

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıp Anatomi Anabilim Dalı**

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

**Hazırlayan
Özge AL**

**Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER**

Doktora Tezi

**Ocak 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP ANATOMİ ANABİLİM DALI**

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

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Özge AL**

**Danışman
Prof. Dr. Harun ÜLGER**

**Ocak 2019
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: Özge AL

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

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

Hazırlayan

Özge AL

Danışman

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Kenan AYCAN

Prof. Dr. Harun ÜLGER danışmanlığında **Özge AL** tarafından hazırlanan “**Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Kansere Üzerine Gilaburu (*Viburnum opulus*) Meyve Suyunun Farklı Fraksiyonlarının Etkileri**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

... / ... / 2019

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Harun ÜLGER

Üye : Prof. Dr. Nadire ÜNVER DOĞAN

Üye : Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

Üye : Doç. Dr. Zeliha FAZLIOĞULLARI

Üye : Doç. Dr. Arzu Hanım YAY

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / / 2019

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hazırladığım bu doktora tezinin her adımında engin bilimsel tecrübeleri ve bakış açısıyla yolumu aydınlatan danışman hocam sayın Prof. Dr. Harun ÜLGER'e, doktora eğitimim süresince bilgi ve beceri kazanmamda önemli katkıları olan Prof. Dr. Kenan AYCAN, Prof. Dr. Nihat EKİNCİ, Prof. Dr. Erdoğan UNUR ve Prof. Dr. Niyazi ACER hocalarıma saygı ve minnetlerimi sunarım.

Gerek doktora ders dönemi gerekse tez dönemi boyunca bana her hususta yardımcı olan ve destek veren, karşılaştığım zorluklarda bana çözüm yolları oluşturan değerli hocalarım Doç. Dr. Tolga ERTEKİN, Doç Dr. Mehtap NİSARİ ve Doç. Dr. Arzu Hanım YAY'a, GENKÖK'teki (Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi) çalışmalarım sırasında teknik olarak bana her türlü kolaylığı sağlayan, beni kendi laboratuvarlarında misafir ederek değerli rehberliklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL, Doç. Dr. Zuhal HAMURCU ve Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye, deneysel çalışmalar esnasında her aşamada yanımda olan değerli mesai arkadaşım Arş. Gör. Sümeyye UÇAR'a, asistanlığım ve doktora eğitimim süresince bana bir aile içinde olduğumu hissettiren başta hocalarım olmak üzere doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım ve destek personeli dahil tüm Erciyes Anatomi ailesine, tezin deneysel aşamasının gerçekleşmesinde büyük katkıları olan Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi ile Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi yöneticileri ile çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni tüm kalbiyle destekleyerek ideallerimin oluşması ve gerçekleşmesinde en çok emeği olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme, çalışmalarım sırasında hep yanımda olan desteğini ve yardımını esirgemeyen sevgili eşim Serhat AL'a, varlığı ile hayatımı anlamlandıran sevgili kızım Neva AL'a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Öğretim üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kurum koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Özge AL,

Kayseri, Ocak 2019

**FARELERDE DENEYSSEL OLARAK OLUŞTURULAN KANSER ÜZERİNE
GİLABURU (*VIBURNUM OPULUS*) MEYVE SUYUNUN FARKLI
FRAKSİYONLARININ ETKİLERİ**

Özge AL

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ocak 2019
Danışman: Prof. Dr. Harun ÜLGER**

ÖZET

Kanser 21. yüzyılın en önemli sağlık problemlerinden biridir. Son zamanlarda kanser tedavisinde kullanılan temel yöntemlerin yanında tamamlayıcı ve alternatif tedavi uygulamaları artmıştır. Bu uygulamalardan biri de bitkisel tedavidir. Bu çalışma yüksek antioksidan içeriğe sahip olduğu bilinen gilaburu (*Viburnum opulus*) meyve suyunun 50 kDa altı ve üstü fraksiyonlarının farelerde deneysel olarak oluşturulan Ehrlich Ascites Tumor (EAT) üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkisini araştırma amacıyla yapıldı. Çalışmanın *in vivo* basamağında 77 adet Balb-C ırkı erkek fare kullanıldı. Fareler negatif kontrol, pozitif kontrol, 5-FU (kemoterapötik) grubu, 50 kDa altı gilaburu ve 50 kDa üstü gilaburu grubu olmak üzere beş gruba ayrıldı. Dokuzuncu gün hayvanlar kurban edildi. İç organlardan alınan örnekler histopatolojik olarak değerlendirildi. Çalışmanın *in vitro* aşamasında ise EAT hücreleri kontrol, 5-FU, 50 kDa altı ve üstü gilaburu gruplarına ayrıldı, 3, 24 ve 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Muse Cell Analyzer cihazı ile gruplarda Annexin V, mitotik aktivite ve hücre döngüsü analizleri yapıldı. Çalışmanın *in vivo* kısmında pozitif kontrol grubundaki hayvanların doku kesitlerinde EAT hücrelerinin 50 kDa altı gilaburu grubundan daha yoğun olduğu gözlemlendi. 50 kDa üstü gilaburu grubundaki hayvanların kesitlerinde ise EAT hücrelerine rastlanmadı. Deney süresince tedavi gruplarındaki bütün hayvanların ağırlık ve karın çevrelerinde pozitif kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma izlendi. *In vitro* analizlerde üçüncü saatte anlamlı bir sonuç elde edilemezken 24 ve 48. saatin sonunda kontrol grubuna göre gilaburu gruplarında (özellikle 50 kDa altı gilaburu grupları) total apoptozun anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Gilaburunun hücre döngüsünü G₀/G₁ evresinde durdurarak EAT hücrelerinin bölünmesini yavaşlattığı (özellikle 50 kDa üstü gilaburu grupları) görüldü. 50 kDa üstü gilaburu gruplarında toplam depolarize hücrelerin yüzdesinin anlamlı bir şekilde yükselerek (p<0,001) apoptozu tetiklediği kanısına varıldı. Sonuç olarak elde edilen bulgular farklı fraksiyonlardaki gilaburu ekstraktlarının EAT hücreleri üzerine antitümöral etkisinin olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmanın kanser tedavisine yönelik çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Viburnum opulus*, EAT, antitümör, apoptoz

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

Özge AL

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Faculty of Medicine, Department of Anatomy
PhD Thesis, January, 2019
Supervisor: Prof. Dr. Harun ULGER**

ABSTRACT

Cancer is one of the most important health problems of the 21st century. In addition to the basic methods used in the treatment of cancer, complementary and alternative treatments have increased. One of these applications is herbal treatment. Gilaburu (*Viburnum opulus*) fruit juice is known to have high antioxidant content. This study was performed to investigate the in vivo and in vitro effects of gilaburu fruit juice fractions on experimentally induced Ehrlich Ascites Tumor (EAT) in mice. For in vivo study, 77 Balb-C mice were used and the mice were divided into five groups as negative control, positive control, 5-FU (chemotherapeutic) group, gilaburu fractions below 50 kDa and over 50 kDa. On the ninth day of the experiment animals were sacrificed. The samples taken from the internal organs were evaluated histopathologically. For in vitro analysis, EAT cells were divided into six groups. These groups are control, 5-FU, 50 kDa and above 50 kDa gilaburu groups. The EAT cells were cultured at 37 ° C and 5% CO₂ at 3, 24 and 48 hours. Annexin V, mitotic activity and cell cycle were analysed in Muse Cell Analyzer. The in vivo analyses of tissue sections showed that the more intensive EAT cells were seen in the positive control and groups below 50 kDa. There were few EAT cells in the sections under 50 kDa. There were a significant decrease of abdominal circumference and body weight of mice in all treatment groups compared to the positive control group. No significant difference was obtained at the third hour in the in vitro analyzes while total apoptosis was significantly increased in the all experiment groups (especially below 50 kDa of gilaburu fraction) compared to the control group at the end of the 24 and 48 hours. It was observed that gilaburu stopped the cell cycle at the G₀/G₁ stage and make slow the division of the EAT cells (especially above 50 kDa of gilaburu fraction). It was concluded that the percentage of total depolarized cells and triggered apoptosis in the gilaburu fractions above 50 kDa increased significantly (p <0.001). In conclusion, the results showed that gilaburu extracts in different fractions may have an antitumoral effect on EAT cells. It is thought that this study will contribute to the treatment of cancer.

Key Words: *Viburnum opulus*, EAT, antitumor, apoptosis

İÇİNDEKİLER

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

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser, Nedenleri ve Tedavi Yöntemleri	3
2.2. Kanser Tedavisinde Bitkisel Ürünlerin Yeri	4
2.2.1. Tıbbi Bir Bitki Olarak Gilaburu (<i>Viburnum opulus</i> L.).....	6
2.3. Kanser Çalışmalarında Deneysel Modeller	10
2.3.1. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenlerle Oluşturulan Modeller.....	11
2.3.2. Tümör Ksenograft Modeli, Transgenik, Knockout veya Kimerik Modeller .	11
2.3.3. Spontan veya Transplante edilebilen tümör modelleri	11
2.4. Kanser Çalışmalarında Kullanılan Bir Model: Ehrlich Assit Tümör	12
2.4.1. Solid (katı) Tümör	13
2.4.2. Assit (Sıvı) Tümör	14
2.5. Ehrlich Assit Tümör Modeli ile Yapılan Çalışmalarda Değerlendirme.....	15
2.5.1. <i>In Vivo</i> Çalışmaların Değerlendirilmesi	15
2.5.2. <i>In Vitro</i> Çalışmaların Değerlendirilmesi.....	15
2.5.3. EAT Modelinde 5-Fluoro Uracil	15
2.6. Hücre döngüsü.....	16
2.7. Apoptoz	18

2.7.1. Apoptoz mekanizması	21
2.7.1.1. İntersik (mitokondriyal) Yolak	21
2.7.1.2. Ekstrinsik yolak (ölüm reseptör yolağı)	21
2.7.1.3. Granzim/Perforin Yolağı.....	21
2.7.2. Apoptozu Belirlemede Kullanılan Yöntemler	21
2.7.2.1. Annexin V	23
2.7.2.2. Mitotik Aktivite.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gilaburu Ekstraktlarının Elde Edilmesi	25
3.2. Gilaburu Toz Ekstraktlarının Çözünmesi ve Sterilizasyonu	26
3.3. Hayvanlara Verilecek Gilaburu Dozunun Belirlenmesi.....	26
3.4. Stok Fare Oluşturulması	27
3.5. Hücre Canlılığının Tespiti	29
3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Gilaburu Toz Ekstraktlarının Enjekte Edilmesi	30
3.7. Histolojik Doku Takibi.....	32
3.8. <i>In vitro</i> çalışma	36
3.8.1. Annexin V ve Ölü Hücre Testi	38
3.8.2. Hücre Döngüsü Testi	40
3.8.3. Mitokondri Potansiyeli Testi	42
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	44
4. BULGULAR	45
4.1. <i>In Vivo</i> Bulgular	45
4.1.1. Morfolojik Bulgular	45
4.1.2. Hayvanların karın boşluğundaki sıvı miktarı ve hücre sayısı.....	49
4.1.3. Dokuların histopatolojik incelenmesi	49
4.1.3.1. Karaciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme.....	51
4.1.3.2. Dalak dokusunda histopatolojik değerlendirme.....	53
4.1.3.3. Böbrek dokusunda histopatolojik değerlendirme.....	53
4.1.3.4. Testis dokusunda histopatolojik değerlendirme.....	53
4.1.3.5. Mide Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme	57
4.1.3.6. İnce ve Kalın Bağırsak Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme	57
4.1.4. Hayvanların yaşam süresinin değerlendirilmesi	61

4.2. <i>In vitro</i> Değerlendirmeler	62
4.2.1. Annexin V	62
4.2.1.1. Erken Apoptoz	65
4.2.1.2. Geç Apoptoz	65
4.2.1.3. Total Apoptoz	66
4.2.2. Hücre döngüsü	67
4.2.2.1. G ₀ /G ₁ Evresi Sonuçları	67
4.2.2.2. S Evresi Sonuçları	68
4.2.2.3. G ₂ /M Evresi Sonuçları	68
4.2.3. Mitotik Aktivite	69
4.2.3.1. Canlı ve Ölü Hücre Sayısı	72
4.2.3.2. Depolarize Canlı Hücre Miktarı	73
4.2.3.3. Depolarize Ölü Hücre Miktarı	73
4.2.3.4. Toplam Depolarize Hücre Miktarı	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
6. KAYNAKLAR	83
ETİK KURUL KARARI	
TEZ İNTİHAL RAPORU	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER

Sembol	Anlamı
5-FU	5-Fluoro Uracil
7-AAD	7-Aminoactinomycin
AOM	Azoxymethane
Apop	Apopitoz
ATP	Adenozintrifosfat
CO ₂	Karbon dioksit
DEN	N-Nitrosodiethylamine
DMBA	7,12-Dimetil Banzantrazen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMH	1,2- dimethyl hydrazine
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EAT	Ehrlich Assit Tümör
ENU	Ethyl nitrosourea
FBS	Fetal Bovine Serum
G ₁	Gap 1
H&E	Hematoksilen-Eozin
i.p.	İntraperitoneal
kDa	kilodalton
MNNG	N-metil-N-nitro-Nnitrosoguanidin
MTT	(3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür)
NNK	Nicotine-derived nitrosamine ketone
PS	Phosphatidylserine
RNA	Ribo Nükleik asit
s.c.	Subkutan
TS	Thymidylate Synthase
$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal trans-membran potansiyeli

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Gilaburunun taksonomisi	6
Tablo 2.2.	Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar	19
Tablo 3.1.	Parafin Doku Takip Prosedürü.....	34
Tablo 3.2.	Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	35
Tablo 4.1.	Günlere göre gruptaki hayvanların ağırlık ortalamaları	48
Tablo 4.2.	Günlere göre gruptaki hayvanların karın çevresi ortalamaları	48
Tablo 4.3.	Gruplara göre hayvanların yaşam süreleri	61
Tablo 4.4.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin erken apoptoz (%) bulguları.	65
Tablo 4.5.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin geç apoptoz (%) bulguları.....	66
Tablo 4.6.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin total apoptoz (%) bulguları.	66
Tablo 4.7.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak G_0/G_1 evresindeki değişim oranları	68
Tablo 4.8.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak S evresindeki değişim oranları	68
Tablo 4.9.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak G_2/M evresindeki değişim oranları	69
Tablo 4.10.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak canlılık oranlarındaki değişim.....	72
Tablo 4.11.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak ölü hücre oranlarındaki değişim.....	73
Tablo 4.12.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak depolarize canlı hücre oranlarındaki değişim.....	73
Tablo 4.13.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak depolarize ölü hücre oranlarındaki değişim.....	74
Tablo 4.14.	Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak toplam depolarize hücre oranlarındaki değişim	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	A. Gilaburu çiçek formu B. Gilaburu meyvesi	8
Şekil 2.2.	A. Herhangi bir uygulama yapılmamış fare; B. i.p. olarak EAT hücreleri verilmiş fare.	13
Şekil 2.3.	Hücre döngüsü şematik görünümü.....	17
Şekil 2.4.	Apoptoz morfolojisi	20
Şekil 3.1.	A. Gilaburu meyve suyunun enjektör ucu filtreden geçirilmesi B. Santrifüj tipi 50 kDa'lık filtre.....	26
Şekil 3.2.	A. Karın boşluğundan sıvı alınmasına hazır stok fare B: Stok fare ve sağlıklı fare yan yana, soldaki fare sağlıklı, sağdaki stok fare.	28
Şekil 3.3.	EAT hücrelerinin ışık mikroskopunda 40'lık objektifle görünümü. a: Canlı EAT hücresi, b: Ölü EAT hücresi.	29
Şekil 3.4.	Deneysel prosedürde kullanılan hayvanlar. A: Kafes içindeki farelerin genel görünümü B: Hava filtrasyonlu kapalı devre kafes sistemi, C: Farenin karın çevresi ölçümü D: Farenin ağırlık ölçümü.....	30
Şekil 3.5.	Parafin dolu bloklara gömülmüş dokular.	33
Şekil 3.6.	Kendilerine ait şişelere konmuş besiyerleri ve üstü etiketlenmiş kültür kabı.	37
Şekil 3.7.	Güvenlik kabini altında steril kültür kaplarına hücre ve besiyeri eklenmesi.....	38
Şekil 3.8.	Muse Cell Analyzer cihazında sonuçların okunması.	42
Şekil 4.1.	Hayvanların deney sürecindeki morfolojik özellikleri. A- Hayvanın anal bölgesi ve katı dışkılama, B- 4. günde katı dışkılama görülen hayvanın anal bölgesi. C-EAT hücresi verilmiş bir hayvanın genel görünümü. D- Enjeksiyon sonrası tüm hayvanlarda gözlenen hafif tüy değişimi.	46
Şekil 4.2.	Günlere göre hayvanların ağırlık değişimleri.....	47
Şekil 4.3.	Günlere göre hayvanların karın çevresi değişimleri	47
Şekil 4.4.	A. Pozitif kontrol grubuna ait karın içi organları yapışmış hayvan. B. 50 kDa altı gilaburu verilmiş bağırsakları ödemli hayvan.	50

- Şekil 4.5.** EAT hücrelerinin histopatolojik görünümü. Ok işaretleri farklı büyüklüklerdeki EAT hücrelerini göstermektedir (H&E 20X).....51
- Şekil 4.6.** Karaciğer dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organın kapsülü, **h-**hepatosit, **vc-** vena centralis.....52
- Şekil 4.7.** Dalak dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organın kapsülünü göstermektedir.54
- Şekil 4.8.** Böbrek dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organ kapsülü, **d-**distal tübül, **p-**proksimal tübül, **g-** ise glomerulus'u göstermektedir.55
- Şekil 4.9.** Testis dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organ kapsülünü göstermektedir.56
- Şekil 4.10.** Mide dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu.58
- Şekil 4.11.** İnce bağırsağa ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kD altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organ kapsülünü göstermektedir.59
- Şekil 4.12.** Kalın bağırsağa ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kD altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu.60
- Şekil 4.13.** Yaşam süresi takip edilen hayvanların karın boşluğu açıldığında genel görünüm.....61
- Şekil 4.14.** 24 saatlik kültür sonunda gruplara göre apoptoz oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.5-FU** grubu, **C.** 50 kDa altı 200µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400µg/ml gilaburu grubu.63
- Şekil 4.15.** 48 saatlik kültür sonunda gruplara göre apoptoz oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol

- grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400µg/ml gilaburu grubu.64
- Şekil 4.16.** Kültüre edilen EAT hücrelerinin total apoptoz değerlerinin değişimi.....67
- Şekil 4.17.** 24 saatlik kültür sonucunda gruplara göre hücrelerin mitotik aktivite oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400µg/ml gilaburu grubu.....70
- Şekil 4.18.** 48 saatlik kültür sonucunda gruplara göre hücrelerin mitotik aktivite oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400µg/ml gilaburu grubu.....71

1.GİRİŞ VE AMAÇ

21. yüzyılda en önemli halk sağlığı problemlerinden birisi kanserdir. Dünya Sağlık Teşkilatı'na göre dünya genelinde kanser vakalarının her yıl arttığı, 2018 yılında 18,1 milyon kanser vakasının belirlendiği ve bunların 9,6 milyonunun ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Dünyada 5 erkekten biri ve 6 kadından birinde yaşamları boyunca kanser gelişmekte, 8 erkekten biri ve 11 kadından biri ise ölmektedir (1). Türkiye'de ise 2014 ve 2016 yıllarında her beş ölümden birinin kanserden kaynaklandığı bildirilmiştir (2).

