}{0.40 \times V_o}$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam hacim V_o

V_o = Örnek hacmi

0.04 = H₂O₂'in 240 nm'deki mM ekstinksiyon katsayısı

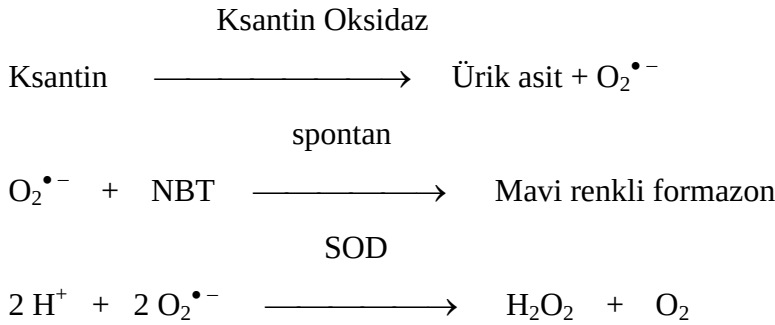
$$\text{Katalaz Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

2.5.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini

Prensip

Çalışmaya alınan farelerin karaciğer ve böbrek dokularındaki SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. tarafından geliştirilen metot kullanılmıştır [126]. Ksantin oksidaz (XO) ile ksantin oksidasyonu sırasında açığa çıkan O₂⁻ nitroblue tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redükleyerek formazonları oluşturmaktadır. Süperoksit anyonunun, H₂O₂'e dismutasyonunu sağlayan SOD varlığında, XO reaksiyonları ile üretilen O₂ sürekli tüketileceğinden, NBT ile reaksiyona giren O₂⁻ miktarı azalacak ve bu yolla formazon oluşumu önlenecektir.

SOD aktivitesi, XO'ın katalizlediği tepkimede, NBT redüksiyonunun inhibisyon derecesine bağlı olarak ölçülebilir. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT redüksiyonu ile formazon oluşumu azalacaktır.



Reaktifler

1. 0,3 mM Ksantin
2. 0,6 mM EDTA
3. 150 μ M NBT
4. 0,4 M Na_2CO_3 (Sodyum Karbonat)
5. 1 gr/L BSA
6. 167 U/L Ksantin Oksidaz
7. 0,8 mM CuCl_2
8. 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Reaktiflerin Hazırlanması

1. **0.3 mM / L ksantin (0,1 mL):** 9.13 mg alınıp son hacim 200 mL olacak şekilde distile suda çözülmüştür. Ksantin zor çözündüğünden dolayı bu işlem; ortama 1 M NaOH çözeltisinden 1-2 damla ilave edilerek yapılmıştır.
2. **0.6 mM / L Na_2EDTA (0,5 ml):** 23 mg alınıp son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür
3. **150 μ M / L NBT (0,5 mL):** 12,3 mg alınıp son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür.

4. **400 mM / L Na₂CO₃ (0,3 mL):** 2,54 gr alınıp son hacim 60 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür.

5. **1g / L BSA (0,15 mL):** 30 mg alınıp son hacim 30 mL olacak şekilde distile suda çözünmüştür.

SOD aktivitesi tayin edilecek her numune için, toplam hacim 2,45 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

6. **Ksantin Oksidaz (167 Ü/L):** 11860 Ü / L ksantin oksidaz stok çözeltisinden 14 µl alınıp, +4 °C’de soğutulmuş 986 µl, 2M (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılmıştır.

7. **CuCl₂ (0.8 mmol / L):** 13.6 mg CuCl₂ alınıp bir miktar distile suda çözülerek total hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır.

8. **2 M (NH₄)₂SO₄:** 2.64 gr amonyum sülfat tartılmıştır bir miktar distile suda çözülerek total hacim 10 mL’ye tamamlanmıştır. Bu çözelti, ksantin oksidazın dilüsyonunda kullanılmıştır.

Standart Eğim Grafiğinin Elde Edilmesi

Günlük Standart

Standart serinin hazırlanması: SOD (3300 Ü/mg solid/mg protein), 0,6 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde, distile su ile çözünmüştür. Bu stok standart 0,01 M fosfat tamponu ile seyreltilerek, deney ortamında sırasıyla 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ng konsantrasyonlarında olacak şekilde, SOD çalışma standartları hazırlanmıştır ve Tablo 2.6’ da verilmiştir

Tablo 2.6. SOD standart eğim grafiği için gerekli reaktiflerin tüplere konulması

Çözeltiler (mL)	Kör	6,25	12,5	25	50	100
Standart	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ksantin	1	1	1	1	1	1
EDTA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NBT	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Na ₂ CO ₃	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
BSA	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Ksantin Oksidaz	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
25°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir.						
CuCl ₂	1	1	1	1	1	1

Reaksiyon içeriği kuvvetle vortekslenmiştir. 560 nm’de absorbansı spektrofotmetre ile okunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Yöntem

Reaktifler Tablo 2.7.’de belirtilen hacimlerde tüplere konulmuştur.

Tablo 2.7. SOD aktivitesi için gerekli reaktiflerin tüplere konulması

Çözeltiler(mL)	Kör	Standart	Örnek
Standart	-	0,5	-
Örnek	-	-	0,5
Ksantin	1	1	1
EDTA	0,5	0,5	0,5
NBT	0,5	0,5	0,5
NA ₂ CO ₃	0,3	0,3	0,3
BSA	0,15	0,15	0,15
Ksantin Oksidaz	0,05	0,05	0,05
25°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir.			
CuCl ₂	1	1	1

Reaksiyon içeriği kuvvetle vortekslenmiştir. 560 nm’de absorbansı spektrofotmetre ile okunmuştur. Çalışmalar her grup için üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Hesaplama: Standart seri ve numune tüplerinde % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Kör'ün absorbans (Ak) - Numune'nin absorbansı (An)}$$

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Kör'ün absorbansı (Ak)}}{\text{Kör'ün absorbansı (Ak)}} \times 100$$

$$\text{Kör'ün absorbansı (Ak)}$$

Standart seri için hesaplanan % inhibisyon değerlerine karşılık gelen SOD konsantrasyonları kullanılarak; SOD tarafından NBT redüksiyon hızının inhibisyon grafiği elde edilmiştir. Grafik yardımı ile numunelere ait % inhibisyon değerlerinde ünite SOD değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler metodun uygulanması sırasında

kullanılan seyreltme faktörleri ile çarpılarak numunelerin gerçek SOD ünitelerine ulaşılmıştır. Protein miktarları da tayin edilerek SOD aktivitesi, spesifik aktivite cinsinden, Ü/mg protein olarak verilmiştir.

2.6. Histopatolojik Değerlendirmeler

Dokuların histopatolojik değerlendirmeleri Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bölümü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalı tarafından yapılmıştır.

2.6.1. Histolojik Doku Takibi

%10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin histolojik takip aşamalarından sonra hazırlanan ve parafin bloklara gömülen dokulardan 5 µm'lık kesitler dökülmemesi için poli-L lizinle kaplı lamlara alınmıştır. Histolojik doku takibi aşamaları Tablo 2.8'de verilmiştir. Elde edilen ve deney gruplarına ait olan karaciğer ve böbrek dokularına hematoksilin-eozin boyama metodu uygulanmıştır [127]. Bu boyama metodu için uygulanan prosedürler Tablo 2.9'da verilmiştir.

Tablo 2.8. Parafin doku takip (PAS) yöntemi aşamaları

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%10'luk formalin	Bir gece
2	Akarsu	Bir saat
3	% 50'lik etil alkol	Bir saat
4	% 70'lik etil alkol	Bir saat
5	% 90'lık etil alkol	Bir saat
6	% 96'lık etil alkol-I	Bir saat
7	% 96'lık etil alkol-II	Bir saat
8	Absolut alkol-I	Bir saat
9	Absolut alkol-II	Bir saat
10	Ksilen	Bir saat
11	57 °C'de etüvde eriyik parafin	Bir gece
12	Gömme	

Tablo 2.9. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yönteminin aşamaları

Sıra	Uygulanan İşlem	Süre
1	Ksilen-I	15 dk
2	Ksilen-II	15 dk
3	Absolut alkol-I	10 dk
4	Absolut alkol-II	10 dk
5	% 96 Alkol	10 dk
6	% 80 Alkol	10 dk
7	%70 Alkol	10 dk
8	% 50 Alkol	10 dk
9	Akarsu	5 dk
10	Hematoksilen	7-8 dk
11	Akarsu	5 dk
12	Eozin	4-5 dk
13	Akarsu	5 dk
14	% 50 Alkol	10 dk
15	%70 Alkol	10 dk
16	% 80 Alkol	10 dk
17	% 96 Alkol	10 dk
18	Absolut alkol-I	10 dk
19	Absolut alkol-II	10 dk
20	Ksilen-I	15 dk
21	Ksilen-II	15 dk
22	Kapatma	

2.6.2. Histopatolojik Değerlendirme

H-E, PAS ile boyanan preparatların histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya)

kullanılmıştır. Hazırlanan preparatlarda, karaciğer ve böbrek dokularına ait parankima yapıları incelenerek görüntüler elde edilmiştir.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testleri ile değerlendirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar Tamhan T2 ve Siegel-Castellan testleri ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama ile standart sapma veya ortanca ile 25. ve 75. yüzdeler olarak ifade edilmiştir. Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Inc., ILL, USA) ile değerlendirilmiştir. $p<0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. Değerler n (%), ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (25. ve 75. yüzdeler) ile ifade edilmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Gilaburu Meyve Suyunun Analiz Bulguları

Gilaburu meyve suyunun içeriği ile ilgili Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü tarafından belirlenen bazı değerler (pH, titrasyon asitliği, formol sayısı, suda çözünür kuru madde değeri, C vitamini ve toplam fenolik madde içerikleri) Tablo 3.1’de, bazı mineral miktarları (sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum) ise Tablo 3.2’ de verilmiştir.

Tablo 3.1. Gilaburu meyve suyunun pH, titrasyon asitliği, formol sayısı, suda çözünür kuru madde değeri, C vitamini ve toplam fenolik madde içerikleri

pH	Titrasyon Asitliği	Formol Sayısı	Suda Çözünür Kuru Madde	C Vitamini	Toplam Fenolik Madde Gallik Asit
3.09	9.6 g/L	1.6	11.44 briks	335 mg kg ⁻¹	3903 mg L ⁻¹

Tablo 3.2. Gilaburu meyve suyunun mineral madde miktarları (mg L⁻¹)

Sodyum	Potasyum	Kalsiyum	Magnezyum
19.0	1115	46.8	40.8

3.2. Deney Süresince Grupların Vücut Ağırlık Değişimi

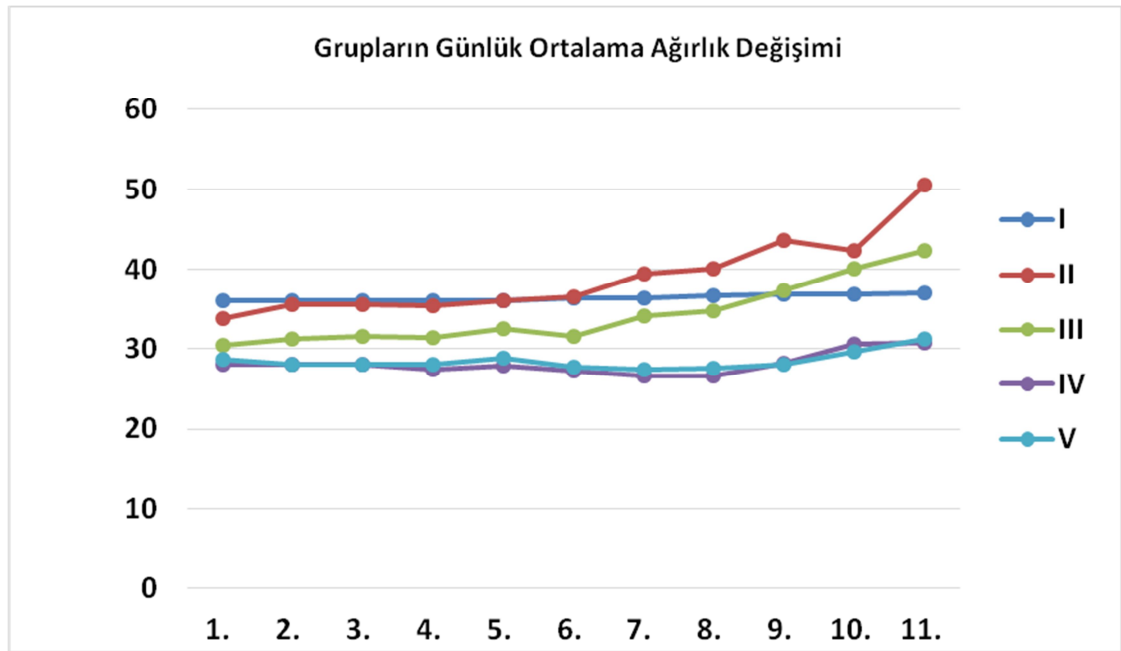
Deney öncesi tüm grupların (Grup I: Sağlıklı Kontrol Grubu, Grup II: Tümör Kontrol Grubu, Grup III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu, Grup IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu, Grup V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu)

vücut ağırlıkları ile ilgili değerler karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Deney öncesinde ve deney sonrası tüm grupların ortalama ağırlık değerleri (gram:g)

Grup No	Denemelerden Önceki Ortalama Ağırlık $\pm$ SD	Denemeler Sonundaki Ortalama Ağırlık $\pm$ SD	Ortalama Ağırlık Artışı $\pm$ SD
Grup I: Sağlıklı Kontrol Grubu n=7	37.0 $\pm$ 2.19	36.1 $\pm$ 2.82	-0.9
Grup II: Tümör Kontrol Grubu n=9	33.8 $\pm$ 3.01	50.5 $\pm$ 5.74	+16.8
Grup III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=9	30.4 $\pm$ 1.33	42.3 $\pm$ 7.07	+11.9
Grup IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=9	28.0 $\pm$ 1.58	30.8 $\pm$ 4.66	+2.8
Grup V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=9	28.7 $\pm$ 1.98	31.3 $\pm$ 4.76	+2.6

Deney süresince (her gün) gruplara ait hayvanların ortalama vücut ağırlıkları not edilmiş ve değişim Şekil 3.1’de verilmiştir. Deney başlangıcı ile deney sonunda gruplara ait hayvanların vücut ağırlıklarındaki ortalama değişim sırasıyla; Grup I’ de 0.9 g, Grup II’ de 16.8 g, Grup III’ de 11.9 g, Grup IV’ de 2.8 g ve Grup V’ de 2.6 g olarak kaydedilmiştir. En fazla ortalama kilo artışı tümör kontrol grubu olan Grup II’ de gözlenmiştir. Bu gruptaki kilo artışı tümör hücrelerinin intraperitoneal sıvıda çoğalmasına bağlı bir artıştır. Sağlıklı kontrol grubu (Grup I) kanser grupları (Grup II-IV) ile karşılaştırıldığında, ağırlık artışı sadece kanser kontrol grubunda (Grup II) anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Kanser kontrol grubu ile gilaburu ekstraktının uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında ise kilo değişiminde anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür (Grup III: $p < 0.05$, Grup IV ve V: $p < 0.001$). Bu sonuçlara dayanarak gilaburu ekstraktının tümör hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatıcı etkisinin olabileceği söylenebilir (Tablo 3.3,4).