Kanser tedavisi için çok sayıda antikanser ajan tanımlanmıştır. Ancak bu ajanların olası toksik etkileri ve organizmada bu ilaçlara karşı gelişen direnç kullanım alanlarını kısıtlamakta (3), yan etkileri klinik başarıyı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle daha iyi farmakolojik-toksikolojik profiller ile karakterize edilen yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (4). Birçok uygarlıkta geleneksel tıp modellerinin oluşumunda anahtar rol oynayan ve tedavi edici etkileri sıklıkla gündeme getirilen bitkiler, kanser tedavisinde uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Hartwell, kanser tedavisinde kullanıldığı bildirilen 3000'den fazla bitki türünü listelemiştir (5).

Bitkiler genellikle geleneksel ilaçlara kıyasla daha iyi bir toksikolojik profil ile karakterize edilmektedir. Bu nedenle, bitkisel tedavinin, başlı başına bir yöntem olarak değerlendirilmesinin yanı sıra geleneksel kanser tedavisinin etkinliğini artırmak ve yan etkilerini sınırlamak amacıyla geleneksel tedaviyle birlikte kullanılabilmesi de görülmüştür (6).

Viburnum opulus L. *Caprifoliaceace* bitki ailesine mensup, kırmızı renkte salkım biçiminde buruk tatlı meyvelere sahip çok yıllık bir bitkidir. Meyve suyu, reçel, marmelat şeklinde tüketilebileceği gibi Türkiye'de ve özellikle Orta Anadolu bölgesinde fermente edilip suyu geleneksel bir içecek olarak tüketilmektedir (7). Dünya

genelinde farklı isimlerle anılan *Viburnum opulus* Kayseri yöresinde “gilaburu” olarak isimlendirilmektedir (8). Gilaburu meyve suyunun fenolik bileşikler, askorbik asit ve çeşitli antioksidanlardan zengin olduğu bildirilmiştir (7).

Erciyes Üniversitesinde daha önce yapılan iki çalışmada gilaburu meyve suyunun kanser üzerine baskılayıcı etkisi rapor edilmiştir (9,10). Ülger ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada Balb-C ırkı farelerde deneysel olarak DMH (1,2- dimethyl hydrazine) ile oluşturdukları kolon kanseri modeli üzerine gilaburu suyunun iyileştirici etkisinin olabileceğini gösterirken, Ceylan ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada Balb-C ırkı farelerde deneysel olarak oluşturdukları EAT (Ehrlich Asit Tumor) modeli üzerine gilaburu meyve suyu ekstraktının tümör gelişimini baskılayıcı etkisini gözlemlemişler ve ayrıca yaptıkları *in vitro* çalışmada gilaburu meyve suyunun kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisini rapor etmişlerdir (10).

Bu çalışma, gilaburunun kansere karşı etkinliği üzerine Erciyes Üniversitesi’nde daha önce yapılan araştırmalara bir devam niteliği taşımak üzere planlanmıştır. Çalışmanın amacı gilaburu meyve suyunun farklı molekül ağırlığındaki liyofilize toz ekstraktlarının farelerde deneysel olarak oluşturulan Ehrlich Ascites Tumor (EAT) modeli üzerinde antitümöral etkisini *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser, Nedenleri ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve çoğalması olarak tanımlanan hastalık grubudur (11). Fizyolojik olarak, insan hücreleri belli bir düzende vücudun ihtiyacı dahilinde bölünmektedir. Hücreler yaşlandığında veya hasar gördüğünde programlı hücre ölümü (apoptoz) olmakta ve yeni hücreler bu hücrelerin yerini almaktadır. Ancak kanser sürecinde, kontrolsüz hücre bölünmeleri meydana gelmesi ile birlikte yaşanan ve bozulan hücrelerde düzenli ölümler görülmemektedir. Birçok kanser türünde bu hücreler, sürekli ve kontrolsüz bölünerek tümör adı verilen kitleleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte, tümörler büyüdükçe ayrılan bazı kanser hücreleri, kan veya lenf sistemi yoluyla vücuttaki farklı doku veya organlara göç edip burada yeni tümörler oluşturabilmekte ve bu duruma metastaz adı verilmektedir (12).

“Kanser” kelimesinin kökeni bilim adamı Hipokrat’a dayanmaktadır (M.Ö. 460-370). Hipokrat, kanserli dokulardan gelişen uzantıları yengeç bacaklarına benzeterek tümörler için “Carcinos ve Carcinomas” terimlerini kullanmıştır. Daha sonra Celcus (M.Ö. 28-50) yengeç kelimesinin Yunancası olan “Cancer” terimini kullanırken bundan yaklaşık 150 yıl sonra ise Galen (M.S. 130-200) tümörler için Yunanca “şişme” anlamına gelen “oncos” kelimesini kullanmıştır. Modern tıpta kullanılan onkoloji terimi buradan gelmektedir (13). Türk tıp tarihinde ise kansere “seretan” adı verilmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi’ye ait “Kenzüsıhhatül Ebdaniye” (1298) adlı eserde seretan, fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağırlı, etrafı damarlı bir oluşum olarak tanımlanmaktadır (14).

Kanserin en bilinen nedenleri arasında radyasyon ve ultraviyole ışını gibi fiziksel; sigara, aflatoksin, arsenik gibi kimyasal ya da bazı bakteri, virüs ve parazit gibi canlı karsinojenlere maruziyet sayılabilmektedir (11). Bilinen kanser tedavi yöntemleri

arasında; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi ve hormon tedavisi yer almaktadır. Cerrahi tedavi, tümör dokusunun vücuttan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. Kemoterapi, sistemik yolla verilecek antineoplastik ilaçların hastanın sağlıklı hücrelerine zarar vermeden tümör dokularının büyüme ve çoğalmasını engellemesini amaçlayan bir tedavi metodudur. Ancak antineoplastik ilaçların çoğu sağlıklı hücreler için de sitotoksik etkiye sahiptir. Işın tedavisi olarak da isimlendirilen radyoterapi yüksek enerjili parçacıkların hücre üzerinde yarattığı etkinin kullanılması yöntemidir. Daha önceden tanımlanmış tümör dokularına belli dozlarda radyasyon verilerek uygulanan bu tedavi biçimi sıklıkla diğer kanser tedavilerinin etkinliğini artırmak için lokal olarak uygulanmaktadır. İmmunoterapi, kansere karşı immün mekanizmaların güçlendirilmesini amaçlamaktadır. Farklı kanser türlerinde test edilen immunoterapi müspet sonuçlar gösterse de klinik sonuçlarda umut edilen başarıyı yakalayamamıştır (15). Meme, prostat, ovaryum ve uterus kanseri gibi hormona duyarlı kanser tipleri için hormon tedavisi, kanser gelişimini yavaşlatmak için vücuttaki hormon üretimini azaltmayı amaçlamaktadır. Bu tedavi metodlarının bir kısmı ciddi yan etkilere sahip iken etkinlikleri hala tartışmalıdır (16).

Gelişmiş ülkelerde kanser tedavisinde uygulanan konvansiyonel metodlarının olası yan etkilerini azaltmak için tamamlayıcı tedavi yöntemleri de yoğun olarak kullanılmaktadır. Söz konusu tamamlayıcı tedaviler arasında bitkisel tedavi de sayılmaktadır (17). Özellikle sentetik ilaçların olası yan etkilerinden dolayı bitkisel kürlere başvuranların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (18).

2.2. Kanser Tedavisinde Bitkisel Ürünlerin Yeri

Dünya Sağlık Teşkilatı, bitkisel ilaçların da dahil olduğu tamamlayıcı tıbbi; modern tıbbın gelişiminden önce kullanılan ve günümüzde hala kullanımda olan tedavi edici uygulamalar olarak tanımlamaktadır. İnsanoğlunun yeryüzünde var olduğu andan itibaren bitkileri beslenme ve tedavi benzeri amaçlarla kullandığı düşünülmektedir (19). Geleneksel tıp, yerel hekimlerin deneyimlerinin sentezi olup bu hekimlerin ilaç niteliğindeki karışımları, bitkileri, mineralleri ve organik maddeleri içermektedir. Hint, Çin, Mısır, Yunan, Roma ve Suriye metinlerinde kullanımlarının en erken kanıtı yaklaşık 5000 yıl öncesine dayanmaktadır (20).

Antik çağdan modern zamanlara; şifacı-rahipler, şifacılar, şamanlar, cadılar ve modern tıp hekimleri, doğa, ilaç ve eczacılık alanlarında uygulamalara yer veren doğal tedavilerden faydalanarak insan hastalıklarını iyileştirme yoluna gitmişlerdir. Otlar, bitkiler, çiçekler, yapraklar, ağaç kabuğu ve kökleri, tohumlar ve yağlar hakkında bilgiler çok eski dönemlere kadar uzanmaktadır. Avrupa Orta Çağı'ndaki bitkisel ilaçlarla ilgili bilgiler Roma ve Yunan kaynaklarına dayanmakta ve bunun da Babil ve Mısır'ın geleneksel tıbbından etkilendiği görülmektedir. Antik Yunan tıbbı, tümör oluşum teorilerini ve potansiyel tedavi yöntemlerini ortaya koymaya çalışmıştır (21). Geçen zamanla birlikte izolasyon, tanımlama ve sentezleme yöntemlerinin geliştirilmesi sayesinde, doğal kaynaklardan birçok ilaç ortaya çıkmıştır. 1990'ların başlarına kadar, doğal kaynaklardan yeni anti-tümör ajanlarının keşfi, büyük ölçüde, *in vitro* veya *in vivo* modellerde kullanılan kanser hücresi soylarına karşı sitotoksik aktivitenin test edilmesine dayanmaktadır (22). Kemoterapi alanında, günümüzde kullanılan antikanser ajanların yaklaşık %75'i bitki ve mikroorganizma gibi doğal ürünlerden türetilmiştir (23). Bitkisel ilaçlar başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık %80'i tarafından temel sağlık hizmetleri için kullanılmaktadır. Bu ilaçlarda bulunan kimyasal bileşenlerin insan vücuduna daha iyi uyum sağladığına inanılmaktadır. Eski literatür, aynı zamanda, modern tıbbın veya sadece palyatif tedavinin işe yaramadığı hafıza kaybı, osteoporoz, diyabetik yaralar, bağışıklık ve karaciğer bozuklukları gibi yaşla ilgili hastalıklar için de bitkisel ilaçların kullanıldığından bahsetmektedir (20).

Ülkemiz coğrafi konumu, iklimi, bitki çeşitliği ve tarımsal potansiyeli sayesinde tıbbi ve aromatik bitkilerce çok zengin bir ülkedir. Türkiye'de 174 familyaya ait 1251 cins ve 12.000'den fazla tür ve alt tür bulunmakta; tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısının ise 500 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemiz endemik bitkiler bakımından da zengindir. Tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken bu rakam Türkiye için 2891'dir. Endemik olan 497 alt tür ve 390 varyete bu hesaba dahil edildiğinde toplam endemik takson sayısı 3750'nin üzerine çıkmaktadır. Bu bitkiler birçok hastalığın tedavisi için yüzyıllardır kullanılmaktadır. (24).

Ülkemizdeki endemik bitkilerden *Dianthus zonatus* ve *Sempervivum armenum* yaprakları siğil tedavisinde kullanılırken; *Merendera caucasica* (25), *Crocus Sativus* L. (safran) (26), *Isatis constricta* (çivit otu) (27), *Hypericum perforatum* L. (kantaron)

(28), *Viburnum opulus* L. (gilaburu) (9,10) gibi bitkilerin kanser araştırmalarında (27) kullanıldığı ve olumlu sonuçlar alındığı rapor edilmiştir.

2.2.1. Tıbbi Bir Bitki Olarak Gilaburu (*Viburnum opulus* L.)

European cranberrybush, Snowball tree, Guelder rose gibi farklı isimlerle bilinen Gilaburu (*Viburnum opulus* L.), Magnoliopsida sınıfı, Caprifoliaceae familyasına ait 2-4 metreye kadar büyüeyebilen, kışın yapraklarını döken, beyaz iekli çok yıllık odunsu bir bitkidir (Tablo 2.1). Doğu Avrupa lkeleri, Kuzey Asya, Kuzey Afrika ve Türkiye’de oldukça yaygın olarak ss bitkisi olarak kullanılmaktadır (29). Genellikle kırmızı renkli meyveleri olan gilaburu, iek açtığı zamanki güzelliği nedeniyle Selçuklu ve Osmanlı dönemlerinde ‘‘Gl Ebru’’ adını almıştır (30). Bu kullanım zaman içinde değişerek ‘‘gilaburu’’ haline gelmiştir. Ancak çeşitli yörelerde gildar, gili gili, giraboğlu, girabolu, gireboğlu, gireboli, gilabada, geleboru, gibi farklı isimler de kullanılmaktadır (31). Ayrıca gilaburu Bulgaristan’da Tchervena kalinka, İtalya’da Pallone di maggio (32), Ukrayna’da Kalyna olarak bilinir (33).

Tablo 2.1. Gilaburunun taksonomisi (34)

Kingdom Plantae – Plants

Subkingdom Tracheobionta – Vascularplants

Superdivision Spermatophyta – Seedplants

Division Magnoliophyta – Floweringplants

Class Magnoliopsida – Dicotyledons

Subclass Asteridae

Order Dipsacales

Family Caprifoliaceae – Honeysucklefamily

Species *Viburnum opulus* L. – Europeancranberrybush

Gilaburu yaprakları 3-5 parçalı ve yeşil renkli olup sonbaharda kırmızıya dönmektedir. Dışta steril, ite ise fertil olan gilaburu çiçekleri yaklaşık 5-10 cm çapındadır. Meyveleri yuvarlak kırmızı renkli, tek tohumlu ve 8 mm kadar boyda, kokusuz ve lezzetsizdir (şekil 2.1) (35). Gilaburu meyveleri tadı buruk olmakla birlikte tketelebilmektedir (7,29,35). Taze gilaburudan sıkılarak elde edilen meyve suyu iilebildiği gibi (35) meyveler reel veya marmelat olarak da değerlendirilmektedir (7, 29). Gilaburu, kar ve

kış koşullarına dayanıklı olsa da genellikle erken sonbahar aylarında olgunlaşmakta ve olgunlaştığı mevsimde meyveler bol miktarda pektin içermektedir (7). Meyvelerin kendisine has kokusunun kaynağı, içerdiği valerik asittir (36). Orta Anadolu'da daha hoş bir tat elde etmek ve buruk tadı maskeleyerek için yaygın olarak meyveler içme suyunda yaklaşık dört ay fermente edildikten sonra tüketilmektedir (37). Yılmaztekin ve ark. (2015) geleneksel fermentasyon esnasında gilaburu meyvesinin bileşimindeki uçucu bileşiklerdeki değişikliği incelemiştir; fermentasyonun birinci ayında toplam uçucu madde miktarının arttığını ancak ilk aydan sonra kademeli olarak azaldığını rapor etmişlerdir (37).

Gilaburu meyveleri sıkılarak elde edilen meyve suyunun bileşiminde tanen, izovalerian asidi (35), L- malik asit gibi organik asitler (36), vipudial, esculetin, skopoletin, kalsiyum, demir, magnezyum, manganez, fosfor, potasyum, selenyum, çinko, tanen, reçine, salisin, acı glikozit, viburnin gibi çok güçlü antispazmodik maddeler (38), askorbik asit (7), yüksek miktarlarda antosiyanin ve gallik asit gibi polifenolik bileşik (29) bulunduğu rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada taze gilaburu meyvesinin kuru bileşiminde % 7,81 suda çözünebilir kuru madde, % 5,83 indirgen şeker, % 6,71 ham protein, % 9,86 ham selüloz, 560 mg/kg Askorbik asit, 402,62 mg/kg sodyum bulunduğu rapor edilmiştir yine bu kuru maddenin % 4,2'sinin lipit, % 0,98'inin protein, % 82,9'sinin çözünür karbonhidrat olduğu, 1 gram kuru maddenin 3,8 kcal enerji içeriği bildirilmiştir (39). Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada Kayseri'nin Bünyan, Develi ve Melikgazi ilçelerinde yetişen gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvelerinin A ve E vitamini, beta-karoten, likopen, redükte ve okside glutatyon miktarlarının sırasıyla 0.10 ± 0.01 - 0.24 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$; 0.96 ± 0.12 - 14.38 ± 1.58 $\mu\text{g/g}$; 3.27 ± 0.23 - 6.52 ± 0.70 $\mu\text{g/g}$; 2.89 ± 0.30 - 10.95 ± 1.10 $\mu\text{g/g}$; 206.78 ± 13.24 - 334.75 ± 16.81 $\mu\text{g/g}$ ve 19.16 ± 1.57 - 23.40 ± 3.38 $\mu\text{g/g}$ arasında değiştiği bulunmuş, beslenme bakımından gilaburunun en yararlı meyvelerinin Melikgazi, Develi ve Bünyan bölgeleri şeklinde sıralandığı rapor edilmiştir (40).



Şekil 2.1.A. Gilaburu çiçek formu B. Gilaburu meyvesi (41).

Gilaburu suyu, diüretik, sürgüt ve sedatif etkilere sahip olduğu gibi (35); antiinflamatuvar, antinosiseptif ve antibakteriyel özellikleri iyi bilinmekte ve geleneksel olarak karın ağrısı, menstrüel sancı ve böbrek ağrılarının tedavisinde kullanılmaktadır (29). Orta Anadolu Bölgesi'nde safra ve karaciğer hastalıkları için, Avrupa ülkelerinde bilhassa çiçekleri veya ağaç gövdesi kabuğu kabızlık önleyici, idrar artırıcı ve yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır (35). Etkili bir antispazmodik olarak kas krampları, spazmları ve adet kramplarını düzenlemek amaçlı kullanılırken (38), kanama azaltıcı ve uterus tonusu artırıcı olarak kullanıldığı da bildirilmiştir (32).

Gilaburu meyvelerinde yüksek miktarlarda bulunan antosiyaninler birçok çiçek, meyve, sebze ve bunlardan türetilen çeşitli ürünlerin renk kalitesinde önemli bir rol oynayan doğal fenolik bileşiklerin oluşturduğu bir pigment grubudur. Son zamanlarda, antosiyaninlerin, antioksidan, antimutagenik, antikanser ve antiobezite özellikleri sunan ve aynı zamanda koroner kalp hastalığı riskini azaltan önemli biyolojik aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir (29). Literatürde *Viburnum opulus* L türünün farklı kısımlarından (yaprak, dal, meyve) elde edilen bileşiklerin antioksidan özelliklerinin olduğu belirtilmiştir (42,43). Bu bitki türünün içerdiği bileşiklere bağlı olarak insan bağışıklık sistemini desteklediği ve birçok hastalığı önlemede etkili olduğu düşünülmektedir (7).

Gilaburunun kurutulmuş meyve ekstraktlarının antimikrobiyel ve antioksidan aktiviteleri Sağdıç ve Aksoy tarafından (2006) çalışılmış ve ayrıca gilaburu bitkisinin antitümör ve antiviral aktiviteye sahip olabileceği vurgulanmıştır (44). Cesoniene ve ark, (2010) *V. opulus*'un biyolojik çeşitliliği ve biyokimyasal özelliklerini inceledikleri bir çalışmada bitkinin total fenolik bileşikleri ve askorbik asit miktarlarını karakterize ederek, biyolojik olarak aktif olan bu bileşiklerin bu türün meyvesinde büyük miktarlarda bulunduğunu tespit etmişlerdir (45). Tıbbi bitkilerde bulunan, günlük alımla vücudumuza giren antioksidanların, kimyasal olarak üretilmiş antikanser ajanlara bir alternatif olabileceği bildirilmektedir (46). Fenolik bileşiklerin, antikanser etki mekanizmalar çok yönlüdür. Bu bileşikler, bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser hücrelerini tanıyıp yok etme ve tümör büyümesi için gerekli olan yeni kan damarlarının gelişmesini (anjyogenez) engelleme yönünde etki göstermektedir. Ayrıca, kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerini azaltmak suretiyle metastatik potansiyellerini azaltmaktadır. Bitkisel fenoller, standart kemo ve radyoterapötik tedavi rejimlerinin

etkinliğini artırmak ve bu ajanlara karşı direnci önlenmek amacıyla da kullanım alanı bulmaktadır. Bu sebeple bu bileşiklerin kanserle mücadelede hem önleyici hem de tedavi edici olduğu görülmektedir (22).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda daha önce gilaburu ile ilgili 3 deneysel çalışma yapılmıştır. Ömerli ve ark., gilaburu meyve suyu ekstraktının sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan böbrek taşı üzerine iyileştirici etkisini bildirmişlerdir (47). Ülger ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada farelerde DMH ile indüklenen kolon kanserinde gilaburu meyve suyunun tedavi edici etkisi ortaya konmuştur (9), Ceylan ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada ise gilaburu meyve suyu ekstraktının farelerde deneysel olarak oluşturulan Ehrlich Asit Tümör üzerine tedavi edici etkisi rapor edilmiştir (10). Ancak gilaburu ekstraktında bulunan antikarsinojenik kimyasal komponentlerin belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser çalışmalarında uygulanacak metottan bağımsız olarak özellikle deneme ve ilaç geliştirme aşamalarında hayvan modellerinin kullanımı oldukça önemlidir. Hücre kültürü ve moleküler biyoloji metotlarındaki ilerlemelere rağmen bu yöntemler uygulanan tedavi yöntemine karşı metabolizma cevabını tam olarak karşılayamamaktadır (48).

2.3. Kanser Çalışmalarında Deneysel Modeller

Karsinojenler, belirli koşullar altında tümör oluşumuna neden olabilen doğal veya insan yapımı maddelerdir. Deneysel kanser modelleri; kimyasal veya fiziksel karsinojenlerle oluşturulan modeller, tümör ksenograft modeli, transgenik, knockout veya kimerik modeller ve spontan veya transplante edilebilen tümör modelleri olmak üzere dört ana başlıkta toplanabilmektedir (48).

Kanser çalışmaları için hayvan modelleri, hastalığın gelişim ve patogenezinin altında yatan mekanizmalara ışık tutabilir. İdeal hayvan modeli bu nedenle insandaki tümör gelişiminin tüm yönlerini sergileyebilmeli, ek olarak, tümörün metastatik potansiyeli ve terapötiklere karşı karakteristik duyarlılığı ideal olarak korunmalıdır. Dahası, tümör modeli pratik olmalı, tümör gelişimi uygun zaman aralığında olmalı, öngörülebilir ve tutarlı olmalıdır (49).

2.3.1. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenlerle Oluşturulan Modeller

Kimyasal karsinojenlerin deney hayvanlarına intravenöz (i.v.), subkutan (s.c.) veya intraperitoneal (i.p.) yolla verilmesi suretiyle farklı kanser modelleri ortaya çıkarılabilmektedir (48). 7,12-Dimetil Banzantrazen (DMBA), Dimetilhidrazin, MX furanone ile birlikte N-metil-N-nitro-Nnitrosoguanidin (MNNG) gibi kimyasallar lösemi, kolon ve mide kanseri oluşturmak için kullanılabilir. Ayrıca Ethyl nitrosoarea (ENU), N-Nitrosodiethylamine (DEN), Phenobarbital, Nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK), Azoxymethane (AOM) ve 1,2-dimethyl hydrazine (DMH) uygulamaları farklı organlarda kanser oluşumuna sebep olmaktadır (50). Bu modellerin oluşturulmasında kullanılan karsinojenler araştırmacılar için tehdit oluşturabileceğinden çalışmalar titizlikle yürütülmeli ve laboratuvarında güvenlik açısından ciddi önlemler alınmalıdır (51). Fiziksel karsinojenler arasında iyonize ve ultraviyole radyasyon, X-ışınları ve gama ışınları sayılabilir (48).

2.3.2. Tümör Ksenograft Modeli, Transgenik, Knockout veya Kimerik Modeller

Tümör Ksenograft Modeli, insan hücrelerini reddetmeyecek, immunsupresif farelere, tümörün köken aldığı organın içine ya da deri altına insan tümör hücreleri verilmek suretiyle oluşturulan bir modeldir (52). Başka bir organizmaya ait bir genin fertilize bir yumurtaya mikroenjeksiyon yoluyla verilmesiyle transgenik hayvan elde edilir. Bu modelde; NF-1, c-fos, N-myc gibi onkogen verilen transgenik fareler karsinogenez için takip edilmektedir. Genellikle hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında bu modeller tercih edilir. Knockout fare modelinde, belli bir gen bölgesi susturulmuş fareler kullanılmaktadır. Kimerik hayvan ise genetik olarak farklı zigotlardan orijin alan hücrelerin fertilize yumurtaların füzyonu vasıtasıyla tek organizmada birleşmesi ile elde edilmektedir. Transgenik ve knockout fareler laboratuvar koşullarında üretilip ticari olarak kullanıma sunulmaktadır (51).

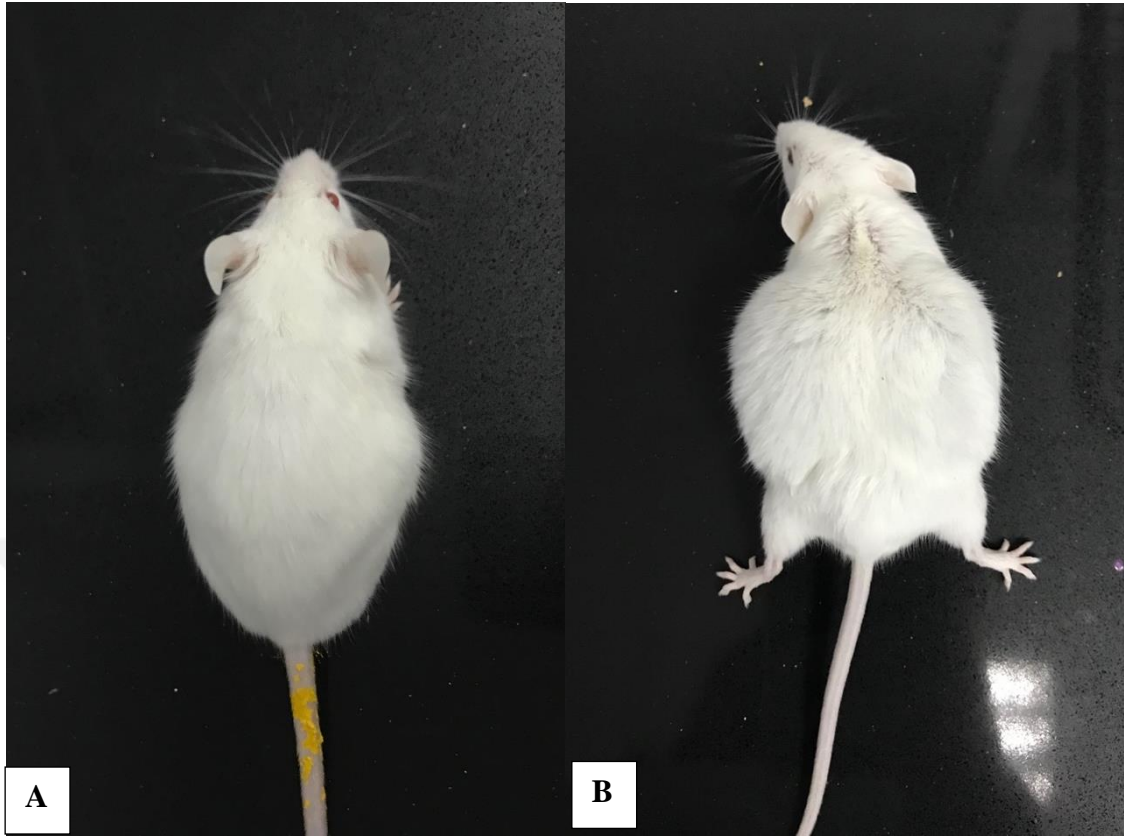
2.3.3. Spontan veya Transplante edilebilen tümör modelleri

Kendiliğinden oluşan tümörlerden alınan hücrelerin bir fareden diğer bir fareye transplantasyonu esasına dayanan bu tümör modellerinde, transplante edilen tümörler köken aldıkları kansere gelişim fazları açısından yüksek oranda benzerlik göstermektedir (48,51). Transplante edilebilen tümörler solid ya da sıvı fazda

olabilmektedir. Kolay üretilebilme ve yüksek karakterizasyon özellikleri transplante edilebilen tümör modellerinin avantajlı olarak ilaç takip çalışmalarında yaygın kullanım alanı bulmalarını sağlamıştır. Lewis lung karsinoma modeli, transplante edilebilen Wilm's renal tümörü ve EAT modeli transplante edilebilen tümör modellerinin en bilinen örnekleridir (48).

2.4. Kanser Çalışmalarında Kullanılan Bir Model: Ehrlich Assit Tümör

Ehrlich Ascites Tumor (EAT), ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış, Ehrlich ve Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir. Loewenthal ve Jahn (1932) bu tümörün farelerin peritonunda (intraperitoneal) sıvı halde büyüyen formunu elde etmiştir (53). Bu tümör hattı, daha sonra abdominal boşlukta kanser hücreleri ile birlikte sıvı birikimi (assit) de oluşturduğu için "Ehrlich Ascites Karsinoma" adını almıştır (54). Ehrlich Ascites Karsinoma, farklılaşmamış bir karsinom olarak endikedir ve yüksek transplante olabilme kapasitesine, hızlı proliferasyona, daha kısa yaşam süresine, regrese olamama özelliğine ve %100 maligniteye sahiptir (55). Ehrlich Ascites Karsinoma, bu amaçlara bağlı olarak assit veya katı bir form olarak kullanılır. Yani tümör hücresi içeren assit sıvısı intraperitoneal (i.p.) enjekte edilirse assit formu, deri altına (s.c.) enjekte edilirse katı bir form elde edilir (54, 55). Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri taşımaz ve farelere özgü bir tümördür (Şekil 2.2) (48).



Şekil 2.2. **A.** Herhangi bir uygulama yapılmamış fare; **B.** i.p. olarak EAT hücresi verilmiş fare.

EAT, orijinal olarak hiperdiploid yapıdadır. Yapılan çalışmalarda bu tümörün birçok alt formu elde edilmiştir. Haucicka tarafından yapılan bir çalışmada (1953), kromozomu tetraploid olan bir alt klon elde edilmişken, ilerleyen yıllarda diploid, hipertetraploid (Lennartz ve ark.,1968) ve hipotetraploid (Burns, 1968) subklonlar yapılmıştır. Sholz, tarafından yapılan bir başka çalışmada ise glikojen (+) ve glikojen Ø Ehrlich klonları ile birlikte kolşisine dirençli tümör klonu elde edilmiştir (54).

2.4.1. Solid (katı) Tümör

Bir farede spontan bir meme tümörü olarak başlayan tümörden, Ehrlich ve Apolant tarafından transplante edilebilir solid bir tümör modeli geliştirilmiştir (53). Deri altına EAT hücrelerinin enjekte edilmesiyle ortalama bir hafta içinde yaklaşık bir cm çapında bir katı tümör elde edilmektedir. Tümör hücreleri farklı büyüklüklerde olup çapları 20-30 µ civarındadır. Tümörün ortasında nekrotik bir sahanın bulunduğu ve çevresinde ise fibröz bir kapsülün olduğu belirtilmiştir (56,57). Yüksek oranda hücre ölümü olduğu için solid tümör oldukça yavaş bir büyüme hızına sahiptir (58). Solid tümör oluşturmak

amacıyla tümör hücre süspansiyonundan 1×10^6 hücre deri altına enjekte edildiğinde, ortalama yedi günlük bir süre sonunda ölçülebilecek kapasitede bir solid tümör saptanabilmektedir. Tedavi yapılmadığı takdirde farelerde 35-40 gün içinde ölüm gözlenmektedir (57).

2.4.2. Assit (Sıvı) Tümör

EAT hücrelerinin farelere i.p. enjeksiyonunu takiben çoğalan hücrelerin 4 veya 6 gün sonra oluşturduğu sıvı “assit” olarak tanımlanmıştır (54,55). Hücreler *in vitro* ortamda plastik yüzeye tutunmamaktadır (59). Oldukça agresif olan bu tümörün virulansı tekrarlanan pasajlarda artar ancak pasaj sayısı arttıkça differensiasyon kaybolur. Heterotransplantasyon özelliği kazanan hücreler assit formuna dönüşmektedir. Oluşan assit sıvısı gri-beyaz, bazen hafif kanlı viskoz bir yapıdadır ve ortalama olarak 0,1 ml’de 10 milyon neoplastik hücre bulunduğu bildirilmektedir (54).

EAT hücreleri, farelerin periton boşluğuna enjekte edilmelerini takiben proliferasyon ve plato aşaması olmak üzere iki fazlı bir çoğalma gerçekleştirmektedir. Proliferasyon ya da çoğalma fazında hücre sayısı artarken ikinci aşama olan plato fazında hücre sayısı hemen hemen sabit kalır (56,58,60). Yapılan çalışmalarda 3×10^6 EAT hücresinin periton boşluğuna verilmesini takiben hücre sayısının dokuzuncu güne kadar eksponansiyel (üssel) olarak arttığı daha sonra da tümörün plato fazına girdiği ortaya konmuştur (60). Plato fazında, EAT hücresi çoğalmasının yavaşlamasıyla assit sıvısı birikimindeki artış arasında bir korelasyon bildirilmiştir. Tümör gelişiminin plato fazında, periton boşluğundaki hücrelerin geç G_2 fazında biriktikleri ve bu dönemde asit sıvısı ortamdaki uzaklaştırılırsa hücrelerin mitoz fazını geçirip G_1 fazına girdikleri tespit edilmiştir (59).

EAT, bazı çalışma türleri için katı tümörler ile karşılaştırıldığında bazı avantajlar sunmaktadır. Bunlar, kolay çalışma imkanı sunması, homojen ve konsantre bir serbest tümör hücresi süspansiyonu şekillenmesi, dejeneratif değişikliklerin nispeten nadir olması ve hücrelerin kolayca sayılabilmesi olarak sıralanabilmektedir (61).

2.5. Ehrlich Assit Tümör Modeli ile Yapılan Çalışmalarda Değerlendirme

EAT tümör modeli ile yapılan çalışmalarda göz önüne alınan parametreler çalışmanın *in vivo* veya *in vitro* olarak planlanmasına ve *in vivo* çalışmanın da sıvı tümör ya da katı tümör olarak çalışılmasına göre değişmektedir.

2.5.1. *In Vivo* Çalışmaların Değerlendirilmesi

Solid tümör modeliyle yapılan deneysel çalışmalarda hayvanların ağırlık değişimi, tümör boyutu ve ağırlığı (62), iç organlarındaki bazı biyokimyasal parametreler, dokularının patolojik ve immunohistokimyasal parametreleri, ölçülen değişkenler arasında yer alır (63). Sıvı tümör modelinde ise hayvanların ağırlık değişimi, yaşam süresi ölçülmesi (64), karın çevresi ölçümü, canlı ve ölü EAT hücresi sayılması, tümör sıvısının niceliksel analizi (packed volüme), hayvanların iç organlarının histopatolojik incelenmesi, iç organlarda ve kanda çeşitli biyokimyasal parametrelerin tayini, hayvanların fiziksel özelliklerinin gözlemi değerlendirme için kullanılan kriterlerdendir (10).

2.5.2. *In Vitro* Çalışmaların Değerlendirilmesi

EAT *in vitro* çalışmalarında canlı ve ölü hücre sayımı (65), hücre döngüsü testi ve Annexin V (62), Caspase 3 (66), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) *in vitro* sitotoksosite testi (67), DNA fragmantasyonu (68) gibi apopitotik parametreler ölçülmektedir. Yine mitotik aktivite testi de *in vitro* kanser çalışmalarında kullanılmaktadır (69).

2.5.3. EAT Modelinde 5-Fluoro Uracil

Kemoterapi ajanı olan 5-FU (5-Fluoro Uracil), yaklaşık 40 yıldır kansere karşı kullanılan bir antimetabolittir (70-72). Antimetabolitler, temel biyosentetik süreçleri inhibe ederek veya DNA ve RNA gibi makromoleküllere dahil olup onların normal fonksiyonlarını inhibe ederek etki göstermektedir. 5-FU her iki şekilde de etkisini gösterebilmektedir (73).

5-FU, hidrojen yerine C-5 konumunda bir flor atomuna sahip bir urasil analogudur. Urasil ile aynı kolaylaştırılmış taşıma mekanizmasını kullanarak hücreye hızla girer,

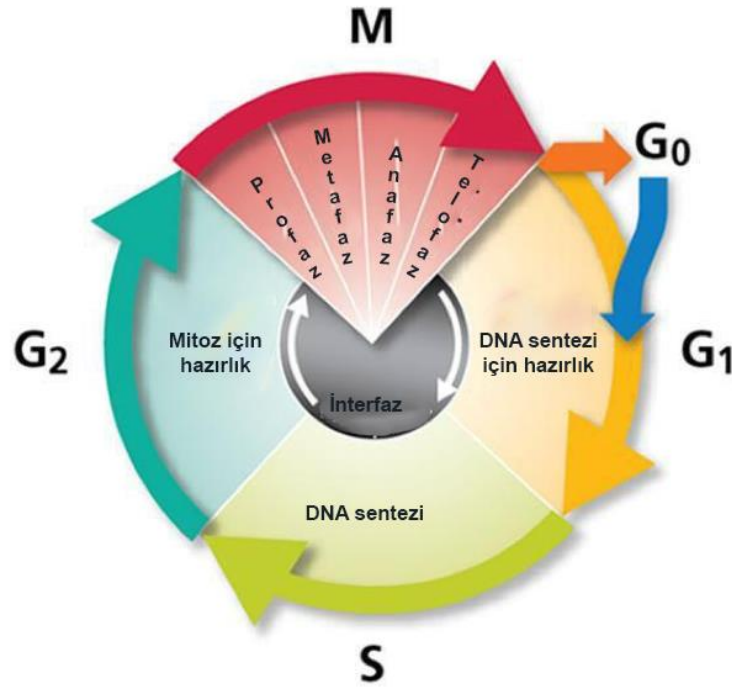
hücre içinde florodeoksiüridinmonofosfat, fluorodeoksiüridintrifosfat ve fluorouridintrifosfat adlı aktif metabolitlere dönüşür. Bu aktif metabolitler, RNA sentezini ve nükleotid sentetik enzimi olan Thymidylate Synthase'ın (TS) etkisini bozar (73).

5-FU sitotoksitesinin ana mekanizması olan TS inhibisyonunun kesin moleküler mekanizmaları hala belirsiz olsa da TS' nin florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP) tarafından inhibe edildiği düşünülmektedir. TS' nin inhibisyonu, deoksitimidin monofosfat'ın (dTMP) ve daha sonra deoksitimidin trifosfat'ın (dTTP) tükenmesine neden olur. Bu da çeşitli geri bildirim mekanizmaları yoluyla diğer deoksinükleotit seviyelerinin bozulmasını tetikler. Deoksinükleotit dengesizlikleri DNA sentezini ve onarımını engelleyebilmektedir (73).

5-FU'nun başlıca kullanımlarının bazıları kolorektal ve gastrointestinal kanserler olmakla birlikte aynı zamanda meme kanseri, baş ve boyun kanseri ve yumurtalık kanseri agresif formlarının tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (70-72). 5-FU, EAT çalışmalarında tedavi kontrol grubu olarak kullanılabilir (62,65,68).