Şekil 3.1. Grupların günlük ortalama ağırlık değişimi

Tablo 3.4. Ortalama ağırlık değişimlerinin uygulama grupları arası anlamlılık (p) değerleri

Gruplar	II - III	II - IV	II - V	III - IV	III - V	IV - V
Anlamlılık (p) Değerleri	0.016	0.000	0.000	0.000	0.001	0.983

3.3. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücreleri Üzerindeki *in vivo* Sitotoksitesi

Deney sonunda gruplardan intraperitoneal sıvı alınarak tripan mavisi ile boyanmış ve 1 ml'deki EAT hücresi sayılarak karşılaştırılmıştır. Deney esnasında Grup II ve III' den bir fare, Grup IV ve V' den üçer fare öldüğü için EAT assit sıvısı alınamamıştır ve hücre sayımı yapılamamıştır. Sağlıklı kontrol grubundan (Grup I) intraperitoneal sıvı elde edilemezken, kanser kontrol grubundan (Grup II) elde edilen canlı hücre sayısı %100 canlılık değeri olarak kabul edilmiştir. Diğer gruplarda (Grup III-V) bulunan hücrelerin sayısının tümör kontrol grubunda bulunan hücrelerin sayısına oranı yüzde canlılık olarak değerlendirilmiştir. Deney sonunda hayvanlardan alınan EAT hücrelerinin gruplara göre hücre sayıları ve canlılık oranları Tablo 3.5' de verilmiştir. Değerler ortalama ve % olarak verilmiştir.

Tablo 3.5. Deney gruplarında EAT hücrelerinin ortalama sayısı ve yüzde canlılık değeri

Grup No	Ortalama Canlı Hücre Sayısı (ml)	% Canlılık Değeri
Grup I: Sağlıklı Kontrol grubu n=7	-	-
Grup II: Tümör Kontrol Grubu n=8	53,20 x 10 ⁶	100
Grup III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8	47,20 x 10 ⁶	88.72
Grup IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=6	36,72 x 10 ⁶	69.02
Grup V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=6	27,60 x 10 ⁶	51.87

Tümör kontrol grubundaki %100 olan canlılık yüzdesi gilaburu ekstraktının uygulandığı deney gruplarında sırasıyla %88.72, %69.02 ve %51.87 olarak bulunmuştur. Tümör kontrol grubu (Grup II), gilaburu uygulama grupları (Grup III, IV ve V) ile karşılaştırıldığında, canlılık yüzdesi rakamsal olarak düşmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sadece Grup IV’ de anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür ($p > 0.05$), (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. EAT hücresi canlılık yüzdelерinin gruplar arası anlamlılık (p) değeri

Gruplar	II - III	II - IV	II - V	III - IV	III - V	IV - V
Anlamlılık (p) Değeri	0.993	0.073	0.142	0.040	0.221	0.873

3.4. Gilaburu Ekstraktının EAT Hücreleri Üzerindeki *in vitro* Sitotoksik Etkisi

Gilaburu ekstraktının 125, 250, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ farklı konsantrasyonlarının, 48 saat süre ile EAT hücreleri üzerine uygulanmaları sonucunda ortaya çıkan ve kontrol grupları ile karşılaştırılan % sitotoksik etkilere ait veriler ile hücrelerin %50’ sini öldüren konsantrasyon değeri gösteren IC_{50} değeri, her bir konsantrasyon için Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7. Gilaburu ekstraktının EAT hücreleri üzerindeki *in vitro* ortalama % sitotoksik etkisi ve IC₅₀ değerleri

Gruplar	Konsantrasyon (µg mL ⁻¹)	Toplam Hücre	Sitotoksisite % 48. Saat ± SD	IC ₅₀
Grup I	Kontrol	500.000	0.40 ± 0.17	199,58 (µg mL ⁻¹)
Grup II	Kontrol (DMSO)	500.000	0.80 ± 0.2	
Grup III	125	500.000	40.04 ± 0.41	
Grup IV	250	500.000	50.06 ± 0.30	
Grup V	500	500.000	79.86 ± 0.23	

Grup I' in sitotoksitesi %0.40, Grup II' nin % 0.8 bulunmuştur. Grup I ve Grup II kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Grup III' ün sitotoksitesi %40.04, Grup IV' ün sitotoksitesi %50.06 ve Grup V' in sitotoksitesi %79.86 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu (Grup I ve II), gilaburu ekstraktının uygulandığı gruplarla (Grup III, IV ve V) karşılaştırıldığında *in vitro* sitotoksik etki bütün gruplarda anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p < 0.05$). Bu sonuçlara dayanarak gilaburunun tümör gelişimini inhibe eden en uygun konsantrasyonun 199,58 µg ml⁻¹ olduğu söylenebilir.

3.5. Biyokimyasal Bulgular

3.5.1. Böbrek Dokusuna Ait Enzim Düzeyleri

Bu çalışmada sağlıklı kontrol grubu hariç diğer dört gruba EAT hücrelerinin inokülasyonu yapılmıştır. Bu gruplardan tümör kontrol grubu dışında kalan üç farklı gruba farklı dozlarda gilaburu ekstraktı uygulanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu, tümör kontrol grubu ve gilaburu uygulaması yapılan üç farklı grubun böbrek dokusunun oksidan/antioksidan durumunun gösterilmesi için CAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Bulgular Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Deney gruplarının böbrek dokusuna ait enzim düzeylerinin ortalanca (25. ve 75. yüzdelikleri) değerleri

Grup No	CAT Ü/mg protein Ortanca (Persentil 25- 75)	SOD Ü/mg protein Ortanca (Persentil 25- 75)	MDA nmol/mg protein Ortanca (Persentil 25- 75)
Grup I:Sağlıklı Kontrol grubu n=7	29.82 (24.81 – 34. 68)	0.07 (0.03 – 0.14)	0.21 (0.16 – 0.42)
Grup II: Tümör Kontrol Grubu n=8	22.97 (18.84 – 24.21)	0.04 (0.01 – 0.11)	0.54 (0.23 – 0.56)
Grup III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8	22.05 (18.44 – 25.66)	0.16 (0.11 – 0.18)	0.45 (0.34 – 0.61)
Grup IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=6	39.10 (21.28 – 45.91)	0.03 (0.00 – 0.07)	0.31 (0.21 – 0.42)
Grup V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=6	33.21 (19.16 – 37.10)	0.05 (0.02 – 0.11)	0.45 (0.26 – 0.57)

Değerler n, ortalanca, 25. ve 75. yüzdelikler ile ifade edilmiştir.

Bulguların istatistiksel olarak anlamlılık (p) değerleri Tablo 3.9’da verilmiştir. Bu değerler arasındaki ilişki aşağıda açıklanmıştır.

Tablo 3.9. Böbrek dokusuna ait enzim düzeylerinin gruplar arası anlamlılık (p) değerleri

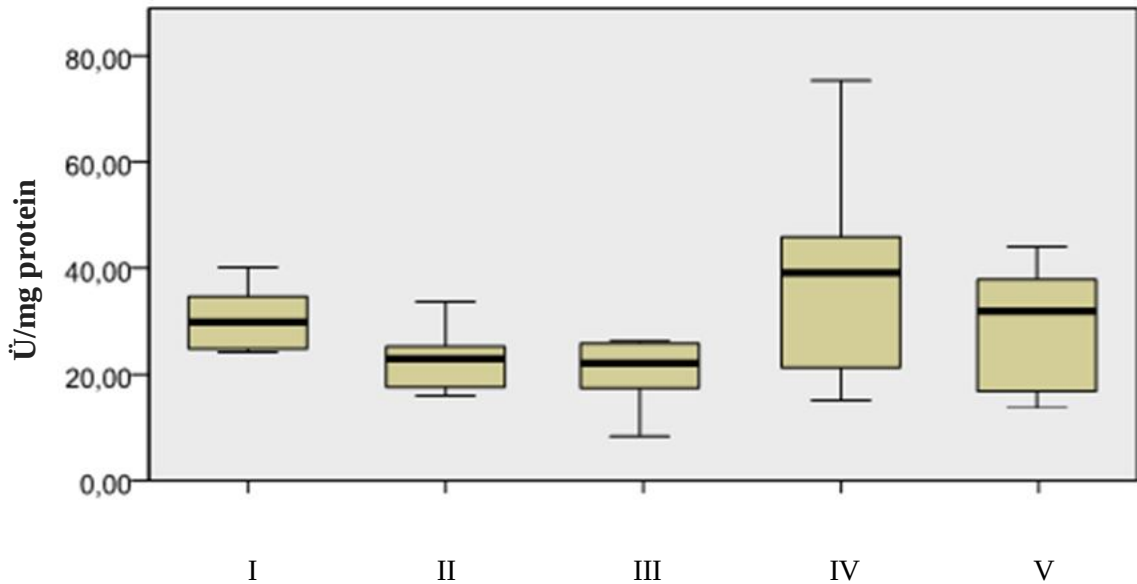
Grup No	CAT	SOD	MDA
I – II	0.040*	0.268	0.169
I – III	0.039*	0.177	0.175
I – IV	0.843	0.128	0.170
I – V	0.667	0.419	0.169
II – III	0.947	0.009*	0.269
II – IV	0.024*	0.585	0.170
II – V	0.131	0.773	0.165
III – IV	0.023*	0.004*	0.172
III – V	0.125	0.024*	0.170
IV – V	0.535	0.428	0.369

* Gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

3.5.1.1. Böbrek Dokusunda CAT Aktivitesi

H₂O₂'in moleküler oksijen ve suya dönüşümünü ifade eden CAT aktivitesi (Ü/mg), Grup I'de 29.82 Ü/mg, Grup II'de 22.97 Ü/mg, Grup III'de 22.05 Ü/mg, Grup IV'de 39.10 Ü/mg ve Grup V'de 33.21 Ü/mg olarak ortalama değerleri bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubu (Grup I), kanser grupları (Grup II-III-IV-V) ile karşılaştırıldığında, CAT aktivitesi Grup II ve III'de anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Kanser kontrol grubu, gilaburu ekstraktının uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında ise CAT aktivitesi Grup IV'de anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. ($p < 0.05$). Deney grupları kendi aralarında karşılaştırılarak CAT aktivitesinin anlamlılığı tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testlerine göre %95 güven aralığında bulunmuştur. CAT aktiviteleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak Tümör kontrol grubunda CAT aktivitesinde görülen bu azalışın tümör gelişmesinden kaynaklandığı ve gilaburu uygulama gruplarından Grup IV ve V'deki artışın ise tümör gelişimine karşı gilaburunun savunma etkisinin olabileceği söylenebilir.

CAT Aktivitesi

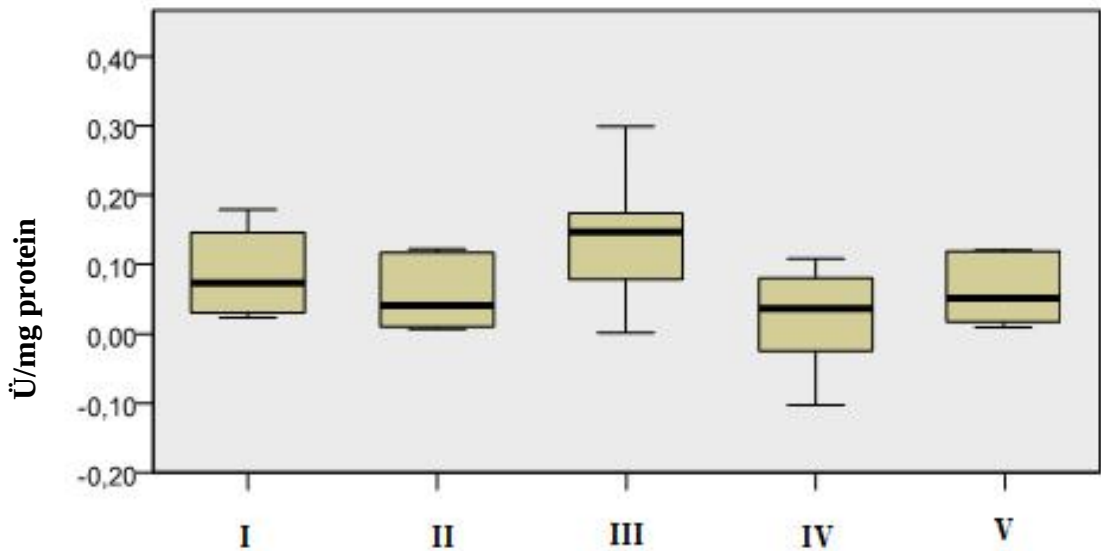


Şekil 3.2. Grupların böbrek dokusuna ait CAT aktiviteleri (I: Sağlıklı kontrol grubu n=7, II: Tümör Kontrol Grubu n=9, III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8, IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7)

3.5.1.2. Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesi

Süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerine karşı korumayı ifade eden SOD aktivitesi (Ü/mg), Grup I'de 0.07 Ü/mg, Grup II'de 0.04 Ü/mg, Grup III'de 0.16 Ü/mg, Grup IV'de 0.03 Ü/mg ve Grup V'de 0.05 Ü/mg olarak bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubu (Grup I), kanser grupları (Grup II-III-IV-V) ile karşılaştırıldığında, SOD aktivitesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Kanser kontrol grubu, gilaburu ekstraktının uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında ise SOD aktivitesi Grup III'de anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. ($p < 0.05$). Deney grupları kendi aralarında karşılaştırılarak SOD aktivitesinin anlamlılığı tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testlerine göre %95 güven aralığında bulunmuştur. SOD aktiviteleri Şekil 3.3' de gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak gilaburu uygulama gruplarından Grup III' deki artış ve bu grubun diğer gilaburu uygulama grupları olan Grup IV ve V ile karşılaştırıldığında aralarındaki anlamlı azalış, bu bitkiden uygun konsantrasyonların uygulanması halinde, antioksidan etkisinin olabileceği söylenebilir.