2.6. Hücre döngüsü

Organizmaların büyüme, gelişme ve çoğalmaları hücre bölünmesi vasıtasıyla gerçekleşir. Hücre bölünmesi mitoz ve mayoz bölünme olarak ikiye ayrılır. Bunlardan mayoz bölünme yalnızca cinsiyet hücrelerinde meydana gelir ve nesiller arasındaki genetik aktarımı sağlar. Mitoz bölünme ise somatik hücrelerde gerçekleşir ve genetik olarak birbirine eşit hücrelerin oluşmasını sağlar. Ökaryotik hücrelerde bölünmenin sadece belli bir aşamasında (S fazında) DNA sentezi gerçekleşir. S fazından önce ve sonra birer zaman aralığı (Gap) bulunur. Bu nedenle hücre döngüsü G₁ (ilk aralık), S (sentez), G₂ (ikinci aralık) ve M (mitoz) olmak üzere dört evrede gerçekleşir. G₁, G₂ ve S evreleri hep birlikte İnterfaz olarak isimlendirilir ve mitozun hazırlık evresi olarak kabul edilir. G₁ evresinde hücrenin ihtiyaç duyacağı proteinler ve RNA sentezlenir, DNA sentezi için hazırlık yapılır. S evresinde RNA sentezi devam eder, protein sentezi artar ve DNA sentezi gerçekleşerek hücrenin DNA miktarı iki katına çıkar. G₂ evresinde ise sadece RNA ve protein sentezleri devam eder. Birbirini izleyen tüm bu evreler hücre döngüsünün basamaklarıdır (74,75). (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Hücre döngüsü şematik görünümü (76).

Dokulardaki bölünmeyen birçok hücre (dinlenme halindeki fibroblastlar gibi) S evresinden hemen önce hücre döngüsünü durdurur. Dinlenme durumundaki bu hücreler G₀ evresindeki hücreler ya da G₀ hücresi olarak nitelendirilir. G₀ hücreleri canlıdır ve metabolik olarak aktiftir ama bölünmez (çok özelleşmiş sinir ve kas hücreleri gibi). Karaciğer hücreleri gibi bazı hücreler ise belirli çevresel sinyalleri aldıklarında (yaralanma sırasında salınan büyüme faktörleri gibi) hücre döngüsüne geri dönebilirler (77). Fakat kanser hücrelerinin G₀ fazına girme yeteneği yoktur dolayısıyla bölünmeyi durduramaz (78).

Hücre döngüsünün farklı aşamaları arasındaki koordinasyon bir 'Kontrol Noktası Sistemi' (checkpoints) tarafından gerçekleştirilir. Bu kontrol noktalarının görevi tamamlanmamış veya hasarlı kromozomların replikasyonunu engelleyerek yavru hücrelere geçişini durduraktır. Hücre döngüsü boyunca tespit edilmiş üç kontrol noktası mevcuttur.

G₁ kontrol noktası: DNA bir hasara uğramışsa döngüyü G₁'de durdurur. **G₂ kontrol noktası:** DNA replikasyonunda bir hata olmuşsa ve ortamda replike olmamış DNA varsa döngüyü G₂'de durdurur. **M kontrol noktası:** Mitoz esnasında yavru hücreler mitotik içcik üzerinde düzensiz bir biçimde dizilirse döngüyü M evresinde durdurur (74,75,82).

Hücre döngüsü kontrol noktalarının her biri genetik olarak düzenlenir. Ürünleri döngüyü ilerleten yahut baskılayan genlerin karşılıklı etkileşimi hücre döngüsünü düzenler. Bu genlerden herhangi birinin bozulması ya da mutasyonu çeşitli yollardan kansere neden olabilir. Örneğin G_1/G_2 ya da G_2/M kontrol noktalarını kontrol eden genler hatalıysa hücre DNA hasarını onarmadan döngüde ilerlemeye devam edebilir bu da kontrolsüz çoğalmayla sonuçlanabilir (82).

Bu kontrol noktalarından G_1 birçok hücre için en önemli olanıdır. Eğer hücre G_1 kontrol noktasında “devam et” sinyalini alırsa genellikle döngüyü tamamlayarak bölünür. “Devam et” sinyalini almazsa döngüden çıkar ve G_0 fazına girer (77).

Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda p53 adlı genin düzeyi artar ve hücre siklusunu G_1 fazında durdurarak DNA onarımı ya da programlı hücre ölümü için hücreye zaman kazandırır. Bu genin mutasyonu nedeniyle G_1-S geçişlerindeki değişiklikler bölünmenin kontrolsüz bir biçimde devam etmesi suretiyle kanserle sonuçlanabilir (83).

Hücre döngüsü kontrol noktalarına ek olarak döngünün düzenlenmesinde siklinler ve siklin-bağımlı kinazlar adlı iki protein sınıfının da görevi mevcuttur. Eğer DNA replikasyonu ya da onarımında bir problem varsa hücreler bölünmeyi sorunlar çözülene kadar durdurur. Eğer hasarlar onarılamayacak kadar büyükse bir diğer seçenek de apoptoz yani programlı hücre ölümüdür (82).

2.7. Apoptoz

Apoptoz ilk olarak 1972 yılında tanımlanmış olup antik Yunancada yaprak dökümü anlamına gelmektedir (80). Hücrelerin yaşamları boyunca yapım-yıkım dengesini koruyan başlıca mekanizma olan apoptoz, embriyonun gelişimi ve erişkin dokuların da sağlıklı bir şekilde yaşamına devam etmesi için hayati öneme sahiptir (81). Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak kan hücresi üretimi sürerken günlük ortalama 5×10^{11} adet kan hücresi apoptoz yoluyla imha edilmektedir. Bağırsak epitel hücrelerinin sürekli yenilenmesi ya da menstrüasyon periyodunda uterus iç yüzü hücre tabakasının ölecek uzaklaşması da apoptoza örnek gösterilebilmektedir (74).

Hücre ölümü apoptoz ve nekroz olmak üzere iki ayrı tipte olabilmektedir (82). Bu iki hücre ölümünün başlaması için gerekli etki ve etkenler birbirinden farklıdır. Nekrotik

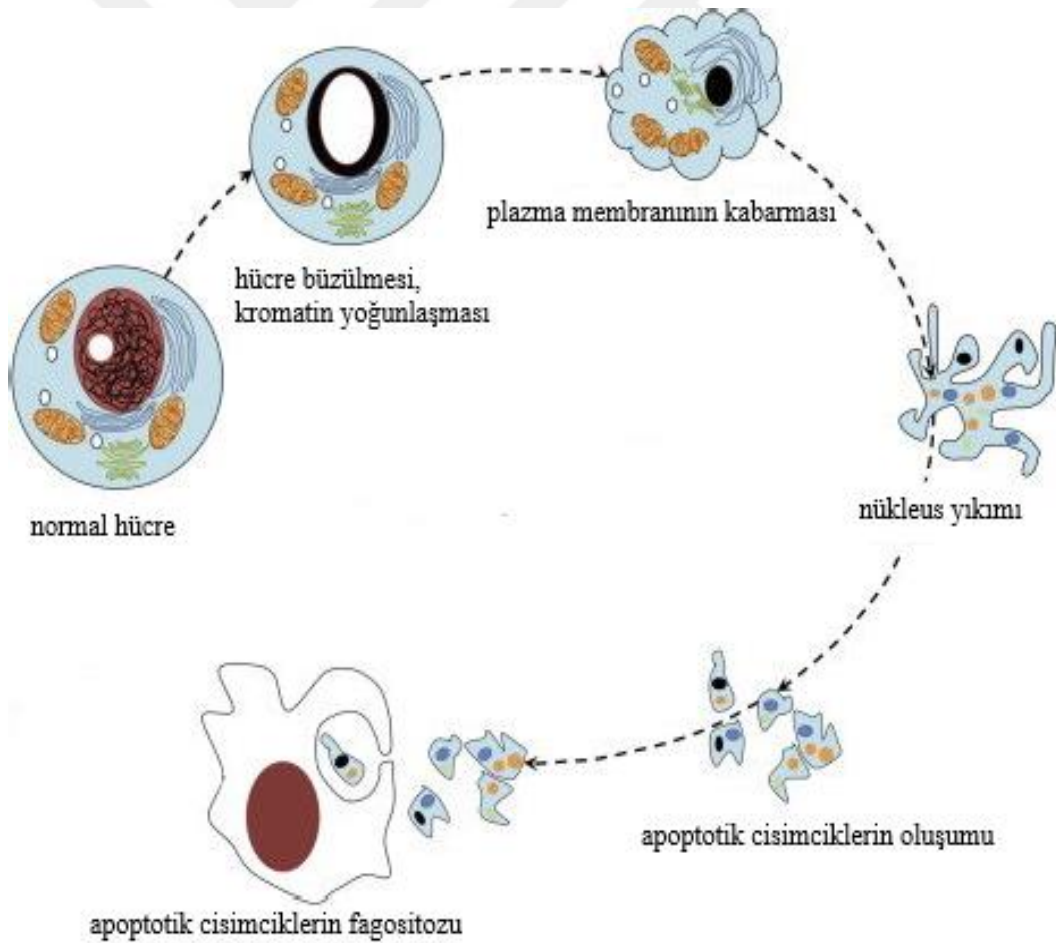
hücre ölümü hücrelerin hızla şişmesi ve lizis ile ilişkilendirilen akut hücrel hasar kaynaklı patolojik hücre ölümü olarak tanım bulurken apopitoz'da tam tersine hücrenin ölümü kontrollü bir otomasyon olarak tarif edilir. Apopitoz, fizyolojik bir olay olup, gelişimin herhangi bir aşamasında hasara uğramış olan ya da fizyolojik ömrünü tamamlamış hücrelerin planlı bir şekilde ölümü şeklinde tanımlanmaktadır. Bu olay gen düzeyinde gerçekleşmekte olup çeşitli sinyallerle tetiklenmektedir (83). Apopitoz başlamak için yüksek miktarda hücre içi ATP'ye (Adenozintrifosfat) ihtiyaç duyarken, nekroz için yüksek enerji gereksinimi bulunmamaktadır. Hücre ölümünün hangi şekilde gerçekleşeceğine karar veren mekanizma hücre içi ATP seviyesidir (84). Apopitoz ile nekroz arasındaki fark Tablo 2.2'de verilmiştir.

Organizmada yapım (hücre bölünmesi) ve yıkım (hücre ölümü-apopitoz) arasında kontrollü bir denge mevcuttur. Apopitoz kanser hücrelerinin aleyhine, organizmanın lehine işlemektedir (85). Son yıllarda yapılan çalışmalar apopitozun kanser, otoimmün bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynadığını göstermiştir (85,86). Kansere ilişkin bozukluklarda düzeni sekteye uğramış ve kontrolsüz apopitoz önemli bir sorun teşkil etmektedir (87).

Tablo 2.2. Apopitoz ve nekroz arasındaki farklar (88).

Özellikler	Apopitoz	Nekroz
Yol açan nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Sitotoksik T lenfositler	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stres
Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Blebler oluşur. Organeller sağlamdır. Apopitotik cisimcikler oluşur. PS translokasyonu gözlenir. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir.	Hücre membran bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organeller parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. PS translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır.	ATP gerektirmez. DNA rastgele parçalanır.
Diğer özellikleri	Fizyolojik ve patolojik şartlarda gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İnflamasyon görülmez.	Patolojik şartlarda gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. İnflamasyona neden olur.

Apoptozun basamakları sırasıyla, kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, çekirdeğin parçalara ayrılması, apoptotik cisimciklerin oluşması ve bu cisimciklerin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi olarak belirtilmektedir (Şekil 2. 4) (89). Apoptozun erken evresinde hücrenin diğer hücrelerle ve kendi ekstraselüler matriksi ile olan bağlantıları plazma zarı aracılığıyla kopmaktadır. Diğer hücrelerle fiziksel bağı kopmuş olan hücre büzülür ve hücrenin sitoplazmasında sisternalar, vakuol ve vezikülleri oluşturmak amacıyla kabarmır ve endoplazmik retikulum genişler (90). Bu sisternalar hücre zarıyla birleşerek tomurcuklanmalar gösterir. Bu tomurcukların ayrılmasıyla apoptotik cisimcikler meydana gelir. Apoptotik cisimciklerin, makrofajlar ya da çevredeki normal hücrelerce fagosite edilmesiyle hücresel yıkım tamamlanmaktadır (91). Apoptotik cisimciklerin fagositik hücreler tarafından tanınması, plazma zarındaki değişiklikler sayesinde mümkün olmaktadır (90).



Şekil 2.4. Apoptoz morfolojisi (92).

2.7.1. Apoptoz mekanizması

Bir hücrenin planlı olarak ölüm prosedürünü başlatması için birtakım faktörlerin etkisi gerekmektedir. Bu faktörler ısı, radyasyon, besin yoksunluğu, viral enfeksiyonlar, hipoksi gibi hücre içi olabileceği gibi toksinler, hormonlar, büyüme faktörleri, nitrik oksit ve sitokinler gibi ekstraselüler uyarıları da içerebilir. Apoptoz, ölüm mekanizmasını tetikleyen uyarının kaynağına bağlı olarak intrinsik (mitokondriyal) yolak ve ekstrinsik (ölüm reseptör yolağı) yolak olmak üzere iki farklı mekanizmayla gerçekleşir. T-hücre aracılı granzim/perforin bağımlı hücre ölümü de üçüncü yolak olarak eklenebilir (90).

2.7.1.1. İntrensik (mitokondriyal) Yolak: Hücre içi uyarıların etkisiyle mitokondrinin de katılımıyla gerçekleşen apoptoz şeklidir. İntrensik yolu başlatan uyarılar, negatif ya da pozitif biçimde etki edebilecek hücre içi sinyaller üretir. Büyüme faktörü, hormon ve sitokin gibi hücre ölümünü bastıran faktörlerin ortadan kalkması, apoptozu etkileyen negatif uyarı sistemi olarak; radyasyon, toksinler, serbest radikaller gibi faktörler apoptozu etkileyen pozitif uyarı sistemi olarak tanımlanmıştır (90,93). Bu uyarılar mitokondriyal membranın geçirgenliğinin bozulmasına neden olur ve sağlıklı hücrelerde mitokondrinin membranları arasındaki boşlukta bulunan iki grup pro-apoptotik proteinin sitozole salınması suretiyle programlı hücre ölümünü sağlar (93).

2.7.1.2. Ekstrinsik yolak (ölüm reseptör yolağı): Ölüm uyarısının hücre dışından gelerek hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla ölüm uyarısının hücre içine iletilmesi esasına dayanır (90). Hücre zarının dış yüzeyindeki reseptörlere ölüm uyarısı bağlandıktan sonra reseptörlerin sitoplazmada kalan kısımları bir araya gelir ve hücre ölümü için aracı proteinlere bağlanır (88).

2.7.1.3. Granzim/Perforin Yolağı: Sitotoksik T-lenfositler, tümör hücreleri ya da virüs ile enfekte hücrelerin hücre membranlarında zardan gözenek oluşturabilen perforin adlı molekül ile porlar oluşmasını sağlar ve Granzim A ve Granzim B ihtiva eden granüllerini açılan bu gözeneklerden hedef hücrelere salmak suretiyle etki gösterir (93).

2.7.2. Apoptozu Belirlemede Kullanılan Yöntemler

Hücrede apoptozu belirlemek için kullanılan metotlardan en çok bilinenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir: (80).

- **Hematoksilen- eozin boyama:** Hücre kromatini boyanarak apoptotik hücrelerin varlığı kromatinin kondanse olması esasına dayanarak gözlemlenebilir.
- **Giemsa boyama:** Yine çekirdek morfolojisi esas alınarak apoptotik hücrelerin tanınması esasına dayanır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi belirlenebilse de bu boyamanın belirgin bir üstünlüğü yoktur.
- **Florasana mikroskopi:** DNA'ya bağlanan floresan boyaların nükleusu görünür hale getirmesi esasına dayanır. Canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilebileceği bir boya seçilmelidir.
- **Elektron mikroskopi:** Apoptoz esnasında gelişen sitoplazmik küçülme, kromatik kondensasyonu ve fragmantasyonu gibi morfolojik değişimleri saptayabilen değerli bir yöntemdir.
- **Faz kontrast mikroskopi:** Apoptotik hücrelerde gelişen cepçikler görülebilir.
- **TUNEL metodu:** DNA kırıklarının görülmesini sağlayan yöntemdir.
- **M30 metodu:** Apoptoza giden hücrenin kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yolla boyanması esasına dayanan yöntemdir.
- **Kaspaz-3 metodu:** Apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3'ün immunohistokimyasal olarak belirlendiği yöntemdir.
- **Agaroz jel elektroforezi:** İnternükleozomal bölgelerden kırılan DNA apoptoza özgü merdiven görüntüsü alır. Bu yöntem bu görüntüyü tespit etme esasına dayanır.
- **Western blot:** Apoptoza özgü Bcl-2, Kaspaz-3 gibi proteinlerin ekspresyona uğrama ve kırılma durumlarını belirlemek için kullanılır.
- **Flowsitometri:** Floresan madde ile belirlenmiş antikor kullanılarak apoptoza özgü eksprese olan hücre yüzey proteinlerinin saptanmasında kullanılır (94).
- **Annexin V testi:** Yukarıda kullanılan yöntemlerden niceliksel veri sağlayanların çoğu özgüllükten yoksun olup çok zaman alır ve genellikle apoptoz tespiti için hücre bütünlüğünün bozulmasını gerektirir. Bu tür analizlerin çoğunun temeli olan kromatinin morfolojik değişiklikleri ve degradasyonu apoptozun geç dönemlerinde ortaya çıkar. Oysa ki Annexin V testi apoptozun erken aşamalarında ortaya çıkan,

apoptotik hücrelerin fagositler tarafından tanınması sağlayacak olan hücre yüzey değişikliklerinin tespitini içerir (95).

2.7.2.1. Annexin V

Annexin V, normal olarak hücre zarının iç yüzüne lokalize olan bir membran bileşeni olan fosfatidilserin için yüksek bir afiniteye sahip olan bir kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir (96). Apoptozun erken aşamalarında hücre yüzeyinde birtakım değişiklikler meydana gelir (97). Bu değişikliklerden biri de plazma membranının iç katmanından dış katmana fosfatidilserin (PS) geçişidir (97-101). Bu fosfolipid normalde plazma membranının sitoplazmik yüzünde bulunur (95). Annexin V, PS için yüksek afiniteye sahip bir kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein olduğundan hücre zarının PS maruziyetini saptamada kullanılabilir (97).

Nekroz ve apoptozun ayırıcı tanısını yapmak için hücre zarı bütünlüğünün kontrol edilebileceği bir boyama ile birlikte Annexin V testi uygulanmalıdır zira apoptozun erken aşamalarında hücre zarı bütünlüğü korunurken nekroz başladığı anda hücre zarı parçalanır (97). PS'ye Annexin V bağlanmasının özgüllüğü, floresin izotiyosiyanat (FITC) etiketli Annexin V (Annexin V-FITC) kullanılarak inhibisyon çalışmaları ile gösterilmiştir (95).

2.7.2.2. Mitotik Aktivite

Mitokondri microsporidia gibi ilkel protozoalar ve memeli eritrositleri dışında tüm hücrelerde bulunan ve hücrenin enerji santrali olma özelliğini gösteren bir organeldir. Hareketli ve şekil değiştirebilen bir yapıya sahip olup hücrelerin ATP ihtiyacına göre hücredeki yerleri ve miktarları da değişebilir (75). Serbest radikallerin birincil üretim yeridir ve ek olarak apoptoz gibi hücre ölüm süreçlerinin kilit düzenleyicilerini içerir. Mitokondri değişiklikleri bu nedenle hücre sağlığı ve stresinin oldukça hassas göstergeleridir (102).

Her bir mitokondri özel iki tabakalı bir zar yapısına sahiptir. Bunlardan dıştaki zarda porin olarak isimlendirilen bir taşıyıcı protein mevcuttur. Bu zar 10.000 dalton ve daha küçük moleküllerin geçişine izin verir. Dış zarın bir başka görevi de lipid sentezinde rol oynayan bazı enzimleri taşımaktır (74,75). İç zar cristae adı verilen kıvrımlara sahiptir ve kardiolipin adı verilen, protein geçişini sınırlandıran bir proteini içerir (75).

Mitokondriyal solunum sırasında üretilen hücresele enerji mitokondriyal membran boyunca bir elektrokimyasal gradyan olarak depolanır ve bu sağlıklı enerji hücrelerinde enerji birikimi, hücrenin ATP sentezini gerçekleştirmesini sağlayan bir mitokondriyal trans-membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) yaratır. Mitokondri iç zarının transmembran potansiyelinin kaybı sıklıkla, apoptozun erken evreleriyle ilişkilendirilir. Bu potansiyel kaybının, sitokrom C'nin sitozole salınmasına yol açtığına inanılır, bu da daha sonra apoptozu tetikler (103).

Mitokondriyal membran potansiyel değişiklikleri apoptoz, nekrotik hücre ölümü ve kaspazdan bağımsız hücre ölüm süreçlerinde rol oynamaktadır. Bu nedenle iç mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu; apoptoz, ilaç toksisitesi ve çoklu hastalık durumlarının araştırılmasında giderek daha önemli hale gelen mitokondriyal disfonksiyon ve hücresele sağlığın güvenilir bir göstergesidir (103).

Son zamanlarda, birçok uyarıcı tarafından tetiklenen apoptozda, mitokondrilerin sitokrom C salınımı yoluyla kaspaz aktivasyonunu koordine etmede önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (87). Apoptoz esnasında oluşan mitokondriyal disfonksiyon, sitokrom C'nin mitokondriden sitozol içine salınmasına neden olabilir. Sitokrom C burada Apaf-1'e bağlanarak kaspazları aktive eder (104).

Apoptotik ölüm mekanizmasının merkezi bileşenleri, Bcl-2, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ve kaspaz aile üyelerini içerir. Kaspazlar (sisteinil aspartat-spesifik proteazlar), proteolitik aktivasyon üzerine, hücre içi anahtar substratları parçalayabilme yeteneğine sahip olan ve apoptoz ile ilişkili morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açan, proenzimler olarak sentezlenir (87).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

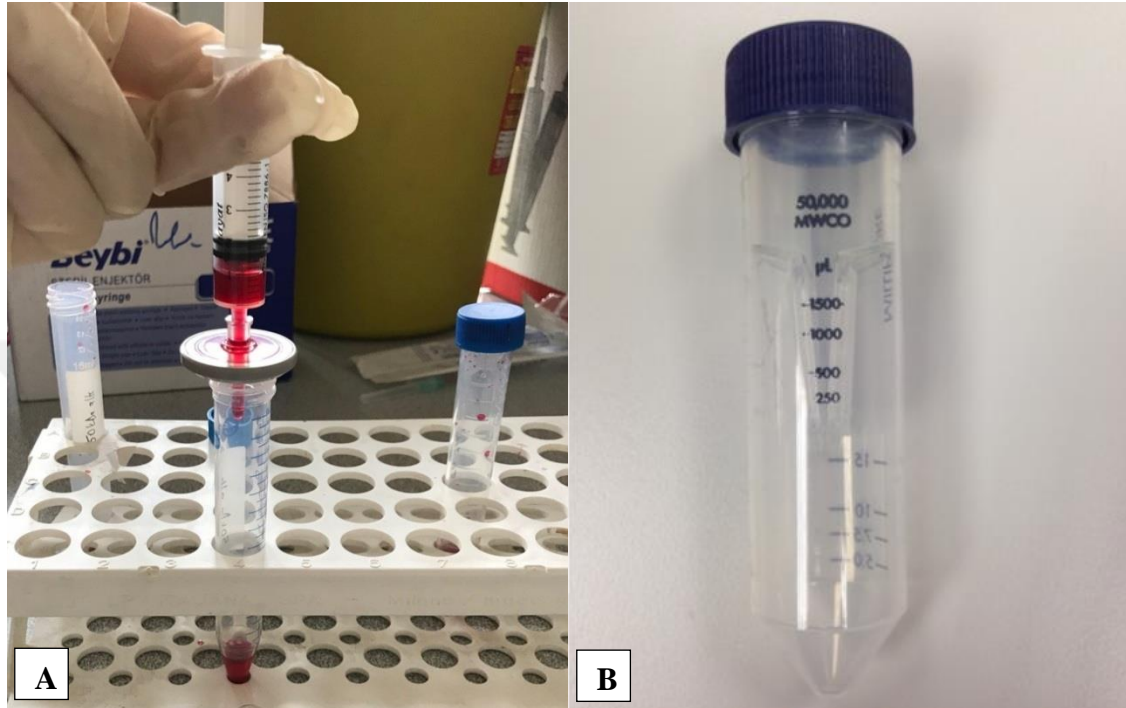
Bu çalışma sırasında hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen işlemlerin hayvan deneyleri etiğine uygunluğu, Erciyes Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulunun 09.12.2015 tarih ve 15/155 numaralı kararı ile onaylandı (Ek 1) ve hayvansal prosedürün ön çalışması Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM), çalışmada sonuçları verilen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar Betül- Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde (GENKÖK'te) gerçekleştirildi.

3.1. Gilaburu Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan gilaburu Kayseri ilinin Gesi ilçesinde gilaburu meyvesinin hasat zamanı olan Ekim ayı içerisinde tek bir ağaçtan elle toplandı. Meyveler içinde bulunan yaprak ve dallardan arındırıldıktan sonra plastik kaplar içerisinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'na getirilerek tartıldı ve ağırlıkları not edildi. Geleneksel yolla meyveler ezildi ve elde edilen meyve suyu, miktarı not edildikten sonra 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 5500/dk devirde 15°C'de 30 dakika santrifüj (Selecta, İspanya) edilen meyve suyunun posa ve sıvı miktarları not edildikten sonra posalar ayrıldı.

Gilaburu meyve suları önce 0,45 µm sonra da 0,22 µm'lik enjektör ucu filtrelerden geçirildikten sonra (Şekil 3.1.A) santrifüj tipi Amicon-15 kodlu 50 kDa'luk filtrelere (Merck Millipore, Almanya) konarak (Şekil 3.1. B) 15°C de 30 dakika santrifüj edildi. Bu süre sonunda filtrenin üst haznesinde bulunan sıvı 50 kDa üzeri; filtrenin alt haznesinde biriken sıvı ise 50 kDa altı olarak etiketlendi ve miktarları not edilerek cam kaplarda 30 ml'lik birimler halinde dondurulduktan sonra alçak basınçta (0.001 mm Hg), -25°C bulunan liyofilizatör (Labconco, ABD) ile kurutularak toz haline getirildi. Her bir grupta ne kadar meyve suyundan ne kadar toz ekstrakt elde edildiği hassas terazide tartılarak not edildi. Gilaburu toz ekstraktları uygulama gününe kadar -20°C'de

muhafaza edildi. Meyvelerin toplanmasından itibaren bütün işlemler mümkün olduğunca az ışıklı ortamda gerçekleştirildi ve muhafazada karanlık (koyu renkli) şişeler kullanıldı.



Şekil 3.1. A. Gilaburu meyve suyunun enjektör ucu filtreden geçirilmesi B. Santrijüj tipi 50 kDa'lık filtre.

3.2. Gilaburu Toz Ekstraktlarının Çözünmesi ve Sterilizasyonu

Gilaburu toz ekstraktları uygulama gününde her bir deney grubu için istenilen konsantrasyonları sağlayacak şekilde tartılarak Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) tamponu ile çözdürüldü ve vorteksle orta devirde homojenize edildi. Çözdürme işleminden sonra elde edilen sıvılar farelere enjekte edilmeden önce ilk olarak 0,45 μm 'lik daha sonra 0,22 μm 'lik enjektör ucu filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi ve bir ml'lik insülin enjektörleriyle farelere belirlenen dozlarda günlük her bir fareye 0,2 ml'lik hacimlerde i.p. yolla verildi. Gilaburu dozları her enjeksiyon günü taze olarak hazırlandı ve hayvanların enjeksiyon bölgesi (karnın sağ ve sol yarımı) günlük olarak değiştirildi.

3.3. Hayvanlara Verilecek Gilaburu Dozunun Belirlenmesi

Halk arasında gilaburunun bazı hastalıklar için tedavi edici etkisini gösterebilmesi için günde yaklaşık bir kg gilaburu meyvesinin suyunun taze olarak hazırlanıp 1/1

sulandırılarak içilmesi önerilmektedir (105). Bir kg gilaburu meyvesinden 650 ml meyve suyu elde edildiği ve 1/1 sulandırıldığı göz önüne alındığında içilen sulandırılmış meyve suyu miktarı 1300 ml olup bu da bir kişinin alması gereken günlük sıvı miktarının yaklaşık yarısına tekabül etmektedir. Bir başka ifade ile günlük sıvı tüketiminin dörtte biri kadar saf gilaburu suyu tüketmek tedavi edici etkinin gözlenmesi için yeterli görülmektedir (47).

Farelerin günlük alması gereken sıvı miktarı 1,5 ml/10g olarak rapor edilmiştir (106). Çalışmada kullanılan farelerin ortalama ağırlıklarının 25-30 g aralığında olduğu belirlendi. Bu nedenle günlük sıvı ihtiyacı hayvan başına ortalama 4 ml olarak hesaplandı ve tüketilen sıvı miktarının dörtte biri esas alınarak 1 ml gilaburu verilmesine karar verildi. 50 kDa altı gilaburunun 1 ml'sinden 0,07 g; 50 kDa üstü gilaburunun 1 ml'sinden ise 0,08 g ekstre elde edildi. Hayvanlara günlük olarak verilecek ekstrelerin tartımında bu esasa göre hareket edildi.

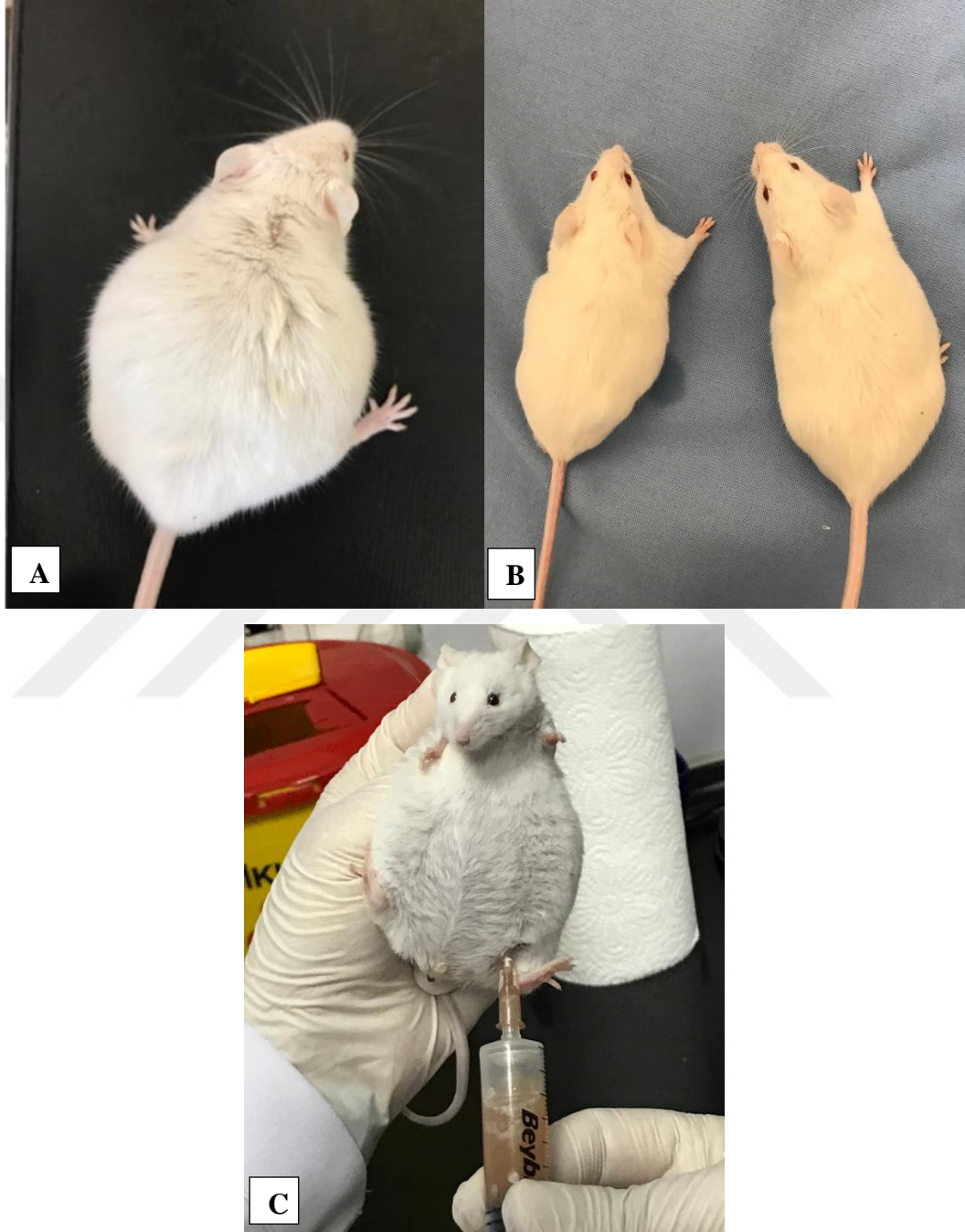
3.4. Stok Fare Oluşturulması

Çalışmada GENKÖK'ten temin edilen ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen, 8 haftalık, 77 tane erkek Balb-c ırkı fare kullanıldı. Çalışmada kullanılan fareler nem oranı %50-55, sıcaklık $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve ışık periyodu 12/12 gece/gündüz olan ortamda tutuldu. Farelere standart pelet fare yemi ve içme suyu olarak çeşme suyu ad libitum olarak verildi. Altlık olarak mısır koçanı kullanıldı.

Kriyotüplerde %10'luk Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde, -80°C 'de tutulan EAT hücreleri, 37°C 'deki sıcak su banyosunda çözdürüldü. Çözülen hücrelerden 100 µl alınarak tripan mavisi ile boyanıp mikroskop altında canlı hücre yüzdesi tespit edildi. Steril enjektör yardımıyla donör farenin (stok fare) periton boşluğuna, EAT hücrelerinin bulunduğu assit sıvısı enjekte edildi ve stok fare günlük olarak genel durumu fotoğraflanarak, ağırlığı ise tartılarak takip edildi. Beşinci günden itibaren stok farenin karın çevresinde belirgin bir şişlik gözlendi ve şişlik gün geçtikçe artarak 12. günde karın boşluğundan enjeksiyonla sıvı alınmasına uygun hale geldi (Şekil 3.2).

Asit sıvıları enjektörle alındıktan sonra stok ve deney grubu hayvanları genel anestezi altında [ketamin-xylozine (50 mg/kg, 15 mg/kg)] sakrifiye edildi ve histopatolojik

inceleme için karaciğer, dalak, böbrek, testis, mide, ince ve kalın bağırsaklardan alınan dokular tespit edildi.



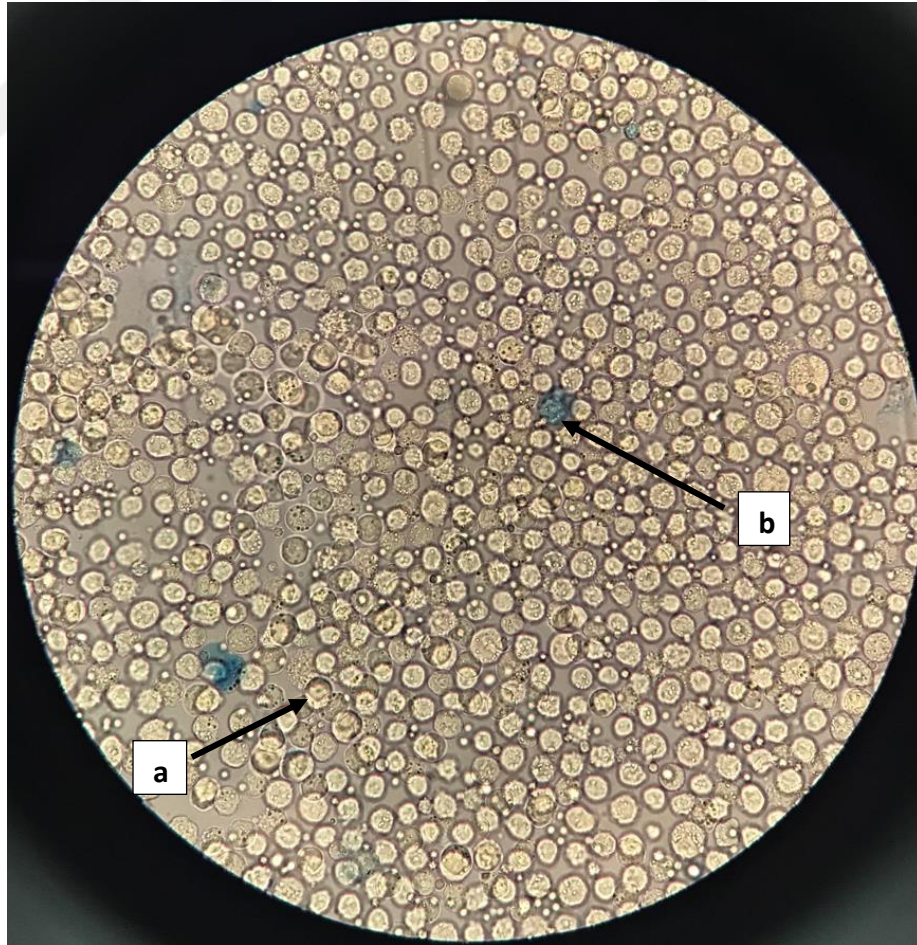
C: Stok farenin periton boşluğundan EAT sıvısı alınması.

Şekil 3.2. A. Karın boşluğundan sıvı alımına hazır olan stok fare B: Stok fare ve sağlıklı fare yan yana, soldaki fare sağlıklı, sağdaki stok fare.

3.5. Hücre Canlılığının Tespiti

Stok hayvanın karın boşluğundan alınan EAT sıvısından 100µl alınarak boş bir ependorf tüpüne konuldu, üzerine 400 µl DPBS eklendi ve elde edilen karışım pipet yardımıyla homojenize edildi. Karışımdan alınan 100 µl başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 100 µl %10'luk tripan mavisini eklendi ve karıştırıldı. Oluşturulan son karışımdan alınan 50 µl, üzerine lamel kapatılmış Thoma laminasının örnek haznelere konularak ışık mikroskopunda önce 10'luk daha sonra 40'luk objektifte incelenerek boyanmış ve boyanmamış hücreler sayılarak not edildi. Maviye boyanmış hücreler ölü, parlak beyaz hücreler canlı kabul edildi (Şekil 3.3). Thoma lamı sayım formülüne göre 1 ml'de bulunan total hücre sayılarının belirlenmesi için de aynı prosedür izlendi.