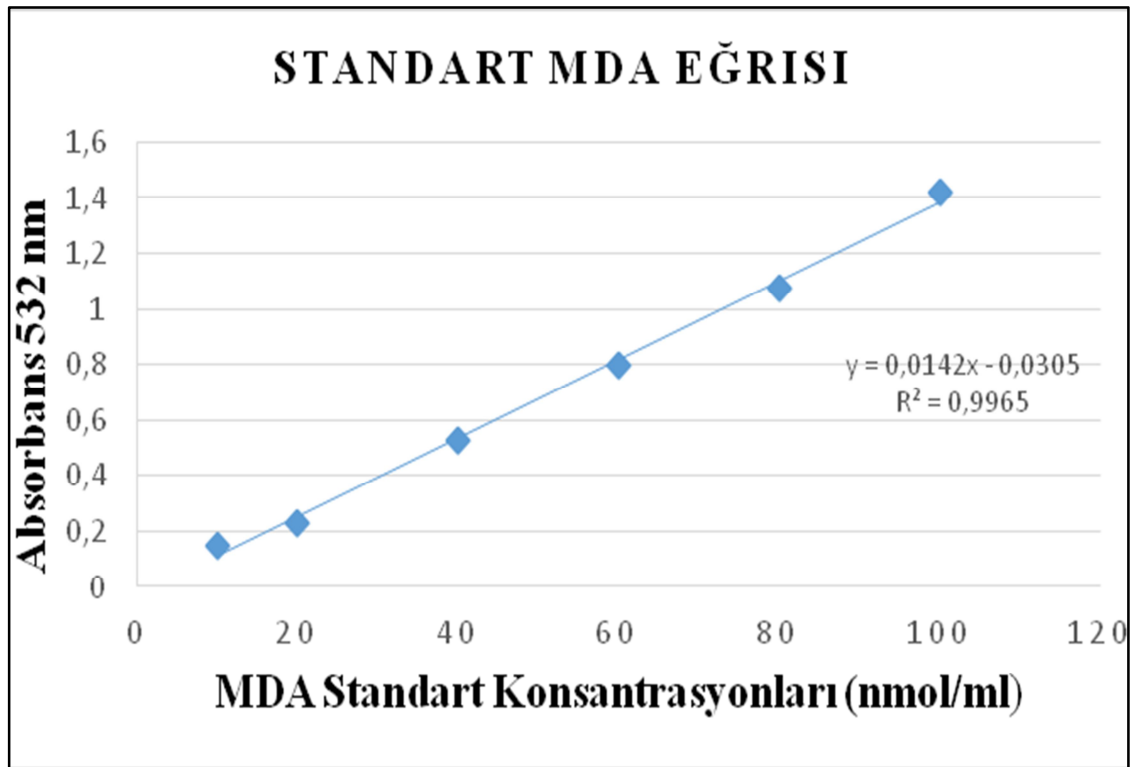
SOD Aktivitesi



Şekil 3.3. Grupların böbrek dokusuna ait SOD aktiviteleri (I: Sağlıklı kontrol grubu n=7, II: Tümör Kontrol Grubu n=9, III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8)

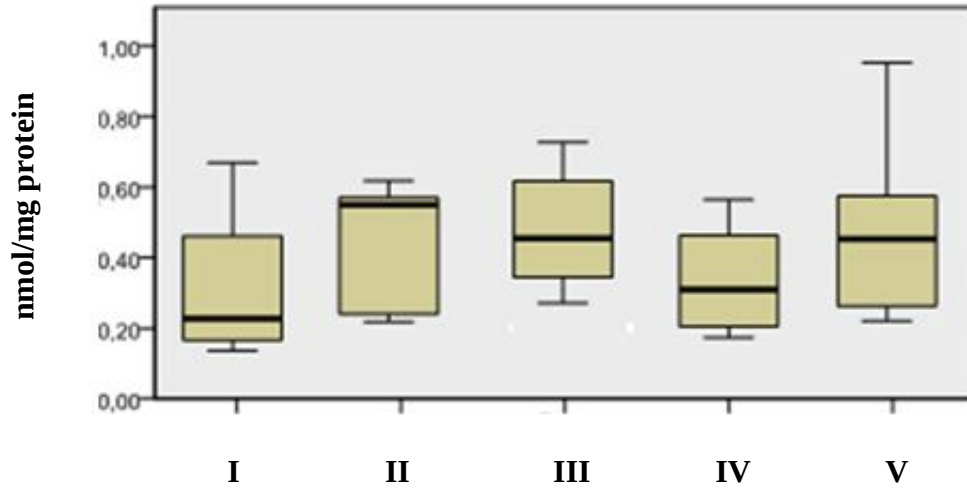
3.5.1.3. Böbrek Dokusunda MDA Düzeyi

Lipitlerin oksidatif olarak yıkılması sonucu hücreye toksik etki eden MDA standart eğrisi oluşturmak için hazırlanan MDA standartlarına ait 532 nm’de alınan absorbanslara göre çizilen standart eğri Şekil 3.4’ de gösterilmiştir. Deney gruplarının MDA aktivitesi nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Grup I’de (n=7) 0.21 nmol/mg protein, Grup II’de (n=9) 0.54 nmol/mg protein, Grup III’de (n= 8) 0.45 nmol/mg protein, Grup IV’de (n= 6) 0.31 nmol/mg protein ve Grup V’de (n= 6) 0.45 nmol/mg protein olarak ortalanca değerleri bulunmuştur. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırılarak MDA aktivitesinin anlamlılığı tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testlerine göre %95 güven aralığında bulunmamıştır. MDA düzeyleri grafik değerleri üzerinden nmol/mg protein cinsinden Şekil 3.5’ de gösterilmiştir. MDA düzeyi gruplar arasında ve gruplar içinde anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 3.4. MDA standart eğim grafiği

MDA Düzeyi



Şekil 3.5. Grupların böbrek dokusuna ait MDA düzeyleri (I: Sağlıklı kontrol grubu n=7, II: Tümör Kontrol Grubu n=9, III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8, IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7)

Böbrek dokusuna ait enzim düzeylerinin anlamlılık (p) değerleri Tablo 3.10' da verilmiştir.

Tablo 3.10. Böbrek dokusuna ait gruplar arası enzim düzeylerinin anlamlılık (p) değerleri

Doku	CAT Aktivitesi	SOD Aktivitesi	MDA Düzeyi
Böbrek	0.043	0.024	0.169

3.5.2. Karaciğer Dokusuna Ait Enzim Düzeyleri

Sağlıklı kontrol grubu, tümör kontrol grubu ve uygulama yapılan üç farklı grubun karaciğer dokusunun oksidan/antioksidan durumunun gösterilmesi için CAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Bulgular Tablo 3.11.'de verilmiştir.

Tablo 3.11. Deney gruplarının karaciğer dokusuna ait enzim düzeylerinin ortanca (25. ve 75. yüzdelikleri) değerleri

Grup No	CAT Ü/mg protein (Persentil 25 – 75)	SOD Ü/mg protein (Persentil 25 – 75)	MDA nmol/mg protein (Persentil 25 – 75)
Grup I (Sağlıklı Kontrol grubu n=7)	50.84 (40.02 – 53.32)	0.04 (0.03 – 0.11)	0.43 (0.28 – 0.54)
Grup II (Tümör Kontrol Grubu n=8)	21.27 (19.27 – 23.27)	0.08 (0.07 – 0.10)	0.74 (0.42 – 0.89)
Grup III (Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8)	27.88 (23.91 – 30.66)	0.11 (0.07 – 0.14)	0.81 (0.73 – 0.98)
Grup IV (Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=6)	30.94 (28.35 – 31.81)	0.03 (0.04 – 0.14)	0.48 (0.31 – 0.74)
Grup V (Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=6)	35.13 (30.65 - 42.18)	0.09 (0.03 - 0.15)	0.46 (0.11 - 0.71)

Değerler n, ortanca, 25. ve 75. yüzdelikler ile ifade edilmiştir. (CAT: Katalaz, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksitdismutaz)

Bulguların istatistiksel olarak anlamlılık (p) değerleri Tablo 3.12.'de verilmiştir. Bu değerler arasındaki ilişki aşağıda açıklanmıştır.

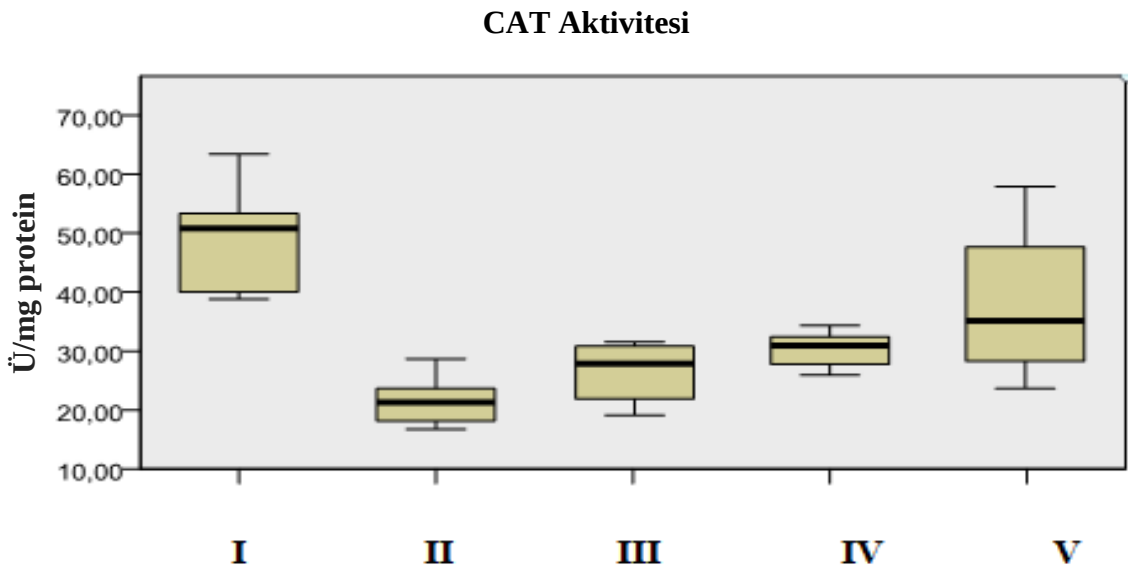
Tablo 3.12. Karaciğer dokusuna ait enzim düzeylerinin gruplar içi anlamlılık (p) değerleri

Grup No	CAT	SOD	MDA
I – II	0.000*	0.593	0.152
I – III	0.001*	0.593	0.152
I – IV	0.034*	0.593	0.152
I – V	0.150	0.593	0.152
II – III	0.147	0.593	0.152
II – IV	0.024*	0.593	0.152
II – V	0.000*	0.593	0.152
III – IV	0.339	0.593	0.152
III – V	0.042*	0.593	0.152
VI – V	0.387	0.593	0.152

* Gruplar arasında anlamlı olarak fark bulunmuştur.

3.5.2.1. Karaciğer Dokusunda CAT Aktivitesi

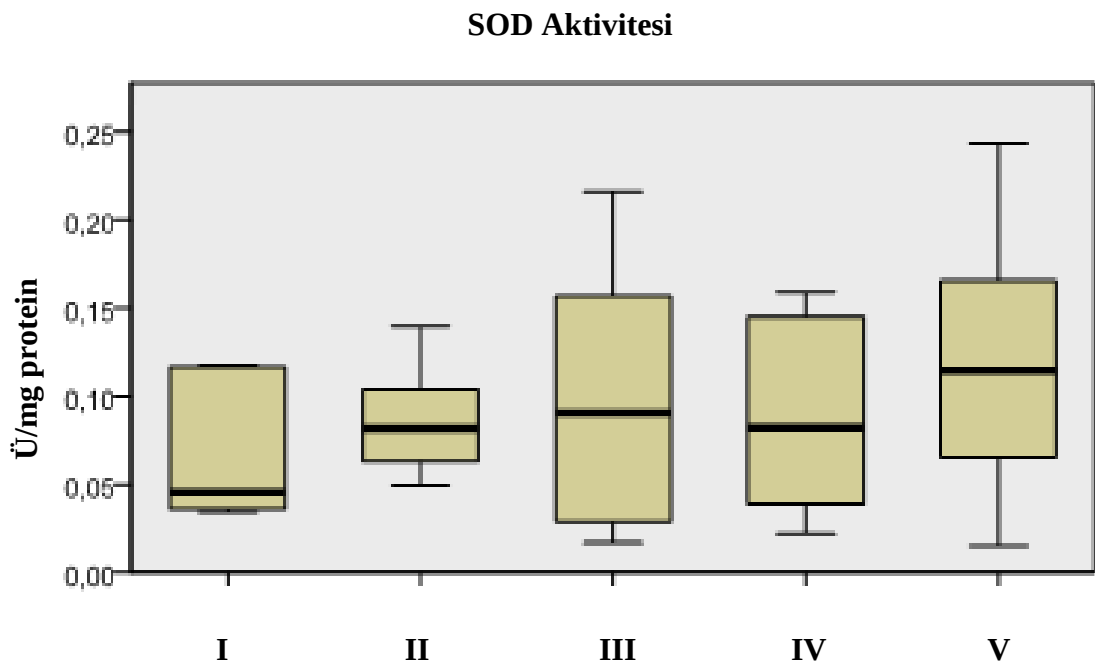
Karaciğerin savunma mekanizmasında yer alan önemli intrasellüler antioksidan enzimlerden olan CAT aktivitesi Ü/mg olarak bulunmuştur. Grup I'de 50.84 Ü/mg, Grup II'de 21.27 Ü/mg, Grup III'de 27.88 Ü/mg, Grup IV'de 30.94 Ü/mg ve Grup V'de 35.13 Ü/mg olarak ortalama değerleri bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubu (Grup I), kanser Grupları (Grup II-III-IV-V) ile karşılaştırıldığında, CAT aktivitesi Grup II, III ve IV' de anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Kanser kontrol grubu, gilaburu ekstraktının uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında ise CAT aktivitesi Grup IV ve V'de anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. ($p < 0.05$). Deney grupları kendi aralarında karşılaştırılarak CAT aktivitesinin anlamlılığı tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testlerine göre %95 güven aralığında bulunmuştur. CAT aktiviteleri Şekil 3.6' da gösterilmiştir. Tümör kontrol grubunda CAT aktivitesinde görülen bu azalışın tümör gelişmesinden kaynaklandığı ve gilaburu uygulama gruplarından grup III, IV ve V' deki artışın ise tümör gelişimine karşı gilaburunun savunma etkisinin olabileceği söylenebilir.



Şekil 3.6. Grupların karaciğer dokusuna ait CAT aktiviteleri (I: Sağlıklı kontrol grubu n=7, II: Tümör Kontrol Grubu n=9, III: Tümör ve 25mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8, IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7)

3.5.2.2. Karaciğer Dokusunda SOD Aktivitesi

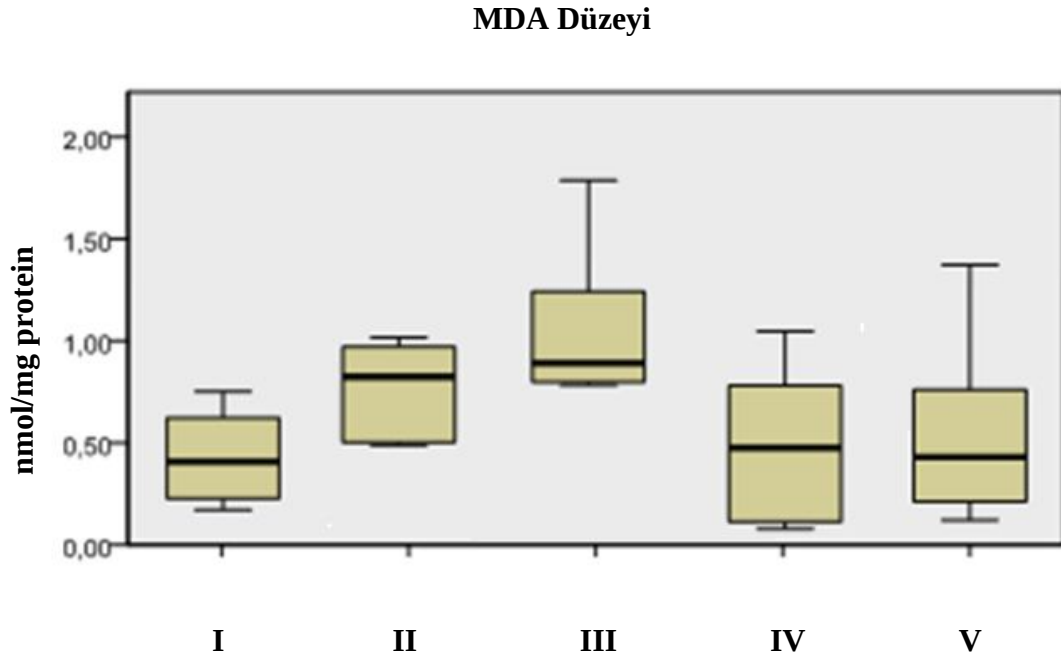
Karaciğerin savunma mekanizmasında yer alan önemli intrasellüler antioksidan enzimlerden olan SOD aktivitesi $\ddot{U}$ /mg olarak bulunmuştur. Grup I'de 0.04 $\ddot{U}$ /mg, Grup II'de 0.08 $\ddot{U}$ /mg, Grup III'de 0.09 $\ddot{U}$ /mg, Grup IV'de 0.03 $\ddot{U}$ /mg ve Grup V'de 0.11 $\ddot{U}$ /mg olarak ortalanca değerleri bulunmuştur. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırılarak SOD aktivitesinin anlamlılığı tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testlerine göre %95 güven aralığında bulunmamıştır ($p>0,05$). SOD aktiviteleri Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Grupların karaciğer dokusuna ait SOD aktiviteleri. (I: Sağlıklı kontrol grubu n=7, II: Tümör Kontrol Grubu n=9, III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8, IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7)

3.5.2.3. Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyi

Deney gruplarının MDA aktivitesi $\ddot{U}$ /mg olarak bulunmuştur. Grup I'de 0.43 nmol/mg protein, Grup II'de 0.74 nmol/mg protein, Grup III'de 0.81 nmol/mg protein, Grup IV'de 0.48 nmol/mg protein ve Grup V'de 0.46 nmol/mg protein olarak ortalanca değerleri bulunmuştur. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırılarak MDA aktivitesinin anlamlılığı tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testlerine göre %95 güven aralığında bulunmamıştır. MDA düzeyleri Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Grupların karaciğer dokusuna ait MDA düzeyleri. (I: Sağlıklı kontrol grubu n=7, II: Tümör Kontrol Grubu n=9, III: Tümör ve 25 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=8, IV: Tümör ve 50 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7, V: Tümör ve 100 mg Gilaburu Uygulama Grubu n=7)

Karaciğer dokusuna ait enzim düzeylerinin anlamlılık *p* değerleri Tablo 3.13’de verilmiştir.

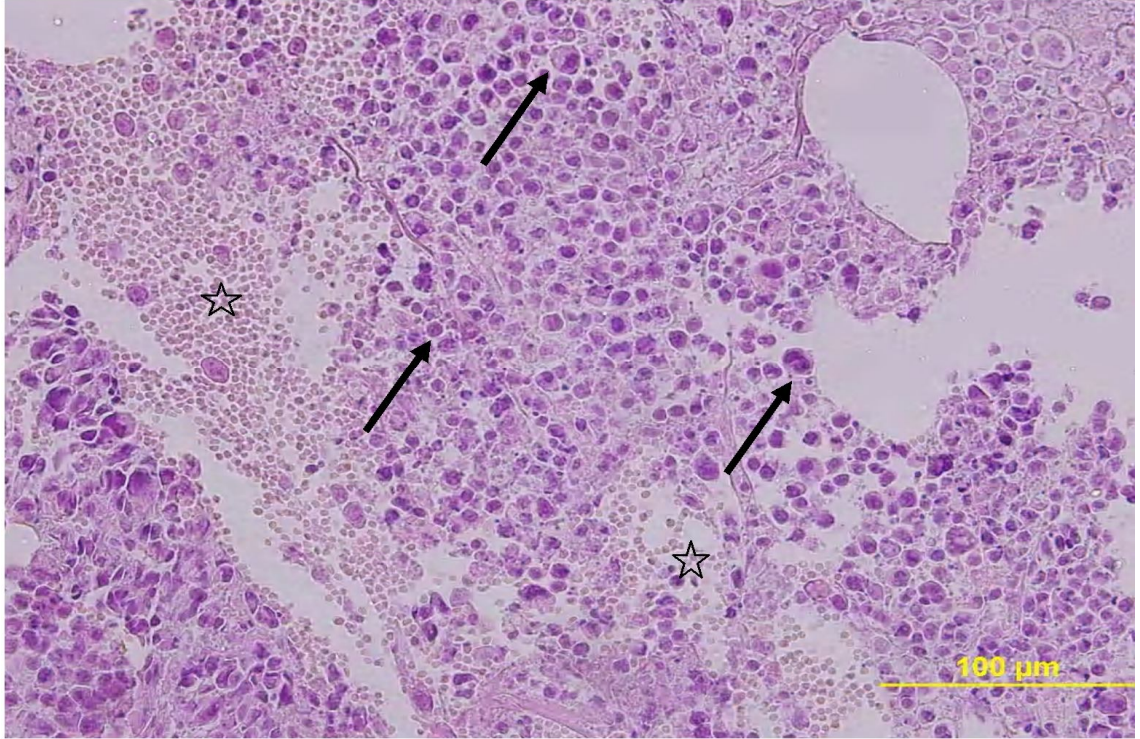
Tablo 3.13. Karaciğer dokusuna ait gruplar arası enzim düzeylerinin içi anlamlılık (*p*) değerleri

Doku	CAT Aktivitesi	SOD Aktivitesi	MDA Düzeyi
Karaciğer	0.000	0.593	0.082

3.6. Histopatolojik Bulgular

Yapılan deney sonucunda, farelerden alınan böbrek ve karaciğer dokularına hematoksilin-eozin (H&E) boyama metodu uygulanmıştır. Aynı yöntem fare periton boşluğunda katılaşmış halde bulunan tümör dokusuna da uygulanmıştır. Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda tümör dokusunun, böbrek dokusunda bağ dokusu kapsülüne giren hücreler ile aynı morfolojik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Şekil 3.9’ da EAT hücrelerine ait histopatolojik özellikler gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterirken, tümör

hücreleri enjekte edilen dokularda başta bağ dokusu kapsülünde anormal hücre yoğunlaşmaları göstermeleri yanı sıra dokuya özgü çeşitli hücre hasarları da gözlenmiştir.



Şekil 3.9. EAT hücrelerinin histopatolojik görüntüsü. → İri hiperkromatik nükleuslu ve eozinofilik sitoplazmaları ile farklı şekil ve büyüklüklere sahip tümör hücreleri: * Tümör hücreleri arasında bol miktarda kandan gelen hücreler bulunmaktadır (H&E, 40X)

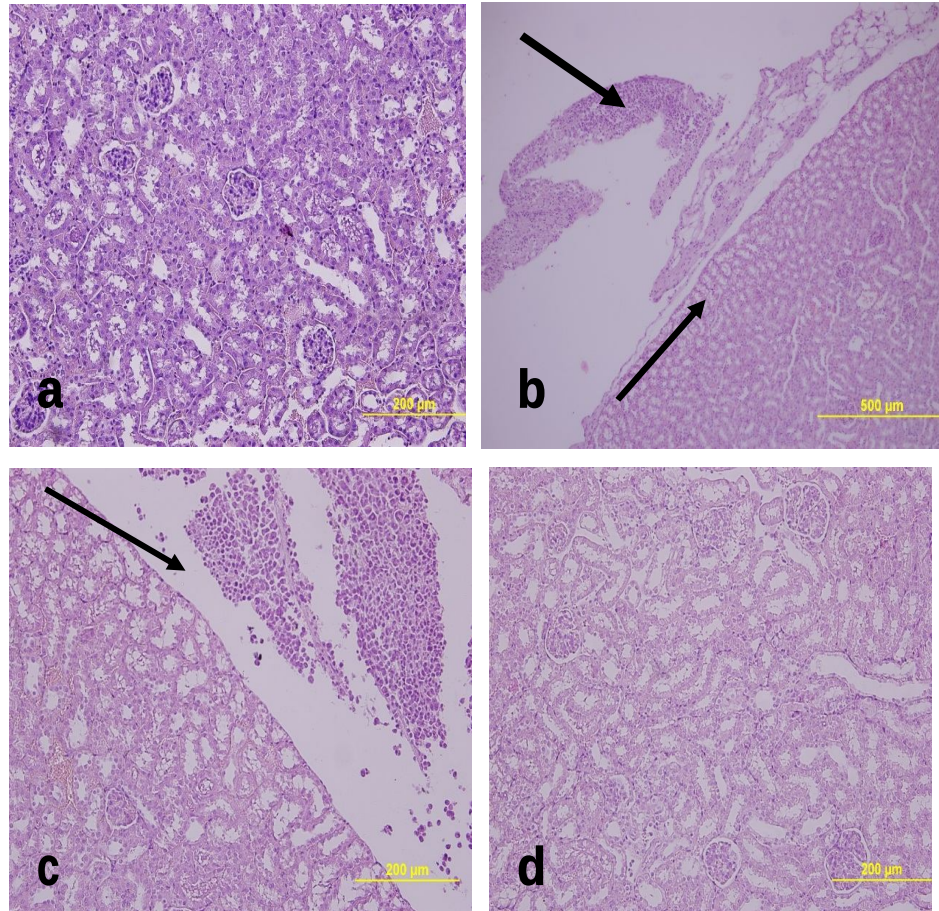
3.6.1. Böbrek Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme

Sağlıklı kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşim göstermekteydi. EAT hücreleri uygulanmayan bu grupta, glomerüller ve tübüller normal histolojik özelliklerini sergilediler.

EAT hücreleri uygulanan grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, sağlıklı kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı değişiklikler gösterdiği gözlenmiştir. Uygulama yapılan gruplara ait doku örneklerinde, bağ dokusu yapısındaki böbrek kapsülüne tutunmuş, değişen yoğunlukta tümör hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir. Histopatolojik olarak iri hiperkromatik nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı, farklı şekil ve büyüklüklere sahip atipik görünümlü EAT hücreleri Şekil 3.10' da

gösterilmiştir. a) Sağlıklı kontrol grubu: Normal histolojik yapısını korumaktadır (H&E, 20X). b) Tümör kontrol grubu, Grup II: Bu grupta EAT hücrelerinin böbrek kapsülüne invaze olduğu gözlenmiştir (H&E, 10X). c) Tümör ve 25 mg gilaburu uygulama grubu, Grup III: bu grupta tümör kontrol grubu ile aynı özellikleri göstermiştir. Bu grupta, tümör kontrol grubuna benzer şekilde anormal hücre yığınlarının olduğu gözlenmiştir (H&E, 20X). d) Tümör ve 100 mg gilaburu uygulama grubu Grup IV: bu grupta 25 mg gilaburu uygulanan gruba göre çok daha az hasar gözlenmiştir (H&E, 20X). Bu grupta tümör hücrelerinin kümeleşmesi gözlenmediği ve sağlıklı kontrol grubu ile benzer histolojik özellikler sergilediği gözlenmiştir.

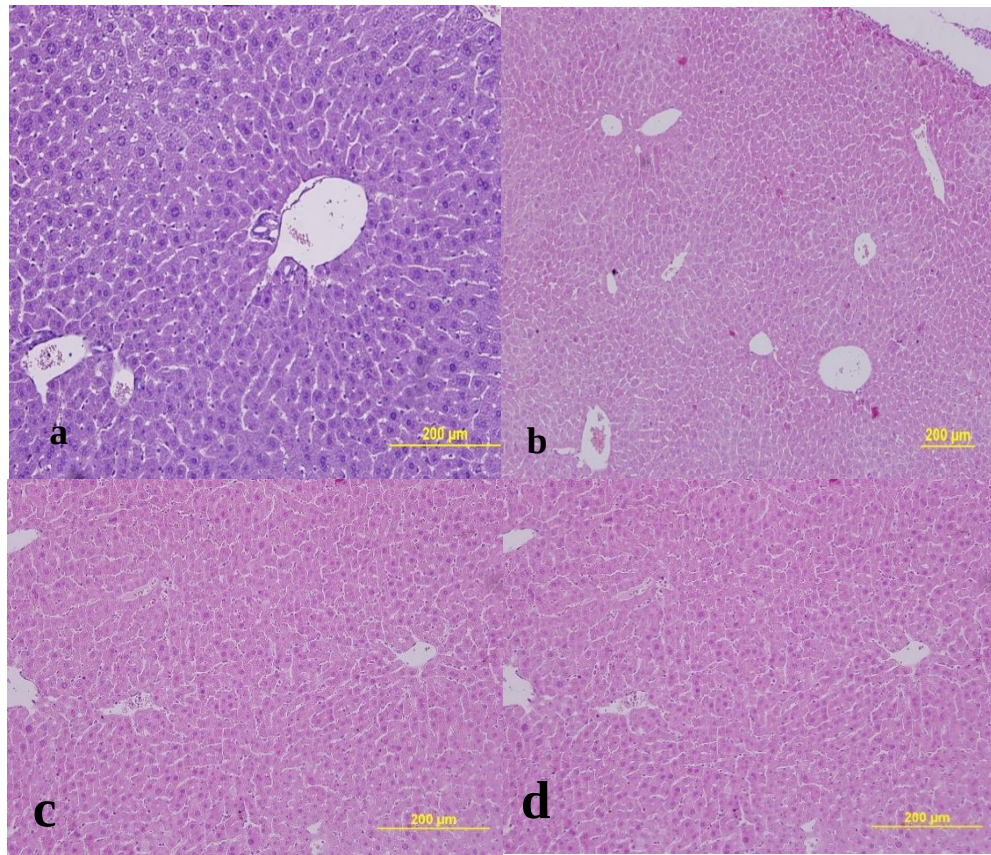
Tümör hücreleri ile birlikte farklı dozlarda gilaburu uygulanan gruplar değerlendirildiğinde, 100 mg gilaburu uygulanan grupta, 50 mg gilaburu uygulanan gruplara oranla böbrek parankimasının histolojik olarak normal özellikler sergilediği gözlenmiştir.