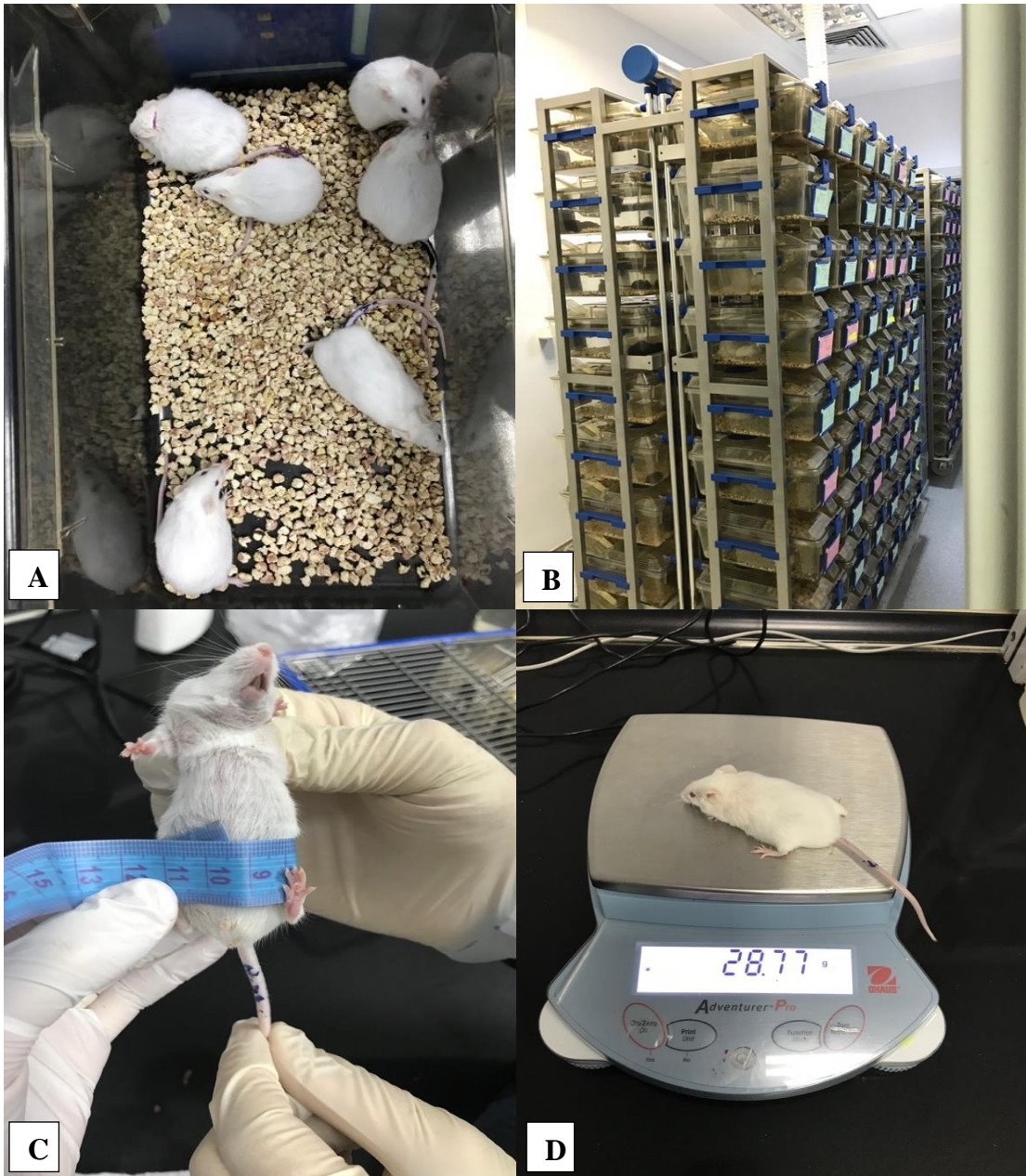
$$\text{1 ml'deki toplam hücre sayısı} = \frac{\text{tüm alanda bulunan hücre sayısı}}{\text{hücre sayısı}} \times \text{sulandırma oranı} \times 10,000$$



Şekil 3.3. EAT hücrelerinin ışık mikroskopunda 40'luk objektifle görünümü. **a:** Canlı EAT hücresi, **b:** Ölü EAT hücresi.

3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Gilaburu Toz Ekstraktlarının Enjekte Edilmesi

Stok fareler (dört fare) dışında çalışmada kullanılacak hayvanlar rastgele beş gruba ayrıldı. Her bir grup ayrı kafeslere konularak etiketlendi. Her bir gruba ait farelerin ağırlık değişimleri hassas terazi ile, karın çevreleri mezura ile çalışma başlangıcından bitimine kadar günlük olarak ölçülerek not edildi. Hayvanların genel durumu ile ilgili tüy örtüsü, halsizlik, ishal/kabızlık, travma, dehidrasyon gibi parametreler günlük olarak takip edilerek not alındı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Deneysel prosedürde kullanılan hayvanlar. **A:** Kafes içindeki farelerin genel görünümü **B:** Hava filtrasyonlu kapalı devre kafes sistemi, **C:** Farenin karın çevresi ölçümü **D:** Farenin ağırlık ölçümü

Deney sonunda anestezi (15mg/kg Xylazine, 50mg/kg Ketamin i.p. yolla enjekte edildi) altında hayvanların karın bölgeleri açılarak karın içi organların genel görünümü değerlendirildi ve histopatolojik inceleme için organlar alınarak tespit sıvısına konuldu. Genel anestezi altındaki hayvanlar servikal dislokasyon yapılarak sakrifiye edildi.

Deney Grupları:

Grup I (Negatif Kontrol grubu, n=8): Bu grupta bulunan toplam 8 fareye sadece enjeksiyon stresi amacıyla i.p. olarak 200 µL (0,2 ml) steril DPBS günlük olarak dokuz gün süre ile enjekte edildi. Bu gruptaki hayvanların tamamı dokuzuncu günde genel anestezi altında sakrifiye edildi.

Diğer gruplardaki farelere sıfırıncı gün 0,2 ml DPBS içinde 1×10^6 EAT hücresi i.p. olarak enjekte edildi.

Grup II (Pozitif Kontrol grubu, n=17): Bu gruptaki her bir fareye kanser hücrelerinin enjekte edilmesinden 24 saat sonra steril hale getirilmiş 200 µL DPBS i.p. olarak enjekte edildi. Hayvanlardan 10 tanesi kanser hücresi enjeksiyonunu takip eden dokuzuncu günde genel anestezi altında sakrifiye edilirken diğer yedi hayvanın yaşam süreleri takip edildi.

Grup III (5-FU Grubu, n=14): Bu grupta bulunan toplam 14 fareye 20 mg/kg bir kemoterapi ajanı olan 5-FU (5- Fluorouracil) günlük olarak 8 gün süre ile i.p. olarak enjekte edildi. 5-FU dozları güvenlik kabini (Nüve, Türkiye) içinde biyogüvenlik risklerine karşı önlem alınarak günlük olarak hazırlandı. Bu gruptaki hayvanlardan 10 tanesi kanser hücresi enjeksiyonunu takiben 9. gün genel anestezi altında sakrifiye edilirken diğer 4 hayvanın ise sekizinci günden sonra yaşam süreleri takip edildi.

Grup IV (Düşük moleküler ağırlığa sahip Gilaburu ekstraktı ile EAT grubu, n=17): Bu grupta bulunan toplam 17 fareye kanser hücrelerinin enjekte edilmesinden 24 saat sonra 200 µL DPBS tamponu içerisinde çözülüp steril hale getirilen 50 kDa altı gilaburu toz ekstraktları i.p. olarak enjekte edildi. Bu gruptaki hayvanlardan 10 tanesi kanser hücresi enjeksiyonunu takiben dokuzuncu gün genel anestezi altında sakrifiye edilirken diğer yedi hayvanın yaşam süreleri takip edildi.

Grup V (Yüksek moleküler ağırlığa sahip Gilaburu ekstraktı ile EAT grubu, n=17): Bu grupta bulunan toplam 17 fareye kanser hücrelerinin enjekte edilmesinden 24 saat sonra 200 µL DPBS tamponu içerisinde çözülüp steril hale getirilen 50 kDa üstü gilaburu toz ekstraktları i.p. olarak enjekte edildi. Bu gruptaki hayvanlardan 10 tanesi kanser hücresi enjeksiyonunu takiben dokuzuncu gün genel anestezi altında sakrifiye edilirken diğer 7 hayvanın yaşam süreleri takip edildi.

Tüm gruplardaki hayvanlar sakrifiye edilmeden önce periton boşluğundaki tüm sıvı insülin enjektörü yardımıyla çekildi ve santrifüj tüplerine aktarıldı. Bu sıvı 1000 rpm'de sabit açılı rotorda 5 dk santrifüj edildi. Supernatant ve çökelti kısımlarının miktarları ayrı ayrı not edildi ve çökelen kısmın hacmi “packed volume” olarak not edildi.

Sakrifiye edilen hayvanların karaciğer, böbrek, mide, testis, dalak ince ve kalın bağırsak dokuları alınarak distile su ile hazırlanmış %10'luk formaldehit çözeltilerinin bulunduğu örnek kaplarına her bir hayvan için ayrı kutular kullanılacak biçimde alındı ve kutular etiketlendi.

Negatif kontrol grubu hariç diğer gruplardan 7'ser (5-FU için 4) hayvan yaşam süresi bakılmak için ayrıldı. Bu hayvanlar normal diyet ile beslendi ve yaşamın sonlandığı günler not edilerek ortalama yaşam süresinde gruplar arasında bir farkın olup olmadığına bakıldı.

3.7. Histolojik Doku Takibi

Hayvanların sakrifiye edilmesini takiben alınan dokular %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Dokuların alınmasını takiben 3. gün, dokular çevre yağ dokulardan arındırılarak küçültüldü ve temiz formaldehit solüsyonuna alındı, sonrasında rutin histolojik takip aşamalarından (Tablo 3.1) geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü (Şekil 3.5). Parafin bloklama işleminden 24 saat sonra doku blokları oda sıcaklığından +4 °C'ye alındı. Kesit alma işlemlerinden bir gece öncesinden bloklar -20°C'de bekletildi. Kesit alma işlemi esnasında dondurucudan çıkarılan dokular işlem aralarında mikrotom yanında buz kasetleri üzerinde tutuldu, dokulardan beş µm'lik kesitler önceden temizlenmiş lamlara alındı. Her bir kesitin hangi gruptaki hangi hayvana ait olduğu ve hangi dokuya ait olduğu lamaların üzerine kurşun kalemle yazıldı.

Alınan tüm kesitlere Hematoksilen-Eozin boyama metodu uygulandı. Bu boyama metodu için uygulanan prosedürler Tablo 3.2’de belirtildi.



Şekil 3.5. Parafin bloklara gömülmüş dokular.

Tablo 3.1. Parafin Doku Takip Prosedürü

Solüsyon:	Süre:	
1-%10'luk Formaldehit	48 saat	(TESPİT)
2- Çeşme suyu	1 saat	(YIKAMA)
3-%50 Etil alkol	1 saat	
4-%70 Etil alkol	1 saat	
5- %90 Etil alkol	1 saat	
6- %96 Etil alkol	1 saat	(DEHİDRATASYON)
7- %96 Etil alkol-II	1 saat	
8- Absolut alkol -I	1 saat	
9- Absolut alkol -II	1 saat	
10- Ksilen	1 saat	(SAYDAMLAŞTIRMA)
11- Parafin içinde 57° C 'de	bir gece	(EMDİRME)
12-Parafin dolu bloklara gömme		

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Mikrotomdan alınan kesitler lam üzerinde bir gece etüvde 60 C’de bekletilir.

Solüsyon:	Süre:
1- Ksilen- I	10 dk
2- Ksilen- II	10 dk
3- Ksilen- III	10 dk
4- Absolut alkol –I	5 dk
5- Absolut alkol –II	5 dk
6- %96 Etil alkol	5 dk
7- %80 Etil alkol	5 dk
8- %70 Etil alkol	5 dk
9- %50 Etil alkol	5 dk
10- Akarsuda yıkama	5 dk
11- Hematoksilen	8 dk
12- Akarsuda yıkama	5 dk
13 -Eozin	6 dk
14- Akarsuda yıkama	5 dk
15- %50 Etil alkol	1dk
16- %70 Etil alkol	1 dk
17- %80 Etil alkol	1 dk
18- %96 Etil alkol	2 dk
19- Absolut alkol –I	3 dk
20- Absolut alkol –II	5dk
21- Ksilen- I	10 dk
22- Ksilen- II	10 dk
23- Ksilen- III	10dk
24- Entellan ve kapatma	

Dokuların histopatolojik değerlendirmeleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı’nda yapıldı.

Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatların histolojik değerlendirmesi için DP 72 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Japonya) kullanıldı. Hazırlanan preparatlarda dokuların parankim yapıları incelenerek görüntüler elde edildi.

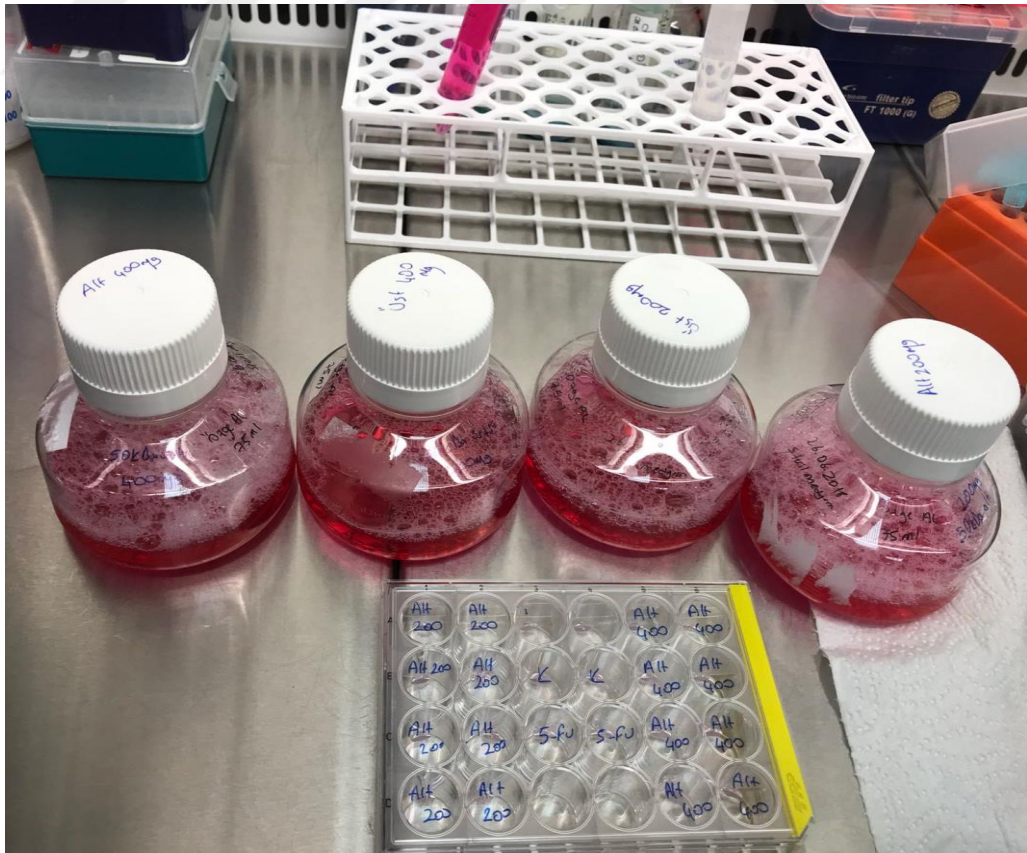
3.8. *In vitro* çalışma

In vitro çalışmaların yürütülmesi için gerekli standart besi yerleri biyogüvenlik kabininde hazırlandı. Bunun için %85 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %15 Fetal Bovine Serum (FBS) oranına göre hareket edildi ve her 100 ml'lik besi yeri için 1 ml penisilin-streptomisin kombinasyonu ortama ilave edildi. Besi yerini oluşturan tüm maddeler önce ayrı ayrı daha sonra da hep birlikte 0,45 ve 0,22 µm'lik enjektör ucu tek kullanımlık steril filtreden geçirilerek steril şişelere aktarıldı ve +4°C'de muhafaza edildi (Şekil 3.6). Hazırlanan steril besi yerleri azami bir hafta içinde kullanıldı. *In vitro* deney gruplarının belirlenmesinde daha önce yapılan ön çalışmalar dikkate alınarak 6 deney grubu oluşturuldu. Bunlardan ilki kontrol grubu, ikincisi 5 FU grubu, üçüncüsü 50 kDa altı 200 µg gilaburu grubu, dördüncüsü 50 kDa altı 400 µg gilaburu grubu, beşincisi 50 kDa üstü 200 µg gilaburu grubu ve altıncısı da 50 kDa üstü 400 µg gilaburu grubu olarak belirlendi. Belirlenen gruplar için gerekli ekstrakt tartımları kapalı kabin hassas terazide uygulama gününde taze olarak yapıldı. Annexin V analizi için gerekli olan %1'lik Fetal Bovine Serum, her bir ml FBS üzerine 99 ml steril DPBS eklenerek elde edildi. *In vitro* gilaburu dozlarının belirlenmesinde pilot çalışmanın sonuçları esas alındı. Yapılan pilot çalışmada EAT hücreleri üzerine 50,100,200,400 µg/ml dozlarında gilaburu toz ekstraktlarının etkileri 3, 24 ve 48 saat için ayrı ayrı tripan mavisi ile boyanma esasına göre Thoma lamında kontrol edildikten sonra 200 ve 400 µg/ml olarak iki etkili doz seçildi (107).

Kriyotüplerde bir ml'lik hacimler halinde dondurulan ve -80°C'de tutulan EAT hücreleri dondurucudan çıkartılarak 37°C'deki sıcak su banyosunda çözdürüldü. Vakit geçirilmeden bu hücre sıvısından 100 µl alınarak tripan mavisi ile boyanıp mikroskop altında canlı hücre yüzdesi tespit edildi. Steril enjektör yardımıyla donör farenin (stok fare) periton boşluğuna, EAT hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı enjekte edildi ve stok fare günlük olarak fotoğraflanarak ağırlık yönünden takip edildi. Beşinci günden itibaren stok farenin karın çevresinde belirgin bir şişlik gözlendi nitekim şişlik gün geçtikçe artarak enjeksiyonu takiben 12. günde karın boşluğundan sıvı alınmasına

uygun hale geldi. 12. günde stok hayvan kafesinden çıkartılarak uygun şekilde tutuldu. İç organlarının yaralanmaması amacı güdülerek başaşağı getirilen hayvanın periton boşluğuna steril bir enjektör yardımıyla girildikten sonra hayvan başı yukarı gelecek şekilde çevrildi ve yerçekimi avantajı da kullanılarak periton boşluğundaki assit sıvısı çekildi. Çekilen sıvı bir santrifüj tüpüne alınarak 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve atılan supernatant miktarı kadar steril besi yeri tüpe eklenerek yeniden santrifüj edildi. İkinci santrifüjün sonunda supernatant atılıp aynı miktarda steril besi yeri eklendikten sonra tüp vortekslendi ve vakit geçirilmeden Thoma lamı sayım formülüne göre canlı hücre sayısı belirlendi.

Gilaburu meyve suyunun 50 kDa üstü ve altı fraksiyonlarının EAT hücreleri üzerindeki *in vitro* etkisini belirlemek için 24 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Her bir kuyucuğa 1 ml besi yeri içinde 50.000 EAT hücresi konuldu. 3, 24 ve 48 saatlik kültür periyodu sonrası hücreler Annexin V, Mitopotential ve hücre döngüsü olmak üzere üç farklı analize tabi tutuldu.