Şekil 3.10. Böbrek dokusunun sağlıklı kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik bulguları

3.6.2. Karaciğer Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme

Değerlendirmeler sonucunda, sağlıklı kontrol grubuna ait karaciğer dokuları normal parankimal yapı özelliklerini sergilemişlerdir. Lobüller içerisinde vena centralis etrafında ışınal tarzda dizilmiş karaciğer hücreleri (hepatositler) yer almaktadır. Hepatosit kordonları arasında karaciğer sinüzoidlerinin normal bir şekilde uzandığı gözlenmektedir. Portal alanlarda ise, bağ dokusu içinde yer alan hepatik arter, ven ve safra kanalı üçlüsü yer almaktadır. Şekil 3.11’de karaciğer dokusunun histopatolojik durumu gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Karaciğer dokusunun sağlıklı kontrol ve uygulama gruplarının histopatolojik bulguları. Kontrol ve deney gruplarında, değişen büyüklükte ve yoğunlukta tümör hücrelerine rastlanmamıştır. a) Sağlıklı kontrol grubu: Normal histolojik yapısını korumaktadır. b) Grup II, tümör kontrol grubu. c) Grup IV tümör ve 50 mg gilaburu uygulama grubu d) Grup V, tümör ve 100 mg gilaburu uygulama grubu (H&E, 20X)

Bu dokuda sağlıklı kontrol ve uygulama grupları dahil histopatolojik olarak anormal bir özellik gözlenmemiştir. Kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer dokusunda, hasar veya EAT hücrelerine rastlanmamıştır.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Tartışma ve Sonuç

Dünya Sağlık Örgütü gelişmiş ülkelerde bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanan ölümler ile bebek ölümlerinin oranı azalırken insan popülasyonundaki yaşlı oranının artması sonucu olarak kansere bağlı ölümlerin artacağını rapor etmektedir [128]. Günümüzde kanseri tedavi etmek için kullanılan geleneksel yöntemler; cerrahi operasyonlar, kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarıdır. Bu yöntemler yüksek maliyet gerektiren, toksik ve yan etkiler üreten, kimyasal ve fiziksel ajanların kombine ya da ayrı ayrı bileşiklerini içerdiklerinden, tedavi sürecinde hastanın normal yaşam sürecini zorlaştırmaktadırlar [129]. Bu nedenlerden dolayı geleneksel tedavilerin yan etkilerini azaltan, hastanın daha az etkilendiği yeni terapötik sistemlerin geliştirilmesi sürekli olarak araştırılmaktadır. Son zamanlarda kanser tedavisinde kemoterapi ile birlikte doğal diyet bileşikleri de kullanılmaktadır. Bu diyetler yaygın olarak flavonoid ve fenolik bileşikler içermektedir. İnsan diyetinin çok önemli bir parçasını oluşturan fenolik bileşikler antioksidan, antiinflamasyon ve antikanserojen özelliklere sahip olması nedeniyle ilgiyi üzerine çekmektedir. Fenolik bileşikler diğer bitki metabolitleri ile karşılaştırıldığında en geniş ve her yerde rastlanabilen bileşiklerdir [67].

Gilaburu ile ilgili yapılan çalışmalarda gilaburu meyve suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiş ve içerdiği bileşikler, bileşiklerin miktarları doğrultusunda antioksidan etkisi olduğu gösterilmiştir [60, 64, 65, 130-132]. Gilaburu meyvelerinin yüksek miktarda polifenolik bileşikler [21, 60], askorbik asit [60] ve L- malik asit [133] içerdiği bildirilmiştir. Gilaburu meyve suyunun diğer meyve suyu ve nektarlardan daha yüksek oranda klorojenik asit içerdiği ve total fenolik bileşiklerin %54 'ünü ihtiva ettiği rapor edilmiştir. Gilaburunun, (+)-kateşin, (-)-epikateşin, quersetin glikozitlerini ve proantosiyaniid içeren flavonoid kaynağı olduğu belirtilmiştir [21]. Ayrıca gilaburu

meyvesinde tanımlanan birkaç antosiyanlerden siyanidin-3-glikozit, bu bileşiklerin tanımlanmasında en önemli temsilci olduğu bildirilmiştir. [134]. Buna ek olarak başka bir çalışmada gilaburunun karotenoidleri de içerdiği rapor edilmiş [135], ekstraktlarının güçlü radikal temizleyici özelliğinin içerdiği yüksek fenolik konsantrasyonundan kaynaklandığı [64,65] ve ayrıca antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [136]. Kalyoncu ve arkadaşları gilaburu meyvesinde K ve C vitaminlerinin bol miktarda bulunduğunu ve bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde kullanıldığını bildirmişlerdir [137]. Gilaburu suyunda toplam kuru madde miktarı %9.25, çözünür kuru madde miktarı ise %8.6 olarak bulunmuştur. Ayrıca mikroenkapsüle gilaburu örneklerinin suda çözünürlüğünün %97-98 olarak belirlenmiştir [138]. Cesoniene ve arkadaşları gilaburu meyve suyunun biyokimyasal özelliklerini araştırmışlar ve titrasyon asitliğini $3.2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, total fenolik içeriğini $1106.0 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, kuru madde miktarını $16.9 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, suda çözünür kuru madde miktarını $11.4 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ olarak bildirmişlerdir [60]. Yapılan başka bir çalışmada gilaburu meyvelerinin KNB02 ve KLÇ02 olmak üzere iki farklı genotipinin sırasıyla tartarik asit içeriğini $1.41 - 1.24 \text{ g kg}^{-1}$ diğer organik asitlerden kateşin içeriğini $284.96 \text{ mg kg}^{-1} - 352.04 \text{ mg kg}^{-1}$, gallik asit miktarını $108.29 \text{ mg kg}^{-1} - 118.17 \text{ mg kg}^{-1}$, klorojenik asit miktarını $29.51 \text{ mg kg}^{-1} - 44.33 \text{ mg kg}^{-1}$, quersetin miktarını $6.11 \text{ mg kg}^{-1} - 8.32 \text{ mg kg}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca iki genotipe ait vitamin içeriği, potasyum (K) miktarını $2970 \text{ mg L}^{-1} - 2680 \text{ mg L}^{-1}$ kalsiyum (Ca) $1186 \text{ mg L}^{-1} - 1752 \text{ mg L}^{-1}$, magnezyum (Mg) $1340 \text{ mg L}^{-1} - 1190 \text{ mg L}^{-1}$, C vitaminin değerini ise $33.432 \text{ mg } 100\text{g}^{-1} - 32.761 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir [68]. Sunulan bu tez çalışmasında ise gilaburu meyve suyunun fizikokimyasal özelliklerinden titrasyon asitliği 9.6 g L^{-1} , formol sayısı 1.6, suda çözünür kuru madde miktarı 11.44 briks, C vitamini değeri 335 mg L^{-1} , toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden 3903 mg L^{-1} olarak bulunmuştur. Ayrıca mineral madde değerlerinden sodyum (Na), 19.0 mg L^{-1} , K değeri 1115 mg L^{-1} , Ca değeri 46.8 mg L^{-1} ve Mg değeri 40.8 mg L^{-1} olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalara bakıldığında titrasyon asitliği, suda çözünür kuru madde miktarı, toplam fenolik içeriği ve K, Ca, Mg içerikleri bizim çalışmamıza göre daha yüksek orandadırlar. Değerlerdeki bu farklılığın, gilaburunun farklı bölgelerden toplanması, gilaburunun cinsinden ve yetiştirme şartlarından dolayı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çevresel faktörlerinde bu durumu etkileyebileceği olasılıklar arasındadır. Bu kadar fazla biyoaktif bileşen içeren

gilaburunun daha geniş uygulama alanlarının olabileceği, gıda ve tıbbi amaçlar için umut verici bir bitki olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan literatür taramasında gilaburu bitkisinin EAT hücreleri üzerine etkilerini gösteren *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara rastlanmamıştır. Ancak Ülger ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gilaburu meyve suyunun deneysel olarak oluşturulan kolon kanseri üzerine etkin olduğu ve metastazı engellediği rapor edilmiştir [24]. Diğer taraftan *Viburnum* cinsine ait diğer türlerin sitotoksitesinin insan kanser hücre hatları üzerine değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. El-Gamal'in yaptığı çalışmada *V. awabuki* türünden kromatografik yöntemler kullanarak elde edilen triterpen türevlerinin antikanser etkisi insan akciğer ve kolon adenokarsinom hücre hatları üzerinde çalışılmış ve 6,30-dihidroksi-3-oxolup 20(29)-en-28-oic asit ve 20 hidroksi-3-oxolup-28-oic asit bileşenlerin daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir [139]. Li ve arkadaşları *V. foetidum* türünün ekstraktlarından izole edilen 3,4,40-trihidroksi-30,9-dimethoksi- 9,90-epoksilignan ve 4,40-dihidroksi-3,30,9-trimethoksi-9,90-epoksilignan'ın cilt melanomu hücre hattı üzerinde, 3,40-dihidroksi-30,4, 9-trimethoksi- 9,90-epoksilignan'ın ise ovarium hücre hattı üzerine daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [140].

Diğer taraftan EAT hücrelerine karşı *in vivo* ortamda tıbbi özellik gösteren birçok bitki ve mantar türlerinin, farklı kısımlarından farklı çözücülerle elde edilmiş ekstraktın, bitkilerden izole edilmiş fragmentler ve bileşiklerin, ayrıca bitkilerden yapılmış olan ajanların, geleneksel tedavide kullanılan kemoterapötik ilaçların antitümöral etkisi değerlendirilmiştir. Facchini ve arkadaşları bir mantar cinsi olan *Pleurotus ostreatus*'a ait polisakkarit fraksiyonlarının etkilerini farelere intraperitoneal olarak enjekte edilen 5×10^6 EAT hücre üzerinde araştırmışlar ve fraksiyonların yüksek tümör inhibisyonu gösterdiğini belirtmişlerdir [141]. Gevorgyan ve arkadaşı hidroksietiltiamin difosfatın antikanser etkisini *in vivo* solid tümör üzerinde çalışmışlardır. EAT hücreleri 1×10^6 olacak şekilde her fareye subkutan olarak enjekte edilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek ve anlamlı tümör inhibisyon oranı gösterdiğini bildirmişlerdir [142]. Hanafy, antioksidan ve antikarsinojen özellikleri ile dünya çapında yaygın bir şekilde tıbbi bitki olarak kullanılan *Ginger* bitkisinin, EAT hücrelerinin $2,5 \times 10^6$ olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edildiği fareler üzerindeki etkisini çalışmış ve *ginger* bitkisinin kanseri önlemede ve tedavisinde potansiyel aday olabileceğini vurgulamıştır [143]. Dolai ve arkadaşları *Anthocephalus*

cadamba bitkisinin metanol ekstraktının EAT hücrelerinin intraperitoneal olarak enjekte edildiği farelerde, *in vivo* tümör potansiyeline, *in vitro* sitotoksik etkisine, tümör hacmi ve ağırlığına, karaciğer ve böbrek dokusunda antitümör aktivitesi ve antioksidan etkisine bakmışlar ve tedavi edilen gruplarda ölü hücre sayısının EAT kontrol grubuna göre çok daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [144]. Alam ve arkadaşları *Piper betle* bitkisinin yapraklarının ekstraktını ve bu bitkinin fraksiyonlarının EAT üzerindeki antikanser etkisinin olup olmadığını değerlendirmişler ve bu bitkinin tümör gelişimini inhibe etmede potansiyel bir aday olabileceğini bildirmişlerdir [145]. Samudrala ve arkadaşları *Alternanthera brasiliensis* bitkisinin etil asetat ekstraktının (EAAB) EAT üzerindeki antikanser etkisini çalışmışlar ve bu bitkinin antitümoral etkisinin olduğunu bildirmişlerdir [146].

Yukarıda verilen çalışmalardan anlaşılacağı üzere EAT modeli bitki ekstraktları, bitkilerden izole edilmiş fragment, bileşik ve ajanların *in vivo* ortamda antitümoral etkisinin çalışılabileceği uygun bir modeldir. Yapılan bu çalışmada EAT hücreleri üzerinde gilaburu meyve suyundan elde edilen ekstraktın, hayvanlara enjekte edilmiş assit sıvısından (EAT hücreleri) kaynaklandığı bilinen farelerin vücut ağırlığındaki artış, canlı ve ölü hücre sayısındaki değişim, *in vivo* şartlarda araştırılmış ve ayrıca *in vitro* sitotoksikite bulguları değerlendirilmiştir. 100 ve 50 mg gilaburu ile tedavi edilen gruplar, EAT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kilo değişiminde anlamlı bir azalma görülürken, düşük konsantrasyonda gilaburu uygulanmasının (25 mg) ise tümör hücrelerinin çoğalmasını fazla engellemediği görülmüştür. Gilaburunun *in vivo* sitotoksikite potansiyeli tripan mavisi yöntemi ile canlı ve ölü hücre sayısı tespit edilerek değerlendirildiğinde kilo değişimine uygun olarak yüksek doz gilaburu uygulanan gruplarda ortalama canlı hücre sayısı, düşük doz gilaburu uygulama grubuna göre daha azdır. Ayrıca gilaburunun *in vitro* sitotoksikite potansiyeli de tripan mavisi yöntemi ile çalışılmıştır. 125, 250, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonları üzerinde IC_{50} değerleri hesaplanmıştır ve IC_{50} değeri 199,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar gilaburu ekstraktının ya direkt olarak sitotoksik etki göstererek EAT hücrelerinin ölümüne neden olduğunu ya da çoğalmasını engellediğini düşündürmektedir.

Oksijen türevli radikallerin kanser gelişiminin etiyolojisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir [147]. Bu serbest radikaller yüksek reaktif kimyasal moleküller ve

DNA arasındaki etkileşimin sonucu olarak ortaya çıkan mutajenik kapasiteye sahiptir [148]. Bu mutajenik etkiye karşı hücrenin oksidatif hasardan kendini koruması, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler tarafından sağlanır. Karaciğer ve böbrek dokusu, aşırı oksijen metabolitlerin oluşturduğu hasarı önleyen antioksidanlara sahiptir. Bu antioksidanlar hem peroksitleri hem de serbest radikalleri etkisiz hale getirir [149]. CAT; oluşan H_2O_2 'i substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalayarak H_2O_2 detoksifikasyonunu sağlayan peroksidazlardandır. CAT aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur [150]. SOD ise hücrede süperoksit anyonlarına karşı koruma sistemini sağlamaktadır. MDA, kanserli dokuların dejeneratif bozunması süresince oluşan lipid peroksidasyonunun son ürünü, oksidatif stresin biyomarkırıdır ve kanserli dokularda normal dokulara göre daha fazla artış göstermektedir [151]. Oksidatif stres lipidler gibi makromoleküllere zarar verebilir ve lipid peroksidasyonunu indükleyebilir [152]. Lipid peroksidasyonunun yükselmesi kanser ile ilişkili olduğu bilinmektedir [153]. Bu enzimlerin aktivitelerinin, kanser gibi oksidan stresin arttığı durumlarda adaptif bir mekanizma ile arttığı bilinmektedir [93]. Ancak literatür çalışmalarına bakıldığında EAT hücreleri ile oluşturulan tümör modellerinde CAT ve SOD aktivitesinin, sağlıklı kontrol grubuna göre tümör kontrol gruplarında azaldığı ve bu durumun tümör gelişiminin bir sonucu olduğu belirtilmiştir [26, 126]. SOD, GSH ve CAT aktivitesinde görülen azalma ise kötü huylu değişimin belirtisi olarak tanımlanır [154]. Sunulan bu tez çalışmasında gilaburu ekstraktının hücresel hassasiyetindeki değişikliği anlamak için oksidatif stresin potansiyel rolü, böbrek ve karaciğer dokusunda CAT, SOD enzim ve MDA düzeyleri tayin edilerek araştırılmıştır.

Senthilkumar ve arkadaşları böbrek ve karaciğer dokusunda EAT hücrelerine karşı *Careya arborea* bitkisinin metanol ekstraktlarının (MECA) antitümör ve antioksidan aktivitesini çalışmışlardır. Hem karaciğer hem de böbrek dokusunda sağlıklı kontrol grubuna göre tümör kontrol grubunda MDA seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığını, CAT ve SOD aktivitelerinin ise anlamlı bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. MECA ile tedavi edilen gruplarda ise bu aktivite değerlerinin sağlıklı kontrol grubuna ait değerlere yaklaştığını belirtmişlerdir. CAT ve SOD aktivitesindeki bu inhibisyonun tümör gelişiminden kaynaklandığını bildirmişlerdir [155]. Mookerjee ve arkadaşları EAT hücrelerinin inokülasyonun yapıldığı farelerin böbrek, karaciğer, kalp ve akciğer dokularında bakır glisinat ve doksorubusin ilacının tedavi etkisini değerlendirmişlerdir.

GPx, CAT ve SOD aktiviteleri tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını, bakır glisinat ve doksorubusin ile tedavi gruplarda ise doza bağımlı olarak bu aktivitelerin arttığını vurgulamışlardır. Sonuç olarak dokularda oksidatif stresin azalması için bakır glisinatın SOD, CAT ve GPx'in düzenlenmesini sağladığı bildirilmiştir [156]. Kumar ve arkadaşları, farelerde EAT hücrelerine karşı *Streblus asper* bitkisinin metanol ekstraktlarının (MESA) antioksidan ve antitümör etkisini araştırmışlardır. Böbrek ve karaciğer dokusunda tümör kontrol grubunda CAT, SOD düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu dokuda MESA ile tedavi edilen gruplarda lipid peroksidasyonunu seviyesi doza bağımlı olarak düşerken, CAT aktivitesinin doza bağımlı olarak arttığını, GSH ve SOD aktivitelerinin ise düştüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre bu bitkinin EAT hücrelerine karşı lipid peroksidasyonunu düzenleyerek antitümör etki gösterdiği, SOD ve CAT aktivitelerini artırmasıyla antioksidan koruma sistemini destekleyerek antitümör etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [157]. Karmakar ve arkadaşları *Curcuma caesia* bitkisinin metanol ekstraktının (MECC) EAT hücrelerinin inokülasyonunu yapıldığı farelerde antitümör ve antioksidan etkisinin olup olmadığını çalışmışlardır. Bu grubun yaptığı çalışmada da böbrek ve karaciğer dokularında, tümör kontrol grubunda CAT, SOD, GSH düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını, MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu dokularda MECC ile tedavi edilen gruplarda lipid peroksidasyonun SOD ve GSH seviyesinin, doza bağımlı olarak azaldığını ve CAT aktivitesinin doza bağımlı olarak arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlarla bu bitkinin potansiyel antitümör etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir [158]. Bizim çalışmamızda böbrek dokusunda benzer sonuçlara ulaşılmıştır. EAT kontrol grubunda SOD ve CAT aktiviteleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalış gösterirken, tedavi edilen gruplarda CAT aktivitesi doza bağımlı olarak artmıştır. SOD aktivitesinde 25 mg ve 100 mg gilaburu uygulama gruplarında artış görülmüştür. Ancak bu tez çalışmasında böbrek dokusunda MDA düzeyinde anlamlı bir artış ya da azalış görülmemiştir. EAT hücrelerinin inokülasyonundan sonra bu hücreler aktif olarak çoğalmaya başladıkları zaman, serbest oksijen radikal üretimini kuvvetlendirdiğini belirten böbrek dokusunda, birçok fonksiyonunda etkili olduğu bilinen CAT aktivitesi seviyesini artırmıştır. Bizim sonucumuz ve literatür çalışmaları göz önüne alındığında gilaburu bitkisinin antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliğinden dolayı antitümöral olabileceğini göstermektedir. CAT aktivitesinin anlamlı olarak yükselmesi

gilaburu ekstraktının güçlü antikanser aktivitesi olduğunu göstermektedir. Histopatolojik değerlendirmeler neticesinde gilaburu ekstraktının düşük dozların yüksek dozlara göre böbrek dokusunda seroza tabakasına tümör tutulumunu daha fazla arttırdığı görülmüştür. Tümör ve 25 mg gilaburu uygulama grubu ile tümör kontrol grubunda EAT hücreleri neredeyse aynı oranda seroza tabakasına yerleşmiştir. 100 mg ve 50 mg gilaburu uygulama grubunda ise tümör hücrelerinin seroza tabakasında daha az olduğu görülmüştür.

Samudrala ve arkadaşları *Alternanthera brasiliana* bitkisinin etil asetat ekstraktının (EAAB) antitümöral etkisini değerlendirmişlerdir. Karaciğer dokusunda tümör kontrol grubunda CAT, SOD düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir [146]. Gupta ve arkadaşları *in vivo* EAT hücrelerine karşı *Bauhinia racemosa* bitkisinin antitümör ve antioksidan aktivitesini çalışmışlardır. Karaciğer dokusunda tümör kontrol grubunda CAT, SOD aktivitelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca karaciğer dokusunda bu bitki ile tedavi edilen gruplarda lipid peroksidasyonu seviyesi doza bağımlı olarak düşerken, SOD ve CAT aktivitesinin doza bağımlı olarak arttığını belirtmişlerdir. Bu bitkinin serbest radikal temizleyici ve antioksidan olma özelliğinin olabileceğini rapor etmişlerdir [159]. Yine bu ekip *in vivo* EAT hücrelerine karşı *Caesalpinia bonducella* bitkisinin antitümör ve antioksidan aktivitesini çalışmışlardır ve yine benzer olarak tümör kontrol grubunda CAT, SOD aktivitelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir [160]. Alam ve arkadaşları da karaciğer dokusunda tümör kontrol grubunda CAT, SOD aktivitelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığını MDA düzeyinin ise arttığını bildirmişlerdir [145]. Dolai ve arkadaşları karaciğer dokusunda MDA enzim düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna göre tümör kontrol grubunda anlamlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca tümör hücrelerinin çoğalmasının sonucu olarak SOD ve CAT aktivitelerinin inhibisyonunu rapor etmişlerdir [144]. Sreelatha ve arkadaşları *Sesbania grandiflora* bitkisinin etanol ekstraktının EAT hücreleri üzerine antikanser aktivitesini değerlendirmişler. Karaciğer dokusunda kanser kontrol grubunun MDA düzeyi sağlıklı gruba göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. SOD ve CAT aktivitesinin de tedavi gruplarına göre kanser kontrol grubunda anlamlı bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir [161]. Naitik ve arkadaşları Swiss albino cinsi farelerde EAT hücrelerine karşı

Terminalia catappa bitkisinin antioksidan ve antitümör aktivitesini değerlendirmişlerdir. Bu bitki ile tedavi edilen gruplarda, karaciğer dokusunda MDA enzim düzeyi anlamlı olarak azalmıştır. Tümör kontrol grubunun karaciğer dokusundaki total SOD ve CAT aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir. Tümör kontrol grubundaki bu azalışın tümör gelişmesinin bir sonucu olduğunu rapor etmişlerdir [162]. Bu tez çalışmasının sonuçlarına bakıldığında literatür bilgileri ile benzerlik göstermektedir. Bizim sonuçlarımızda da karaciğer dokusunda CAT aktivitesi tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre düşmüştür. Gilaburu ekstraktlarının farklı dozlarda uygulandığında diğer gruplarda ise CAT aktivitesi tümör kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu dokuda CAT aktivitesinde görülen değişikliğin ise karaciğerde CAT aktivitesinin yoğun olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. H_2O_2 miktarındaki artış, hidroksil radikalının artmasına ve bunun sonucunda da lipid peroksidasyonuna yani MDA seviyesinde artışa neden olur. Karaciğerde oksidan hasar sonucu bazı çalışmalarda LPO arttığı, GSH, CAT ve SOD değerlerinin azaldığı [163], bazılarında da SOD değerlerinin değişmediği gösterilmiştir [164]. Bizim çalışmamızda da MDA düzeyinde ise tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre artış görülmektedir ancak bu sonuç istatistiksel açıdan anlamlılık ifade etmemektedir. Ancak bizim çalışmamızda karaciğer dokusunda SOD aktivitesinde gruplar arasındaki farklılıklar görülmesine rağmen bu farklılık anlamlı olarak bulunmamıştır. Bu durum ise karaciğer dokusunun histopatolojik bulguları ile desteklenmiştir. Bu dokunun tümör kontrol grubu, sağlıklı kontrol grubu ve gilaburu ile tedavi edilen diğer uygulama gruplarının histopatolojik bulgularında normal karaciğer histolojisi izlenmiştir. Bu dokuda dejenere yapıya veya EAT hücrelerine rastlanmamıştır. Literatür çalışmalarının ve bu tez çalışmasının biyokimyasal sonuçlarına bakıldığında kanserli dokularda antioksidan enzimlerin aktivitelerinde değişkenlik söz konusudur. Araştırmacılar kanserli dokularda, mitokondrial antioksidan enzim olan manganez süperoksitdismutaz seviyesinde bazen azalış olduğunu, ancak bazen de bu enzimin seviyesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir. Temel kanser hücrelerinin seçim sürecine bağlı olarak, hücreler metastaza uğrayıp MnSOD aktivitesinin yüksek seviyede ifade edilmesine neden olurlar. Bunun sonucunda MnSOD seviyesinin kanserli dokularda normal dokulara göre daha değişken olduğu vurgulanmıştır. Bu durumda, mRNA regülasyonu ya da post translasyonel modifikasyonlardaki anormalliklerin, gen ekspresyonu ya da hücre farklılaşmasından sonuçlanan antioksidan enzim seviyesinin değişkenliğinden kaynaklanıp

kaynaklanmadığının anlaşılması için daha fazla çalışma gereklidir [163,164]. Kanser dokularındaki katalaz aktivitesindeki değişim ise onun promotorundaki beklenmeyen metilasyon, katalaz transkribinin negatif yönde düzenlenmesine neden olabilir. Bu durum ROS seviyelerini de etkiler. Bu negatif yönde düzenleme karsinomalarda gözlenmiştir ancak bu düşüşün nedeni kesin olarak bulunamamıştır, sonuçları tahmin edilememektedir. Katalaz ekspresyonunun azalmasının sonuçlarından biri tümör devamlılığınca transkripsiyon faktörünün kaldırılmış olması olabilir. Tümörden arındırılan bir metabolizmada katalaz aktivitesi normal düzeydedir [165].

Ayrıca bu tez çalışmasında bu kanser hücrelerinin karaciğer dokusuna zarar vermemesi, karaciğer dokusunda metastaz görülmemesi, böbrek dokusunda tedavi edilen gruplarda EAT hücrelerinin tutulumunun daha az olması gilaburu bitkisinin içerdiği bilinen sekonder metabolitler olan bitki fenoliklerinin kanser üzerindeki mekanizmasına bağlı olabilir. Sonuçta sekonder metabolitlerden olan ve gilaburu bitkisinde de bol miktarda bulunduğu literatür bilgilerden kanıtlanan fenolik bileşikler karsinojen metabolizmasını düzenleyici özelliklere sahiptir. Fenolik bileşikler, hidroksil grubunun hareketliliğindeki elektron ilişkisi sebebiyle, gerçekten çok önemli antioksidanlardır ve bunların en iyi örnekleri vitamin E ve butil hidroksil tolüendir. Fenolik bileşiklerin radikal temizleyici özellikleri, onların, oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında süperoksit, peroksil, alkoksil ve hidroksil radikalleri azaltma potansiyelinin daha güçlü olması ve oksijen radikallerinden daha az reaktif olmalarından kaynaklanmaktadır. Ancak bitkisel polifenoller reaktif oksijen radikal temizleyici ve şelat redoks metal özellikleri nedeniyle antioksidan olarak tanımlanmalarına rağmen, bazı biyolojik bileşenlerin oksidatif hasarı ile sonuçlanabilen pro-oksidatif aktiviteye sebep olabilirler [166].

Sonuç olarak bu tez çalışmamızda farelerin ağırlık değişimi, *in vivo* sitotoksite, biyokimyasal ve histopatolojik verilere bağlı olarak uygulanan dozlar arasında 50 mg gilaburu uygulama grupları, kanser kontrol ve diğer uygulama gruplarına göre tümör gelişimini daha engelleyici özellik göstermiştir. Gilaburu ekstraktlarının değişen konsantrasyonlarda *in vitro* sitotoksik etkisinin %50 olması, gilaburu bitkisinin antikanser etkisinin olabileceğini daha da kuvvetlendirmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, Balb/C türü farelerde oluşturulan sıvı EAT'nin gilaburu ekstraktı ile tedavi edilebileceği izlenimi elde edilmiştir. Ancak bu bitkinin ve uygulanan konsantrasyonun kanser tedavisinde etkin terapötik madde olarak kullanımı için daha

ileri çalıřmalara ihtiyaç olduėu dűřűnűlmektedir. Gilaburunun EAT hűcrelerine karřı antitűműral etkisinin hangi bileřik tarafından daha fazla kaynaklandıėını anlamak için yukarıda verilen literatűr çalıřmaları gűz űnűne alınarak gilaburunun farklı bileřenlerinin farklı kromotografik yűntemler ile ayrılarak her bileřiėin karakterizasyonu yapılarak EAT hűcreleri űzerine ayrı ayrı veya kombinler halinde deėerlendirilmesi gerekmektedir. Bu alıřma ile Tűrkiye genelinde çok fazla bilinmeyen ancak tıbbi űzellikler gűsterdiėine inanılan bu bitki hakkında yapılan deneysel çalıřmaların sonuçları ile literatűre yeni bilgiler saėlanmış olacaktır. Ayrıca űlkemizde yeni yeni gerçekleřtirilen hűcre kűltűrű ve doėal anti kanserojenlerin etkinliėi konusunda yapılan çalıřmalara temel niteliėini saėlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Sözmen, Y., 1990. Selim ve Malign Meme Dokusunda Serum ile Kıyaslamalı Önemli Element Değişiklikleri. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 3s.
2. Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, **6**: 924-935.
3. Abdullaev, F., 2001. Plant-driven agents against cancer, pp 345-354. In: Pharmacology And Therapeutics In The New Millennium. (Eds: S.K., Gupta,) Narosa Puplising House, New Delhi, India.
4. Weiss, R. B., Henney, J. E., DeVita, V.T., 1981. Multimodal treatment of primary breast carcinoma. Analıysis of accomplishments and problem areas. **The Amercian Journal of Medicine**, **70**(4): 844-851.
5. Bonadonna, G., 1990. Does chemoterapy fulfill its expectations in cancer treatment? **Annals of Oncology**, **1** (1): 11-21.
6. Aykan, F. N., 1991. Meme Kanserinde Adjuvan Kemoterapinin Bazı Humoral İmmün Sistem Parametreleri Üzerine Etkisi İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi. İstanbul, s2.
7. Dhar, A., Mehta, S., Dhar, G., Dhar, K., Benerjee, S., Veldhuzizen, V. P., Campbell, D. R., Benerjee, S. K., 2009. Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. **Molecular Cancer Therapeutics**, **8** (2): 315-23.
8. DeFeudis, F.V., Papadopoulos, V., Drieu, K., 2003. *Ginkgo biloba* extract and cancer: a research area in its infancy. **Fundamental Clinical Pharmacology**, **17** (4): 405-417.
9. Takeoka, G.R., Dao, L.T., 2003. Antioxidant constituent of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] hulls. **Journal Agriculture Food Chemistry**, **51**: 496-501.