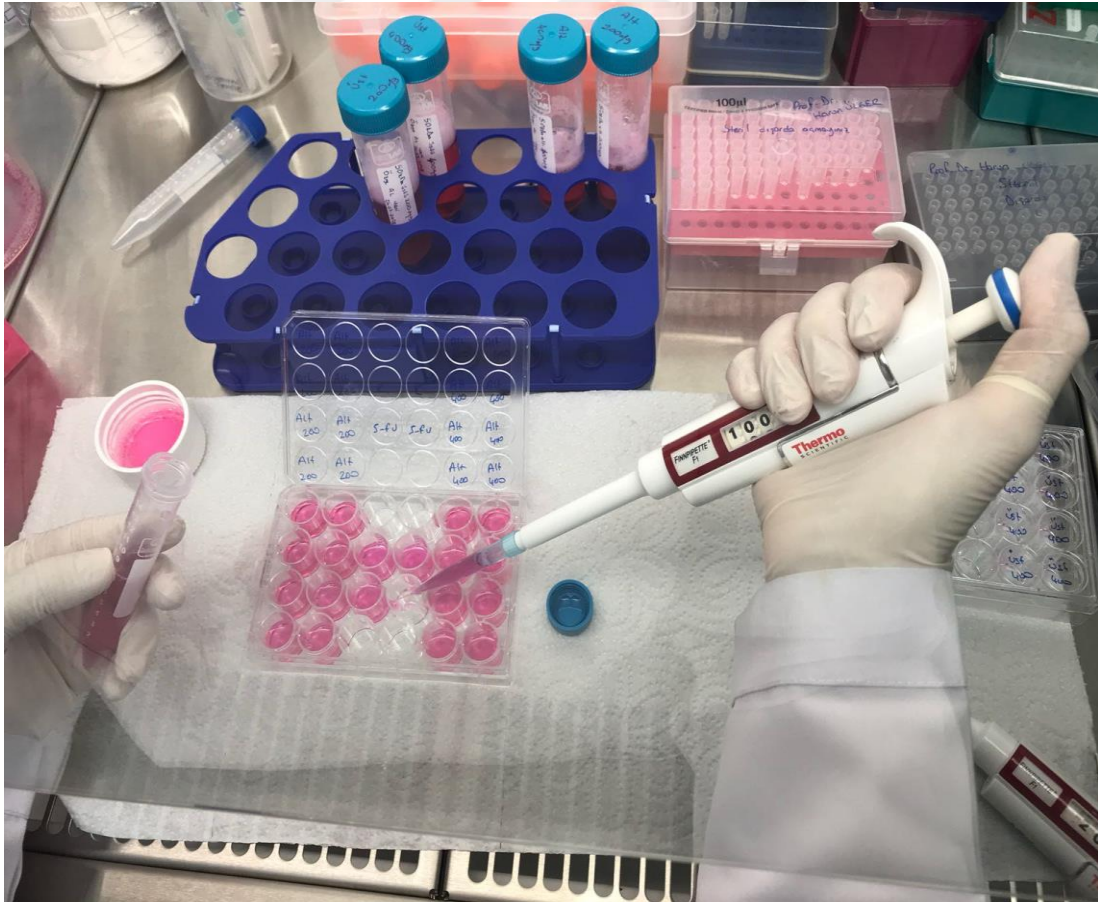


Şekil 3.6. Kendilerine ait şişelere konmuş besiyerleri ve üstü etiketlenmiş kültür kabı.

3.8.1. Annexin V ve Ölü Hücre Testi

Testin yapılabilmesi için Muse Cell Analyzer (Millipore, ABD) cihazı ve cihaza uyumlu Muse Annexin V ve Ölü Hücre kiti kullanıldı. Muse Annexin V ve Ölü hücre kiti, apoptotik hücrelerin dış membranındaki PS'yi saptamak için Annexin V kullandı. Bu test ile erken apoptotik fazdaki ve geç apoptotik fazdaki hücrelerin ve toplam apoptotik hücrelerin yüzdeleri belirlendi.

Deney 3, 24 ve 48 saatlik olmak üzere üç farklı periyodu kapsayacak şekilde planlandı. Hücrelerin kültüre edilmesi için 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık kültür kapları kullanıldı. Kültür kapları kapaklarının üst yüzlerine grupların isimleri asetatlı kalemle yazılarak hangi grubun nereye yerleştirileceği belirlendi. Her bir grup için sekiz kuyucuk ayrıldı. Her bir kuyucuğa içinde 50.000 EAT hücresi olan 1 ml steril besiyeri eklendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Güvenlik kabini altında steril kültür kaplarına hücre ve besiyeri eklenmesi.

Kontrol grubu için kuyucuklara standart besi yeri eklenirken 5-FU grubunda herbir kuyucuğa, içinde 15 µg 5-FU bulunan 1 ml besi yeri; 200 ve 400 µg gilaburu gruplarında da 200 ve 400 µg/ml gilaburu bulunacak şekilde ekimler yapıldı. Her bir kuyucuk ayrı tek kullanımlık steril pipet ucuyla pipetlenerek hücre ve besi yerinin karışması sağlandı. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra kültür kapları 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Bu esnada ekim yapılmış olan her bir kuyucuk için bir adet 1,5 ml'lik standart tüp gruplara göre etiketlendi.

Üç saat sonra inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının kuyucukları pipet ve steril pipet uçları vasıtasıyla kendilerine ait olan ependorf tüplerine aktarıldı. Bu esnada Annexin V ve ölü hücre kiti buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

Kuyucuklar boşaltılırken kültür kabı yaklaşık 45 derecelik bir açıyla tutuldu ve hücrelerin çökme ihtimaline karşı sıvı pipetlenerek alındı ve tüplere aktarıldı. Tüpler, sabit açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra tüplere birer ml steril DPBS eklendi. DPBS eklendikten sonra vortekslenen tüpler yeniden sabit açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki supernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerin herbirine 100 µl %1'lik Fetal Bovine Serum ve 100 µl Annexin V kit sıvısı eklendi. Tüpler vortekslendi ve 20 dk 24 °C'de karanlık ortamda inkübe edildi.

Bu bekleme süresinde Muse Cell Analyzer cihazın standart solüsyonlarla ön yıkaması yapılarak cihaz örnek okumaya hazır hale getirildi. Yirminci dakikanın sonunda tüpler birer birer cihazın örnek haznesine yerleştirilerek analiz yapıldı. Okuma işlemine kontrol grubundan başlandı ve ilk örnek okutulurken hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bölge cihazın ekranından tespit edilerek sonuçların bu bölgeden elde edilmesi sağlandı, sulandırma oranı seçildikten sonra diğer örneklerin okutulmasına devam edildi. Her bir grup bitiminde cihaza hızlı yıkama yaptırıldı. Tüm sonuçlar cihazın hafızasına kaydedildikten sonra taşınabilir disk yardımıyla alındı. Aynı işlemler 24 ve 48 saatlik periyotlar sonrasında da tekrarlandı ve sonuçlar kaydedildi.

3.8.2. Hücre Döngüsü Testi

Muse hücre döngüsü kiti, tüm hücre döngüsü fazlarındaki (G_0 / G_1 , S ve G_2 / M) hücre yüzdesini ayırt etmek ve ölçmek için DNA içeriğinin propidyum iyodür bazlı boyaması esasına göre kullanıldı.

Testin yapılabilmesi için Muse Cell Analyzer cihazı ve cihaza uyumlu Muse Cell Cycle kiti kullanıldı. Bu test ile, Muse Cell Analyzer'da hücre döngüsünün G_0 / G_1 , S ve G_2 / M fazlarındaki hücre yüzdesinin kolay ve hızlı kantitatif ölçümleri sağlandı. Deneye başlanmadan bir gün önce deney için gerekli olacak besi yerleri ve gerekli solüsyonlar hazırlandı. Test için gerekli olan %70'lik etil alkol, %100'lük absolüt alkol ve distile su ile; 70 ml alkol, 30 ml distile su oranına göre hazırlandıktan sonra ağzı kapalı bir şişede -20°C 'lik ortamda tutuldu.

Deney 3, 24 ve 48 saatlik olmak üzere üç farklı periyodu kapsayacak şekilde planlandı. Hücrelerin kültüre edilmesi için 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık kültür kapları kullanıldı. Kültür kaplarının kapaklarının üst yüzlerine grupların isimleri asetatlı kalemle yazılarak hangi grubun nereye yerleştirileceği belirlendi. Her bir grup için 8 kuyucuk ayrıldı. Her bir kuyucuğa 50.000 EAT hücresi konuldu. Bunun üzerine 1 ml besiyeri eklendi. Kontrol grubu için kuyucuklara standart besi yeri eklenirken 5-FU grubunda her bir kuyucuğa içinde 15 μg 5-FU bulunan 1 ml besi yeri; 200 ve 400 μg gilaburu gruplarında da her 1 ml besi yerinde 200 ve 400 μg gilaburu bulunacak şekilde ekimler yapıldı.

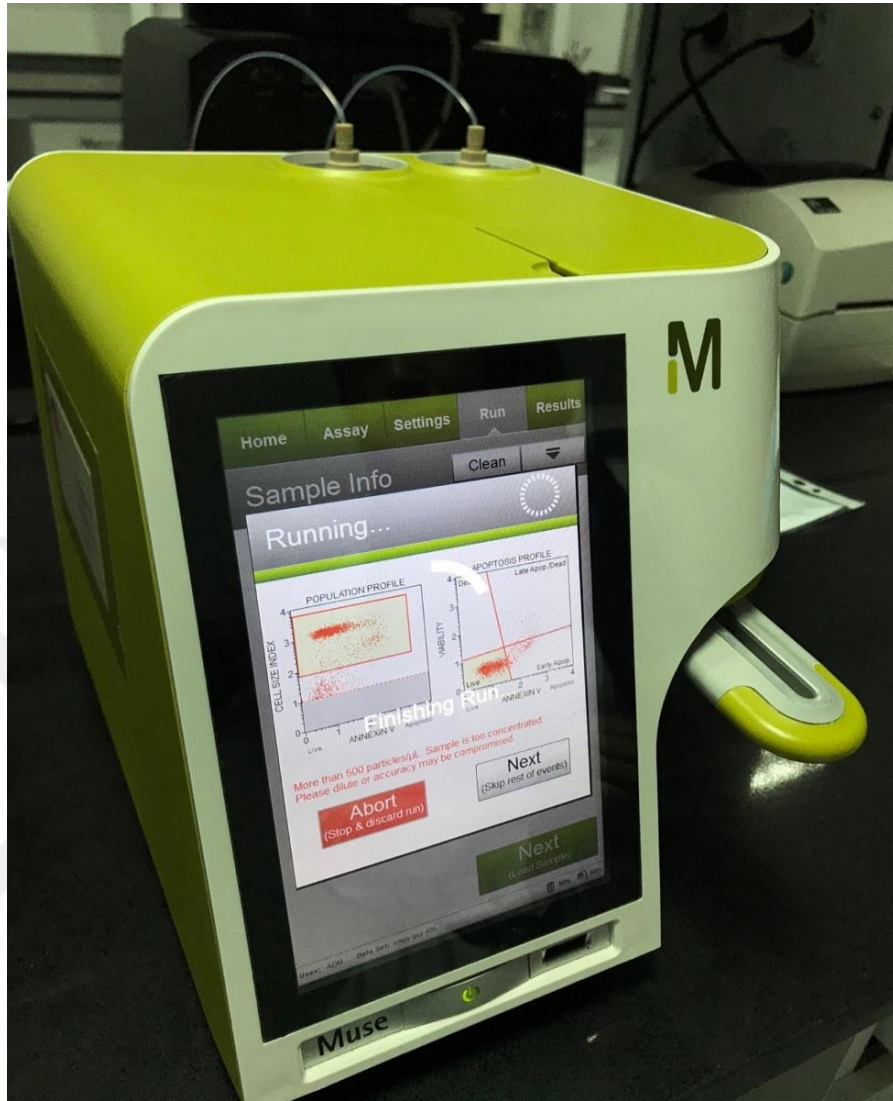
Her bir kuyucuk ayrı tek kullanımlık steril pipet ucuyla iyice pipetlenerek hücre ve besi yerinin karışması sağlandı. Belirtilen tüm işlemler güvenlik kabini içinde gerçekleştirildi. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra kültür kapları 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde bekletildi. Bu esnada ekim yapılmış olan her bir kuyucuk için bir adet 1,5 ml'lik standart ependorf tüpü gruplara göre etiketlendi. 3 saat sonra inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının kuyucukları pipet ve steril pipet uçları vasıtasıyla kendilerine ait olan ependorf tüplerine aktarıldı.

Kuyucuklar boşaltılırken kültür kabı yaklaşık 45 derecelik bir açıyla tutuldu ve hücrelerin çökme ihtimaline karşı sıvı pipetlenerek alındı ve etiketlenmiş tüplere aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra sabit açılı rotorda oda sıcaklığında 300

g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra tüplere birer ml steril DPBS eklendi. Tüpler DPBS eklendikten sonra 3-5 saniye orta hızda vortekslenerek yeniden sabit açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırılıp tüplerin her birine 50 µl DPBS eklendikten sonra düşük hızlı vortekse alındı ve karışmaya devam ederken içine -20°C'den çıkarılan 1 ml %70'lik etanol yavaşça eklendikten sonra tüplerin kapakları kapatılarak vortekslendi. Tüplerin hepsi bir spora dizilerek -20°C'de bir gece bekletildi.

Bir gecenin sonunda dondurucudan çıkarılan tüpler vortekslendikten sonra içlerinden 200'er µl işaretlenmiş yeni ependorf tüplerine alınarak kapakları kapatıldı ve sabit açılı rotorda 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra tüplerin her birine 250 µl DPBS eklendi ve tüpler 3-5 saniye vortekslendi. Daha sonra tüpler yeniden sabit açılı rotorda 300 g'de 5 dk santrifüj edildi, tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra tüplerin her birine 200 µl Muse hücre döngüsü kiti eklendi ve tüpler 3-5 saniye orta hızda vortekslendi. 30 dk oda sıcaklığında karanlık bir çekmecede bekletildi. Bu bekleme süresinde Muse Cell Analyzer cihazı açıldı ve cihazın standart solüsyonlarla ön yıkaması yapılarak cihaz örnek okumaya hazır hale getirildi.

Otuzuncu dakikanın sonunda tüpler birer birer cihazın örnek haznesine yerleştirilerek cihazın hücre döngüsü ile ilgili sonuçları okuması sağlandı. Okuma işlemine kontrol grubundan başlandı ve ilk örnek okutulurken hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bölge cihazın ekranından tespit edilerek analizin bu bölgeden yapılması sağlandı ve diğer örneklerin okutulmasına devam edildi (Şekil 3.8). Her bir grup bitiminde cihaza hızlı yıkama yaptırıldı. Tüm sonuçlar cihazın hafızasına kaydedildikten sonra taşınabilir disk yardımıyla alındı. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonrasında da aynı işlemler tekrarlandı ve sonuçlar kaydedildi. İşlemlerin sonrasında Muse Cell Analyzer cihazı gerekli yıkamalar yapıldıktan sonra kapatıldı.



Şekil 3.8. Muse Cell Analyzer cihazında sonuçların okunması.

3.8.3. Mitokondri Potansiyeli Testi

Mitokondriyel potansiyelde ve hüresel plazma membran geçirgenliğinde veya hücre ölümlerinde aynı anda ölçüm yapılmasına izin veren bu testin sonucunda; depolarize canlı, depolarize ölü, toplam depolarize, toplam canlı ve toplam ölü hücrelerin bir ml'deki yüzdelik konsantrasyonu elde edildi. Muse mitokondri potansiyeli testi, mitokondriyel zar potansiyelindeki değişiklikleri ve hücre ölümünün bir göstergesi olarak bir hücre belirteci olan 7-AAD'yi (7-Amino actinomycin) saptamak için bir katyonik, lipofilik boya olan Mito Potential dye'i kullandı.

Çalışmaya başlanmadan bir gün önce deney için gerekli olacak besi yerleri; deneyin yapılacağı gün, deney için gerekli olacak standart mitokondri potansiyeli solüsyonu

hazırlandı. Bu amaçla her bir tüp için 1 µl mitopotential dye ve 1999 µl mitopotential assay tampon sıvısı eklendi. Elde edilen bu solüsyon kullanım anına kadar oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edildi.

Deney 3, 24 ve 48 saatlik olmak üzere 3 farklı periyodu kapsayacak şekilde planlandı. Hücrelerin kültüre edilmesi için 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık kültür kapları kullanıldı. Kültür kaplarının kapaklarının üst yüzlerine grupların isimleri asetatlı kalemle yazılarak hangi grubun nereye yerleştirileceği belirlendi.

Her bir grup için 8 kuyucuk ayrıldı. Her bir kuyucuğa 200.000 EAT hücresi konuldu. Bunun üzerine 1 ml besi yeri eklendi. Kontrol grubu için kuyucuklara standart besi yeri eklenirken 5-FU grubunda her bir kuyucuğa içinde 15 µg 5-FU bulunan 1 ml besi yeri; 200 ve 400 µg gilaburu gruplarında da her bir ml besi yerinde 200 ve 400 µg gilaburu bulunacak şekilde ekimler yapıldı. Her bir kuyucuk ayrı tek kullanımlık steril pipet ucuyla iyice pipetlenerek hücre ve besi yerinin karışması sağlandı. Belirtilen tüm işlemler güvenlik kabini içinde gerçekleştirildi. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra kültür kapları 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Bu esnada ekim yapılmış olan her bir kuyucuk için bir adet 1,5 ml'lik standart ependorf tüpü gruplara göre etiketlendi.

3 saat sonra inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının kuyucukları pipet ve steril pipet uçları vasıtasıyla kendilerine ait olan ependorf tüplerine aktarıldı. Kuyucuklar boşaltılırken kültür kabı yaklaşık 45 derecelik bir açıyla tutuldu ve hücrelerin çökme ihtimaline karşı sıvı iyice pipetlenerek alındı. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra sabit açılı rotorda oda sıcaklığında sabit açılı rotorda 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra tüplere birer ml steril DPBS eklendi. Tüpler DPBS eklendikten sonra 3-5 saniye orta hızda vortekslendikten sonra yeniden sabit açılı rotorda oda sıcaklığında 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra tüplerin her birine 1 ml mitopotential assay tampon sıvısı eklendikten sonra tüpler vortekslendi ve her bir tüpten 100'er µl alınıp işaretlenmiş yeni ependorf tüplerine alınarak üzerlerine 95 µl önceden hazırlanmış standart mitokondri potansiyeli solüsyonu eklenerek kapakları kapatıldı. Tüpler yeniden vortekslenerek 37°C'de bulunan bir inkübatörde 20 dk bekletildi. Bu

bekleme süresinde Muse Cell Analyzer cihazı açıldı ve cihazın standart solüsyonlarla ön yıkaması yapılarak cihaz örnek okumaya hazır hale getirildi.