10. Zümrütdal, M. E., Özaslan, M., Tuzcu, M., Kalender, M. E., Dağlıoğlu, K., Akova, A., Karagöz, I. D., Kılıç, İ. H., Çolak, O., Köksal, F., 2008. Effect of *Lawsoni inermis* treatment on mice with sarcoma. **African Journal of Biotechnology**, 7(16): 2781-2786.
11. Kumar, S., Pandey A.K., 2014. Medicinal attributes of *Solanum xanthocarpum* fruit consumed by several tribal communities as food: an in vitro antioxidant, anticancer and anti HIV perspective. **BMC Complement Alternative Medicine**, 14, 112.
12. Kirtikar, K.R., Basu, B.D., 1975. Indian medicinal plants. Dehradun, India: **Bishen Singh Mahendra Pal Singh**, 2 (2): 842-844.
13. Özaslan, M., Zümrütdal, M. E., Dağlıoğlu, K., Kılıç, İ. H., Karagöz, I. D., Kalender, M. E., Tuzcu, M., Çolak, Ö., Cengiz, B., 2009. Antitumoral effect of *L. inermis* in mice with EAC. **International Journal of Pharmacology**, 5(4): 263-267.
14. Wang, Y., Zhao, X., Gao, X., Nie, X., Yang, Y., Fan, X., 2011. Development of fluorescence imaging-based assay for screening cardioprotective compounds from medicinal plants. **Analytica Chimica Acta**, 702: 87-94.
15. Hsueh, C. C., Chen, B. Y., Lo, D.H., Wu, C. C., Tzeng, Y. J., 2010. Preliminary screenin via dose–response analysis of the antibacterial activities of six chinese medicinal plant extracts. **Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 41: 579-584.
16. Yan, R., Yang, Y., Zeng, Y., Zou, G., 2009. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 121: 451–455.
17. Özaslan, M., Karagöz, I.D., Kalender, M.E., Kılıç, İ.H., Sarı, İ., Karagöz, A., 2007. In vivo antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on balb/c mouse with ehrlich ascites tumor. **The American Journal of Chinese Medicine**, 35 (5): 841-851.

18. Güner, A., 2012. Türkiye Bitkileri Listesi "Damarlı Bitkiler. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul, 610.
19. Cesoniene, L., Daubaras, R., Viskelis, P., Sarkinas, A., 2012. Determination of the total phenolic and anthocyanin contents and antimicrobial activity of *Viburnum opulus* fruit juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, **67**: 256–261.
20. Altun, M.L., 2008. Antioxidant properties of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* growing in Turkey. **International Journal of Food Science Nutrition**, **59**(3): 175-180.
21. Rop, O., 2010. Antioxidant properties of european cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). **Molecules**, **15**: 4467-4477.
22. Velioğlu, S., Ekici, L., Poyrazoğlu, S., 2006. Phenolic composition of European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) berries and astringency removal of its commercial juice. **International Journal of Food Science and Technology**, **41**: 1011–1015.
23. Kraujalyte, V., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., Cesoniene, L., Daubaras, R., 2013. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. **Food Chemistry**, **141**(4): 3695-702.
24. Ülger, H., Ertekin, T., Karaca, Ö., Canoz, O., Nisari, M., Unur, E., Elmalı, F., 2012. Influence of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on 1,2 dimethylhydrazine (dmh)-induced colon cancer. **Toxicology and Industrial Health**, **29**(9):824-829.
25. Heijstek, M.W., Kranenburg, O., Rinkes., 2005. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. **Digestive Surgery**, **22**: 16-25.
26. Choudhury, S.M., Gupta, M., Majumder, U.K., 2010. Antineoplastic activities of MT8I and its structural analogue in ehrlich ascites carcinoma bearing swiss albino mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** **3**(1): 61-70.
27. American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014.

28. Yokuş, B., Çakır, D.Ü., 2012. Kanser biyokimyası. **Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 1(2): 7-18.
29. Gültekin, M., Boztaş, G., 2014. Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı.
30. Buchholz, T.A., Weil, M. M., Story, M. D., Strom, E. A., Brock, W. A., McNeese, M. D., 1999. Tumor suppressor genes and breast cancer. **Radiation Oncology Investigation** 7: 55-65.
31. Tayyeb, B., Parvin, M., 2014. Pathogenesis of breast cancer metastasis to brain: a comprehensive approach to the signaling network. **Molecular Neurobiology**, 50: 1559-1182.
32. Gültekin, M., Boztaş, G., 2014. Meme Kanseri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı.
33. Giordano, S.H., Cohen, D.S., Buzdar, A.U., Perkins, G., Hortobagyi, G.N., 2004. Breast carcinoma in men: a population-based study. **Cancer**, 101: 51-57.
34. Feng, S.S., Chien, S., 2003. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science** 58: 4087–4114.
35. Aydıner, A., Topuz, E., Akyan, A., 2006. Meme Kanserinde Tanı Tedavi Takip. s 33, İstanbul Konsensusu, SBN 975-450-527-2.
36. Occupational Health and Safety Administration 2001. OSHA Directorate of technical support controlling occupational exposure to hazardous drugs. **OSHA published**, 1(15):7-42.
37. Lisa, B.P., Blanchette., J.O., 2012. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews** 64: 206–212.
38. Simone, C. B., Simone, N.L., Simone, V., Simone, C.B., 2007. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. **Alternative Therapies In Health And Medicine**, 13(2): 40-47.

39. Brea-Calvo, G., Rodriguez, H. A., Fernandez, A. D. J. M., Nvas, P., Sanchez, A.J.A., 2006. Chemotherapy induces an increase in coenzyme 10 levels in cancer cell lines. **Free Radical Biology and Medicine**, **8**(1):15-19.
40. Shengquan, L., Sze Ngong, H.L., 2013. Design of low-molecular-weight prodrugs for targeted delivery of anticancer agents **Pharmaceutica Analytica Acta**, **4**: 1-2.
41. Kratz, F., Muller, I.A., Ryppa, C., Warnecke, A., 2008. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. **ChemMedChem**, **3**: 20–53.
42. Yang, C.S., Prabhu, S., Landau, J., 2001. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols, **Drug Metabolism Reviews**, **33** :237–253.
43. Sporn, M.B., Liby, K.T., 2005. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nature Clinical Practice Oncology**, **2**: 518–525.
44. Anand, C., Neetu, S., 2011. Contribution of world health organization in the global acceptance of Ayurveda. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, **2**: 179–186.
45. Larkin, T., 1983. Herbs are often more toxic than magical. **Food and Drug Administration Consumer**, **17**: 4–11.
46. Khazir, J., Mir, B.A., Pilcher, L., and Riley, D.L., 2014. Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**, **7**: 173–181.
47. Teiten, H., Gaascht, F., Dicato, M., Diederich, M., 2013. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. **Biochemical Pharmacology**, **86**: 1239–1247.
48. Riddle, J.M., 2002. History as a tool in identifying new old drugs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **505**: 89–94.
49. Hotwani, K., Baliga, S., Sharma, K., 2014. Phytodentistry: use of medicinal plants. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, **11**(4):233-251.

50. Yue, Z., and Shu, U., 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Product**, **61**: 1053-1071.
51. Jain, A., Katewa, S.S., Galav, P.K., and Nag, A., 2007. Unrecorded ethnomedical uses of biodiversity from Tadgarh-Raoli wildlife sanctuary, Rajasthan, India. **Acta Botanica Yunnanica**, **29** (3): 337-344.
52. Shoeb, M., 2006. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, **1**: 35–41.
53. Newman, D. J., and Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, **70**(3): 461–477.
54. Bailly, C., 2009. Ready for a comeback of natural products in Oncology. **Biochemical Pharmacology**, **77** (9): 1447–1457
55. Cragg, G.M., and Newman, D. J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, **1830**(6): 3670–3695.
56. Brian, W.R., 2002. Isolation And Structure Elucidation Of Cytotoxic Natural Products From Suriname And Madagascar. Virginia Polytechnic Institute and State University, Master thesis, Blacksburg/USA Erisim: [http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd_111820213441/unrestricted/Chapter1.pdf]
57. Balunas, M.J., and Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, **78**: 431-441.
58. Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, **17** (3), 215 – 234.
59. Aksoy, A., Güvensen, A., 2005. Ethnoecology of *Viburnum opulus* L. pp 65-70. *International Symposium of Medicinal Plants: Linkages Beyond National Boundaries*, Islamabad, September 7-9, 2005, Pakistan.

60. Cesoniene., L., Daubaras., R., 2010. Biochemical and agro biological diversity of *Viburnum opulus* genotypes. **Central European Journal of Biology**, 5(6): 864-871.
61. Velioğlu, S., Ekici, L., Poyrazoğlu, S., 2006. Phenolic composition of European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) berries and astringency removal of its commercial juice. **International Journal of Food Science and Technology**, 41: 1011–1015.
62. Soylak, M., Elci, L., Saracoglu, S., Divrikli, U., Chemical analysis of fruit juice of european cranberrybush (*Viburnum opulus*) from Kayseri- Turkey. **Asian Journal of Chemistry**, 14(1): 135-138. 2002.
63. Tunde-Akintunde, T. Y., and Akintunde, B. O., 2004. Some physical properties of sesame seed. **Biosystems Engineering**, 88(1): 127-129.
64. Erdoğan, A., 2011. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* and their total phenol and flavonoid contents. **Journal of Medicinal Food**, 14(4): 434-440.
65. Sağdıç, O., Aksoy, A., and Özkan, G., 2006. Evaluation of the antibacterial and antioxidant potentials of cranberry (Gilaburu *Viburnum opulus*) fruit extract. **Acta Alimentaria**, 35: 487-492.
66. Elmastaş, M., Gerçekcioğlu, R., 2006. Bazı Üzümsü Meyve Türlerinin Antioksidan Aktiviteleri. Sayfa: 295-298. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 14-16 Eylül 2006, Tokat.
67. Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., 2010. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, 21: 381-406.
68. Özrenk, K., Gündoğdu, M., Keskin, N., Kaya, T., 2011. Some physical and chemical characteristics of gilaburu (*Viburnum opulus* L.,) fruits in Erzincan region. **Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 1(4): 9-14.

69. Zayachkivska, O.S., Gzhegotsky, M.R., Terletska, O.I., Lusykh, D.A., Yaschenko, A.M., Dzhura, O.R., 2006. Influence of *Viburnum opulus* proanthocyanidins on stress-induced gastrointestinal mucosal damage. **Journal of Physiology and Pharmacology**, **5**:155-167.
70. Tsolaki, E., Nobelos, P., Geronikaki, A., Rekka, E.A., 2014. Selected heterocyclic compounds as antioxidants. Synthesis and biological evaluation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, **14**(22): 2462-2477.
71. Mates, J.M., Perez-Gomez, C., De Castro, I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases, **Clinical Biochemistry**, **32**: 595–603.
72. McCall, M.R., Frei, B., 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology & Medicine**, **26**: 1034–1053.
73. McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). **The Journal of Biological Chemistry**, **244**: 60409–60455.
74. Landis, G.N., Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of Ageing and Development**, **126**: 365–379.
75. Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R.M., 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation, **Biochemical Society Transactions**, **31**: 1441–1444.
76. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, **160**: 1–40.
77. Deponter, M., Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1830** (5): 3217–66.
78. Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarapotto E., 2004. Oxidative stress and cell signalling, **Current Medicinal Chemistry**, **11**: 1163–1182.

79. Defraigne, J.O., Pincemail, J., Franssen, C., Meurisse, M., Defechereux, T., Philippart, C., Serteyn, D., Lamy, D., Deby, C., and Limet R., 1993. In vivo free radical production after cross-clamping and reperfusion of the renal artery in the rabbit. **Cardiovascular Surgery**, **1**: 343-349.
80. Mccord, J.M., 1985. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. **New England Journal Medicine**, **17**: 159-163.
81. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M., 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding, **Journal of Molecular Biology**, **304**: 55-68.
82. Loschen, G., Flohe, B., 1971. Chance respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. **FEBS Letter**, **18**: 261-263.
83. Fridovich, L., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, **64**: 97-112.
84. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, **357**: 593-615.
85. Ghafourifar, P., Cadenas, E., 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends Pharmacology Science**. **26**: 190-195.
86. Bruce, A.F., and Crapo, J.D., 1982. Biology of disease. free radicals and tissue injury. **Lab Investigation**, **47**(5): 412-426.
87. Klaunig, J.E., Xu, Y., Bachowski, S., Jiang, J., 1997. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis, pp 375-400. In: Free Radical Toxicology (Wallace, K.B.,) Taylor & Francis, London.
88. Kurutaş, E.B., Güler, F., Kılınç, M., 2004. Serbest radikaller **Arsiv**, **13**: 120-132.
89. Beckman, K.B., Ames, B.N., 1997. Oxidative decay of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, **272**: 19633-19636.
90. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB Journal**, **17**: 1195-1214.

91. Cutler, R.G., Plummer, J., Chowdhury, K., Heward, C., 2005. Oxidative stress profiling: Part II. theory, technology, and practice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1055**: 136-58.
92. Halliwell, B., 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, **401 (1)**: 1–11.
93. Mantha, S.V., Prasad, M., Kalra, J., Prasad, K., 1993. Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. **Atherosclerosis**, **101**: 135-44.
94. Zeybek, Ü., 2002. Kanser araştırmaları ve deneysel modeller. **Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi**, **2(5)**:1-12.
95. Eijan, A.M., Lodillinsky, C., Sandes, E.O., 2012. Animal models for basic and preclinical research in bladder cancer, pp. 383-404. *In: Bladder Cancer- From Basic Science to Robotic Surgery*. (Eds. A.E., Canda,). Intech Publisher, Croatia.
96. Fausto, N., Camobekk, J.S., Riehle, K.J., 2006. Liver Regeneration. **Hepatology**, **43**: 45–53.
97. Donald, C. M., Katie, M., Anderson, N. K., Gilman, V. M., Green, E. A., Barker, H., Karl, E. H., 2004. Development of a cancer DNA phenotype prior to tumor formation. **PNAS** **101 (29)**: 10721–10725.
98. Teicher, B., 2011. Murine L1210 and P388 Leukemias. pp. 23-40. *In: Tumor Models in Cancer Research (Cancer Drug Discovery and Development)* (Eds. J., Donald, B.S. Dykes, R. William). Humana Publisher, Boston.
99. Louis, W.C., Mary, N.B., Wings, T.Y., Guan, X.Y., 2003. A rat cell line derived from DMBA-induced mammary carcinoma. **Life Sciences**, **73**: 27 – 40.
100. Melnick, R.L., Boorman, G.A., Dellarco, V., 1997. Water Chlorination, 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), and Potential Cancer Risk. **Journal of the National Cancer Institute**, **89(12)**: 832-833.

101. Yuan, J., Liu, H., Zhou, L., Zou, Y., Lu, W., 2006. Oxidative stress and DNA damage induced by a drinking-water chlorination disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in mice. **Mutation Research** **609** (2): 129–136.
102. Richmond, A., Su, Y., 2008. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. **Disease Model Mechanisms**, **1**(2-3):78-82.
103. Hutchinson, J.N., Muller, W.J., 2000. Transgenic mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, **19**(53):6130-7.
104. Fantozzi, A., Christofori, G., 2006. Mouse models of breast cancer metastasis. **Breast Cancer Research**, **8**:212-223.
105. Özaslan, M., Karagöz, I.D., Kılıç, İ.H., Güldür, M.E., 2011. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, **10**(13): 2375-2378.
106. Ehrlich, P., Apolant, H., 1905. Beobachtungen Über Maligne Mäusentumoren. **Wiener klinische Wochenschrift**, **28**:871-874.
107. Loewenthal, H., Jahn, G., 1932. Übertragung-Suersuche mit carcinomatöser mause-asciteslussigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. **Z. Krebsforsch Journal**, **37**:439-447.
108. Lettre, R., Paweletz., N, Werner, D., Granzow, C., 1972. Sublines of the Ehrlich-Lettere Mouse Ascites Tumor, **A New Tool for Experimental Cell Research**, **59**: 59-63.
109. Kaleoğlu, Ö., Dişli, N., 1977. Ehrlich-Lettere Assit Tümörü, **D.Ü. Tıp Fakültesi Mecmuası**, **401**, 978-984.
110. Klein, G., 1951. Comparative studies of mouse tumors with respect to their capacity for growth as “ascites tumors” and their average nucleic acid content per cell. **Experimental Cell Research**, **2**: 518-573.
111. Lazebnik, Y.A., Medvedeva, D.N., Zenin, V.V., 1991. Reversible G2 block in the cell cycle of ehrlich ascites carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, **195**: 247-254.

112. Song, Z., Varani, J., Goldstein, I.J., 1993. Differences in cell surface carbohydrates and in laminin and fibronectin synthesis between adherent and non-adherent ehrlich ascites tumor cells. **International Journal of Cancer**, **55**: 1029-1035.
113. Altun, S., 1996. Normal, tümöral ve rejeneratif büyümeler arasındaki kinetik ilişkiler. **Traditional Journal Biology, Tübitak**, **20**(3): 153-173.
114. Szikla, K., Pokorny, E., Hullan, L., Holczinger, L., 1981. Variations of thymidine kinase activity and DNA content in ehrlich and l1210 ascites tumor cells during tumor growth. **Cancer biochemistry biophysics**, **5**: 259-264.
115. Segur, J.A., Ruiz-Bellido M.A., Arenas, M., Lobo, C., Marquez, J., Alonso, F.J., 2001. Ehrlich ascites tumor cells expressing anti-sense glutaminase rna lose their capacity to evade the mouse immune system. **International Journal of Cancer**, **91**: 379-384.
116. Siems, W.G., Grune, T., Schmidt, H., Tikhonov, Y.V., Pimenov, M.A., 1993. Purine nucleotide levels in host tissues of ehrlich ascites tumor bearing mice in different growth phases of the tumor. **Cancer Research**, **53**: 5143-5147.
117. Skog, S., He, Q., Tribukait, B., 1990. Lack of correlation between thymidine kinase activity and changes of dna synthesis with tumour age: an in vivo study in ehrlich ascites tumour. **Cell Tissue Kinetics**, **23**: 603-617.
118. Lobo, C., Ruiz-Bellido, M.A., Aledo, J.C., Marquez, J., De Castro, I.N., Alonso, F.J., 2000. Inhibition of glutaminase expression by antisense mrna decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. **Biochemical Journal**, **348**: 257-261.
119. Tannock, I.F., 1969. A Comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites ehrlich tumors. **Cancer Research**, **29**: 1527-1534.
120. Ramos, F. M. M., Schönlaui, F., Novaes, P.D., Manzi, F.R., Boscolo, F.N., Almeida, S. M., 2006. Pycnogenol protects against ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to x-rays. **Phytotherapy Research**, **20**: 676–679.

121. Son, Y.O., Kim, J., Kim, J.C., Chung, Y., Chung, G.H. and Lee, J.C., 2003. Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, **41**: 1421-1428.
122. Strober, W., 1991. Trypan blue exclusion test of cell viability, pp 1-2. *In*: Current Protocols in Immunology. (Eds. J.E., Coligan, A.M., Kruisbeek, D.H., Margulies,) Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
123. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Analytical Chemistry**, **72** (1-2): 248-254.
124. Ohkawa, H., Ohoshi, N., Tagi, K., 1975. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, **95**: 351–358.
125. Burgmeyer, H.U., 1983. Catalase, pp. 273. *In*: Methods of enzymatic analysis, (Eds, H. Aebi,) Academic Press Publisher, New York.
126. Sun, Y., 1990. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, **8**: 583-599.
127. Luna, L., 1968. A Manual of Histological Staining Techniques of the Armed Forces Institute of Pathology. The Blakiston Division, McGraw-Hill Book Company, New York, 232-258.
128. Ministerio da Saude Instituto Nacional do Câncer Jose Alencar Gomes da Silva(INCA), Estimativa 2014, Incidencia de Cancer no Brasil, INCA, Rio de Janeiro, 2014 <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf> (accessed March 2014).
129. Fishman, M.C., 2000. Cell proliferation, differentiation and apoptoss, pp 17-32. *In*: Cnacer Medicene(Eds. Bast, R.C., Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Holland, J.F.,) B.C. Decker Publisher, Hamilton.
130. Andreeva, T.I., 2004. Antioxidant activity of cranberry tea (*Viburnum opulus* L.) bark extract. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, **38**: 548-550.

131. Turek, S., Ciszowski, W., 2007. Free and chemically bonded phenolic acids in barks of *Viburnum opulus* L. and *Sambucus nigra* L. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, **64**(4):377-383.
132. Sönmez, N., Alizadeh, H.H., Öztürk, R., Acar, A.İ., 2007. Some physical properties of gilaburu seed. **Tarım Bilimleri Dergisi**, **13**(3): 308-311.
133. Çam, M., Hişil, Y., 2007. Comparison of chemical characteristics of fresh and pasteurised juice of gilaburu (*Viburnum opulus* L.). **Acta Alimentaria**, **36**, 381–385.
134. Deineka, V. I., Sorokopudov, V. N., Deineka, L. A., Shaposhnik, E. I., Koltsov, S. V., 005). Anthocyanins from fruit of some plants of the Caprifoliaceae family. **Chemistry of Natural Compounds**, **41**, 162–164.
135. Gavrilin, M. V., Markova, M., Likhota, T., & Izmailova, A., 2007. Optimization of the procedure of vitamin determination in *Viburnum* oil. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, **41**, 101–104.
136. Yılmaz, N., Yayli, N., Misir, G., Çoskunçelebi, K., Karaoglu, S., Yayli, N., 2008. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Viburnum opulus*, *V. lantana* and *V. orientale* from Turkey. **Asian Journal of Chemistry**, **20**, 3324–3330.
137. Kalyoncu, İ.H., Özer, E., 2007. Gilaburu'nun (*Viburnum opulus* L.) yeşil uç çeliklerinde çelik köklenmesi üzerine bazı hormonların etkileri, **Ziraat Fakültesi Dergisi** **21** (43): 46-52.
138. Duygu, M.D., Aslan, D., İçyer, N.C., Çam, M., 2012. Gilaburu suyunun mikrokapsülasyonu. **Electronic Journal of Food Technologies**, **7**(2):1-11.
139. El-Gamal, A., 2008. Cytotoxic lupane-, secolupane-, and oleanane-type triterpenes from *Viburnum awabuki*. **Natural Product Research**, **22**(3), 191-197.
140. Li, H., L, Y., Ma, Y., Zeng, J., Zhang, X., Wang, D., Hu, C., 2013. Cytotoxic lignans from *Viburnum foetidum*. **Archives of Pharmacal Research**, **36**: 1211-1214.

141. Facchini, J.M., Alves, E.P., Aguilera, C., Gern, R.M.M., Silveira, M.L.L., Elisabeth, W., Furlan, S. A., 2014. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, **68**: 72-77.
142. Gevorkyan, L., Gambahidze, K., 2014. Anticancer efficacy of hydroxyethylthiamine diphosphate *in vivo*. **Experimental Oncology**, **36**(1):48-49.
143. Hanafy, Z.E., 2009. Ginger extract antimutagens as cancer chemopreventive agent against ehrlich ascites carcinoma. **Academic Journal of Cancer Research**, **2**(2):61-67.
144. Dolai, N., Karmakar, I., Kumar, R.B., Kar, B., Bala, A., 2012. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, **142**: 865-870.
145. Alam, B., Majumder, R., Akter, S., Lee, S.H., 2015. *Piper betle* extracts exhibit antitumor activity by augmenting antioxidant potential. **Oncology Letters** **9**: 863-868.
146. Samudrala, P. K., Augustine, B. B., Kasala, E.R., Bodduluru, L. N., Barua, C., and Lahkar, M., 2015. Evaluation of antitumor activity and antioxidant status of *Alternanthera brasiliana* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Pharmacognosy Research**, **7**(1): 66–73.
147. Halliwell, B., Gutterage, J.M.C., 1989. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, **186**: 1–85.
148. Guyton, K.Z., Kensler, T.W., 1993. Oxidative mechanism in carcinogenesis. **British Medical Bulletin**, **49**: 523–544.
149. Yilmaz, H.R., Uz, E., Yucel, N., Altuntaş, I., Özçelik, N., 2004. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, **18**(4):234-238.

150. Macdonald, J., Galley, H.F., Webster, N.R., 2003. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, **90** (2): 221-232.
151. Yagi, K., 1987. Lipid peroxides and human diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, **45**: 337-351.
152. Halder, P.K., Bhattacharya, S., Kar, B., Bala, A., Mazumder, U.K., 2010. Chemopre-ventive role of *Indigofera aspalathoides* in 20-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mouse. **Toxicological and Environmental Chemistry**, **92**: 1749–1763.
153. Navarro, J., Obrador, E., Pellicer, J.A., Asensi, M., Vina, J., Esrela, J.M., 1997. Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. **Free Radical Biology & Medicine**, **22**: 1203–1209.
154. Kavitha, K., Manoharan, S., 2006. Anticarcinogenic and antilipidperoxidative effects of *Tephrosia purpurea* (Linn) P. In 7, 12-dimethyl benz (a) anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinoma. **Indian Journal of Pharmacology**, **38**: 185–189.
155. Senthilkumar, N., Badami, S., Dongre, S.H., Bhojraj, S., 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of the methanol extract of *Careya arborea* bark in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Journal of Natural Medicines**, **62**: 336-339.
156. Mookerjee, A., Mookerjee, J., Majumder, S., Chatterjee, S., Panda, G.S., 2006. A novel copper complex induces ROS generation in doxorubicin resistant Ehrlich ascitis carcinoma cells and increases activity of antioxidant enzymes in vital organs in vivo. **BMC Cancer**, **6**(267):1-11.
157. Kumar, R.B.S., Kar, B., Dolai, N., Karmakar, I., Halder, S., Bhattacharya, S., Pallab, K.H., 2013. Antitumor activity and antioxidant role of *Streblus asper* bark against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, **10**: 197-202.

158. Karmakar, I., Dolai, N., Suresh, K. R.B., Kar, B., Roy, S.N., Haldar, P.K.,2013. Antitumor activity and antioxidant property of *Curcuma caesia* against Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. **Pharmaceutical Biology**, 51(6):753-759.
159. Gupta, M., Mazumder, U.K., Kumar, R.S., Sivakumar, T., 2004. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, 25(8):1070-1076.
160. Gupta, M., Mazumder, U.K., Kumar, R.S., Sivakumar, T., Vansi, M.L.,2004. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 94(2):177-184.
161. Sreelatha, S., Padma, P.R., Umasankari, E., 2011. Evaluation of anticancer activity of ethanol extract of *Sesbania grandiflora* (Agati Sesban) against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 134: 984-987.
162. Naitik, B., 2013. Antitumor and antioxidant status of *Terminalia catappa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, 45(5):464-469.
163. Oberley, T.D., 2002. Oxidative damage and cancer. **American Journal of Pathology**, 160(2): 403–408.
164. Oberley, T.D., Oberley, L.W., 1997. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histology and Histopathology**, 12: 525–535.
165. Chatterjee, A., Dasgupta, S., Sidransky, D., 2011. Mitochondrial Subversion in Cancer. **Cancer Prevention Research**, 4(5):638-654.
166. Saeidnia, S., Adollahi, M., 2013. Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 271: 49–63.

EKLER**EK: ETİK KURUL ONAYI**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 15.08.2012

Toplantı Sayısı: 08

Karar No: 12/89

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

15.08.2012

tarihinde

Prof.Dr.Abdullah İNCİ

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	İnci
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	Özlem
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	Hatice
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	Coşkun
Fusun F. Erdoğan	Doç. Dr	Tıp Fakültesi	Fusun
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	DEKAM	Serpil
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	Betül
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	Katılmadı
Ahmet Öztürk	Yrd. Doç. Dr	Tıp Fakültesi	Ahmet
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Fen Fakültesinden **Prof.Dr.Ahmet AKSOY** tarafından sunulan "**Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Kansere Üzerine Gılaburu (Viburnum opulus) Meyve Suyunun Etkileri**" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

Tarih : 15.08.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr.Abdullah İNCİ

İmzası :

(İmza)

ASLININ AYNIĞIDIR

Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Dilek CEYLAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25 Nisan 1985, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 05070035838

email: dlkceylan@gmail.com

Yazışma Adresi: Yıldırım Beyazıt Mh. Feda Sok. Şahintepesi Apt.
Melikgazi/KAYSERİ 38030

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Fen Bilimler Enstitüsü Biyoloji Bölümü/KAYSERİ	2010
Lisans	CÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/KAYSERİ	2007
Lise	Melikgazi (yabancı dil ağırlıklı) Lisesi, KAYSERİ	2003

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2015	Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. **Ceylan, D.**, Aksoy, A., 2014. Gilaburu meyve suyunun fibroblast ve MCF-7 (meme kanser hücresi) hücre hattı üzerine etkisi: glutatyon s- transferazın rolü; Ulusal Botanik Kongresi, Ekim 25-28, Antalya, Türkiye.
2. **Ceylan, D.**, Ergin, Ö., Saatçi, E., 2011. Determination of sera glutathione s-transferase isozymes from docetaxel/adriamycin treated breast cancer patients, pp 52. International Conference Enzymes Science and Technology, September 31-November 04 2011, Kuşadası, Turkey.
3. Karadaş, E., Dişyapar, T., Toprak, G., **Ceylan, D.**, Özcan, S., 2011. Effects of H₂O₂ stresses on antioxidant enzyme systems of *Phanerochaete chrysosporium*, pp 78. International Conference Enzymes Science and Technology, September 31-November 04 2011, Kuşadası, Turkey.
4. **Ceylan, D.**, Toprak, G., Dabanlı, D., Dişyapar, T., Özcan, S., 2011. The effect of piwil2 transfection on gst pi in human breast cancer cell line Mcf-7, pp International Conference Workshop on Stem Cell Research and Applications, October 06-09, 2011, Kayseri, Turkey.
5. Toprak, G., **Ceylan, D.**, Dabanlı, D., Karadaş, E., Saatçi, E., Özcan, S., 2011. The effect of GFP transfection on gst pi in human prostate cancer cell line LnCAP. International Conference Workshop on Stem Cell Research and Applications, October 06-09, 2011, Kayseri, Turkey.
6. Dabanlı, D., Toprak, G., **Ceylan, D.**, Dinç, G., Özcan, S., 2011. Cytotoxicity of echinops orientalis extract on prostate adenocarcinoma cell line Pc3, International Conference Workshop on Stem Cell Research and Applications, October 06-09, 2011, Kayseri, Turkey.
7. **Ceylan, D.**, Ergin, Ö., Saatçi, E., 2010. Microspectrophotometric detection of serum l-carnitine and glutathione s-transferase activities on breast cancer patients whom got combined drug therapy, pp 110. 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, October 27-30, Eskişehir, Turkey.
8. **Ceylan, D.**, Toprak, G., Şapcı, H., Dabanlı, D., Vural, C., Özcan, S., 2012. *Echinops ritro* türünün antimikrobiyal aktivitesi incelenmesi; 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eylül 3-7, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.