Yirminci dakikanın sonunda tüpler inkübatörden çıkarıldı, kapakları açılarak herbir tüpe 5µl 7-AAD belirteci eklendikten sonra tüplerin kapakları kapatıldı ve vortexlendi. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında karanlık ortamda 5 dk bekletildikten sonra cihazda okuma işlemine geçildi. Okuma işlemine kontrol grubundan başlandı ve ilk örnek okutulurken hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bölge cihazın ekranından tespit edilerek analizin bu bölgeden yapılması sağlandı ve diğer örneklerin okutulmasına devam edildi. Her bir grup bitiminde cihaza hızlı yıkama yaptırıldı. Tüm sonuçlar cihazın hafızasına kaydedildikten sonra taşınabilir disk yardımıyla alındı. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonrasında da aynı işlemler tekrarlandı ve sonuçlar kaydedildi. İşlemlerin sonrasında Muse Cell Analyzer cihazı gerekli yıkamalar yapıldıktan sonra kapatıldı.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk histogram, q-q grafikleriyle değerlendirildi. Verilerin varyanslarının homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. İki den fazla grup karşılaştırılmalarında nicel değişkenler için tek yönlü varyans analizi (Anova) kullanıldı. *In vivo* parametrelerin zamana göre değişimi tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile incelendi. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı. *In vitro* testlerde gruplar arasında parametrelerin istatistiksel karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi, saate göre değişim tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile değerlendirildi. Veriler ortalama ile standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin analizi TURCOSA (Turcosa Analytics Ltd Co, Turkey, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımında gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi

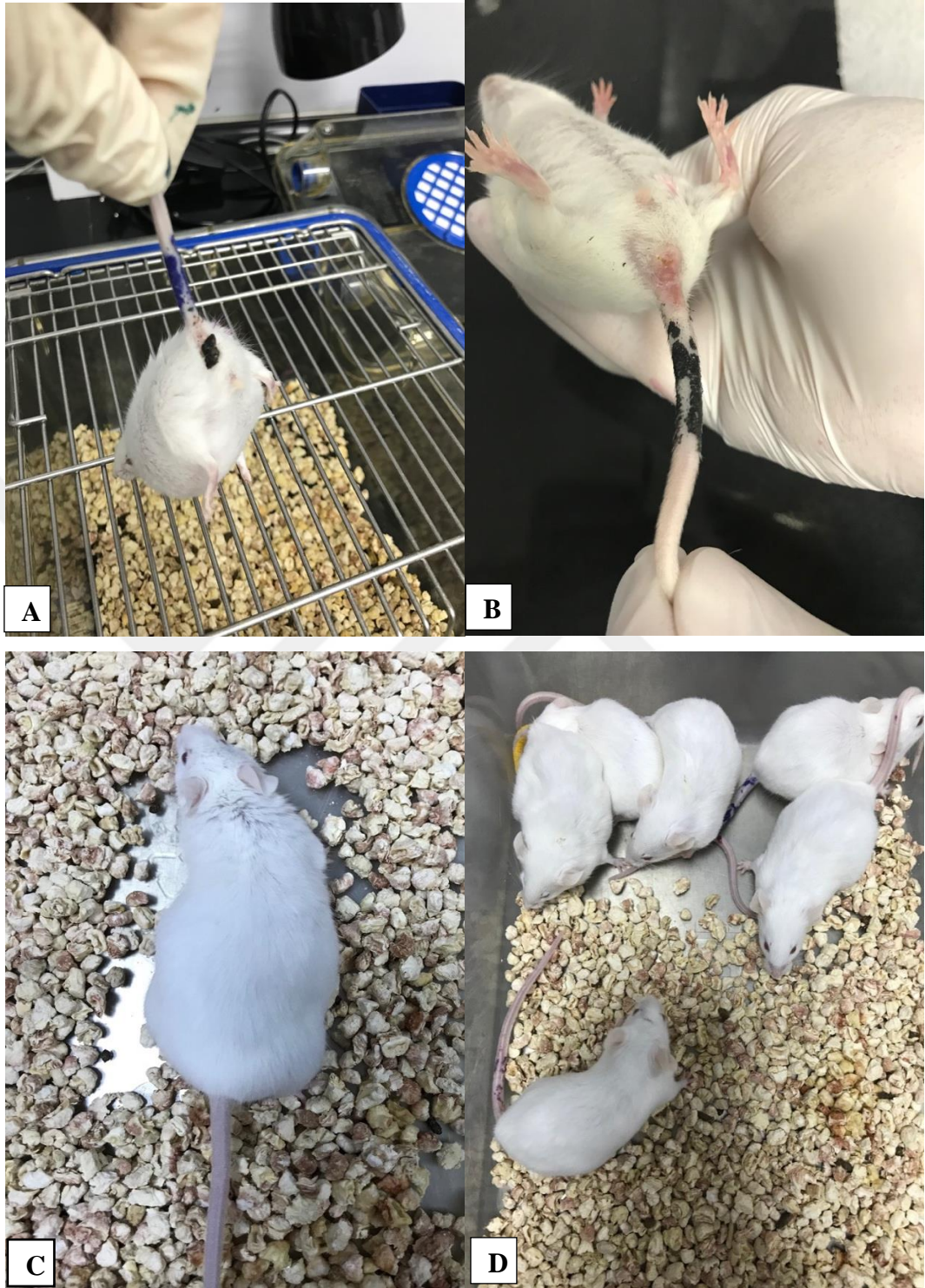
4. BULGULAR

4.1. *In Vivo* Bulgular

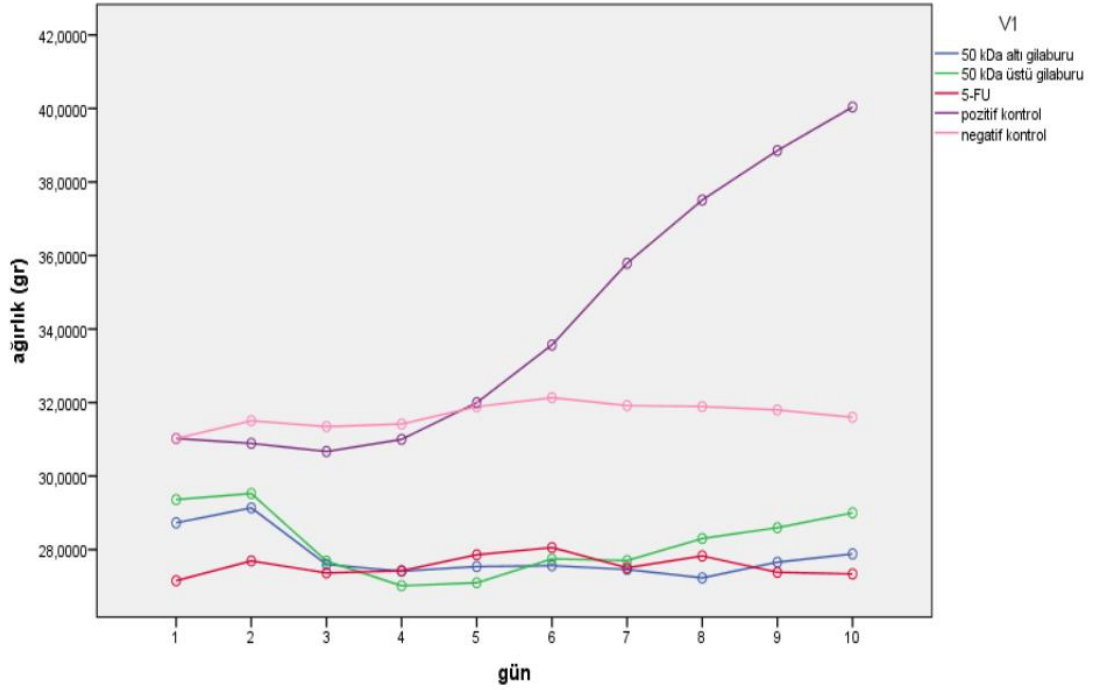
4.1.1. Morfolojik Bulgular

Deney süresince hayvanların fiziksel özelliklerinin iyi olduğu, vücutlarında herhangi bir travma izi olmadığı görüldü. Anal bölgede ya da gözde patolojiye rastlanmadı (Şekil 4.1.A). 50 kDa altı gilaburu grubundaki bir hayvanda deneyin dördüncü gününde iki gün süren katı dışkılama görüldü (Şekil 4.1.B). Deney süresince acıya bağlı kamburluk not edilmedi (Şekil 4.1.C). Buna karşılık altıncı günden itibaren kanser hücresi verilen tüm hayvanların tüy durumlarının bozulmaya başladığı not edildi (Şekil 4.1.D). Hayvanlarda deney gruplarındaki hayvanların ağırlık değişimleri incelendiğinde sadece pozitif kontrol grubundaki hayvanların deney süresince oluşan ağırlık artışının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.2, Tablo 4.1).

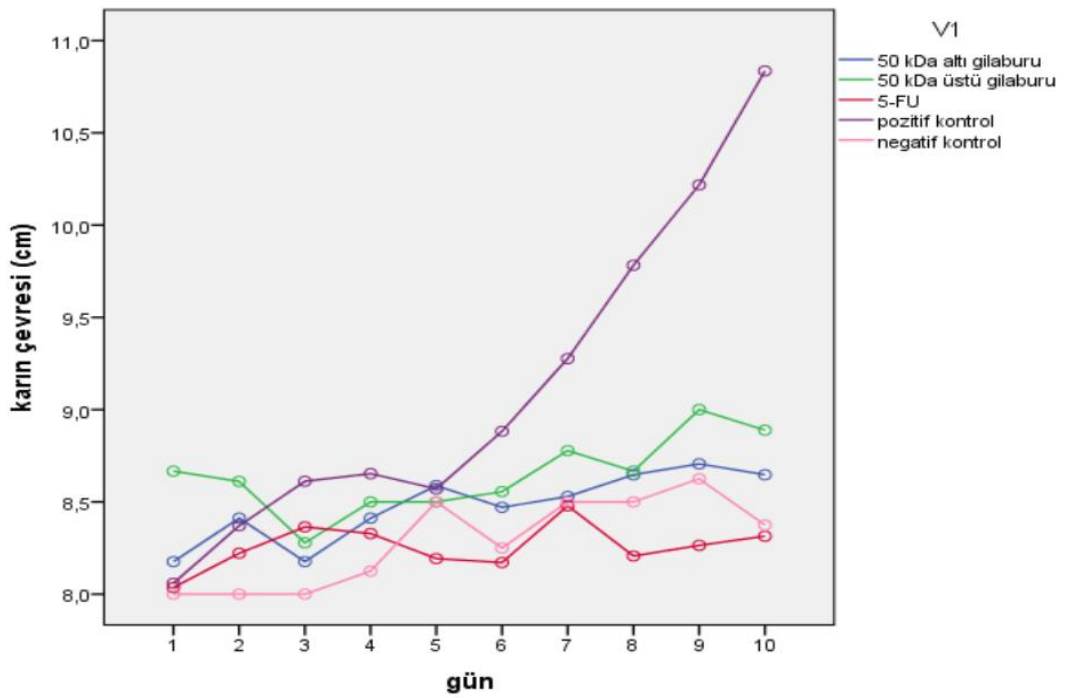
Hayvanların karın çevreleri ölçümleri incelendiğinde ise yine pozitif kontrol grubundaki hayvanların karın çevresi artışı altıncı günden itibaren diğer gruplardaki hayvanların karın çevresi değişimlerine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu (Şekil 4.3, Tablo 4.2).



Şekil 4.1. Hayvanların deney sürecindeki morfolojik özellikleri. **A-** Hayvanın anal bölgesi ve katı dışkılama, **B-** 4. günde katı dışkılama görülen hayvanın anal bölgesi. **C-**EAT hücresi verilmiş bir hayvanın genel görünümü. **D-** Enjeksiyon sonrası tüm hayvanlarda gözlenen hafif tüy değişimi.



Şekil 4.2. Günlere göre hayvanların ağırlık değişimleri



Şekil 4.3. Günlere göre hayvanların karın çevresi değişimleri

Tablo 4.1. Günlere göre gruptaki hayvanların ağırlık ortalamaları

Gruplar	0. gün (ort±sd)	1. gün (ort±sd)	2. gün (ort±sd)	3. gün (ort±sd)	4. gün (ort±sd)	5. gün (ort±sd)	6. gün (ort±sd)	7. gün (ort±sd)	8. gün (ort±sd)	9. gün (ort±sd)
Negatif Kontrol	31,02± 1,14	31,5±1,17	31,34±1,32	31,41±1,40	31,88±1,19	32,13±1,09	31,91±1,33	31,89±1,14	31,80±1,25	31,59±1,46 ^a
Pozitif kontrol	31,02± 2,25	30,88±2,76	30,66±2,65	30,99±2,64	31,99±2,63	33,56±3,80	35,78±4,89	37,51±4,92	38,85±5,61	40,04±5,71 ^b
5-FU	27,15± 3,83	27,69±4,17	27,36±4,08	27,42±3,97	27,85±4,06	28,05±4,35	27,5±4,16	27,82±4,25	27,38±4,20	27,33±4,16 ^a
50 kDa altı gilaburu	28,72± 2,67	29,13±2,64	27,59±2,35	27,41±2,54	27,53±2,62	27,56±2,82	27,45±2,63	27,22±3,32	27,65±3,70	27,88±3,96 ^a
50 kDa üstü gilaburu	29,35± 3,33	29,52±3,35	27,68±3,41	27,01±3,56	27,09±3,69	27,74±3,70	27,70±3,80	28,30±3,75	28,59±3,75	29,00±3,68 ^a

Gruplar arası p değeri

p<0,001

Tablo 4.2. Günlere göre gruptaki hayvanların karın çevresi ortalamaları

Gruplar	0. gün (ort±sd)	1. gün (ort±sd)	2. gün (ort±sd)	3. gün (ort±sd)	4. gün (ort±sd)	5. gün (ort±sd)	6. gün (ort±sd)	7. gün (ort±sd)	8. gün (ort±sd)	9. gün (ort±sd)
Negatif Kontrol	8±0	8±0	8±0	8,12±0,35	8,50±0,53	8,25±0,46	8,50±0,53	8,50±0,53	8,62±0,74	8,37±0,51 ^a
Pozitif kontrol	8,05±0,21	8,37±0,40	8,61±0,42	8,65±0,41	8,57±0,52	8,88±0,45	9,27±0,55	9,78±0,46	10,21±0,80	10,83±0,86 ^b
5-FU	8,03±0,56	8,22±0,53	8,36±0,44	8,32±0,59	8,19±0,56	8,17±0,58	8,47±0,50	8,20±0,54	8,26±0,56	8,31±0,72 ^a
50 kDa altı gilaburu	8,17±0,39	8,41±0,50	8,17±0,39	8,41±0,61	8,58±0,50	8,47±0,51	8,52±0,51	8,64±0,49	8,70±0,58	8,64±0,60 ^a
50 kDa üstü gilaburu	8,66±0,48	8,61±0,69	8,27±0,57	8,50±0,51	8,50±0,53	8,55±0,51	8,77±0,54	8,66±0,48	9,00±0,68	8,88±0,58 ^a

Gruplar arası p değeri

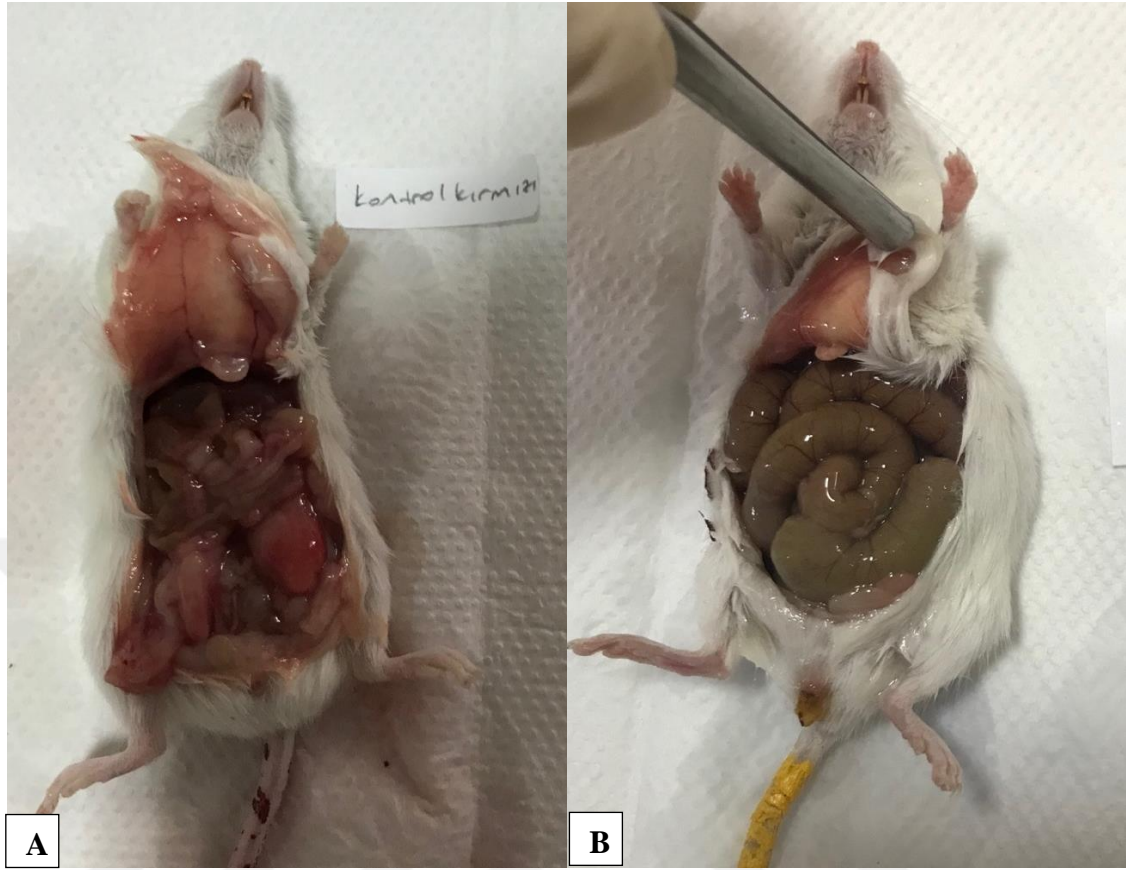
p<0,001

4.1.2. Hayvanların karın boşluğundaki sıvı miktarı ve hücre sayısı

Tüm gruplardaki hayvanların karın boşluğu açıldığında negatif kontrol ve 5-FU gruplarındaki hayvanların karın boşluğunda assit sıvısı gözlenmezken, pozitif kontrol grubundaki hayvanların tamamından, 50 kDa altı gilaburu verilen bir hayvandan ve 50 kDa üstü hayvanların dördünden assit sıvısı toplanabildi. Pozitif kontrol grubundaki hayvanların karın boşluğundan toplanan assit sıvısı miktarının 2,5 ml ile 8,1 ml arasında olduğu (ort: 4,88), bu miktarın 50 kDa altı gilaburu grubundaki bir hayvanda 1,1 ml; 50 kDa üstü gilaburu grubundaki dört hayvanda ise 0,5 ml ile 1 ml arasında olduğu (ort: 0,7 ml) gözlemlendi. Elde edilen bu sıvılardaki toplam EAT hücreleri sayıldığında pozitif kontrol grubundaki hücre sayısının 52×10^6 ile 160×10^6 arasında olduğu (ort: 119×10^6), 50 kDa üstü hayvan için bu sayının 11×10^6 ; 50 kDa üstü gilaburu grubundaki hayvanlar için ise 8×10^6 ile 22×10^6 arasında olduğu (ort: 13×10^6) not edildi. Paket hacim için gruplar değerlendirildiğinde pozitif kontrol grubundaki hayvanların assit sıvısının paket hacminin 0,5 ml ile 2,6 ml arasında olduğu (ort: 1,60), bu miktarın 50 kDa altı gilaburu grubundaki hayvanda 0,1 ml olduğu ve 50 kDa üstü gilaburu grubundaki hayvanlarda 0,05 ml ile 0,2 ml arasında olduğu (ort: 0,1 ml) kaydedildi. Toplam sıvı hacmi, paket hacim (packed volume) ve toplam hücre sayısının pozitif kontrol grubunda en fazla olduğu, 50 kDa üstü gilaburu grubunda ise 50 kDa altı gilaburu grubuna göre daha düşük olduğu not edildi. Elde edilen değerler istatistiksel inceleme için gerekli “n” sayısına ulaşamadığı için veriler istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

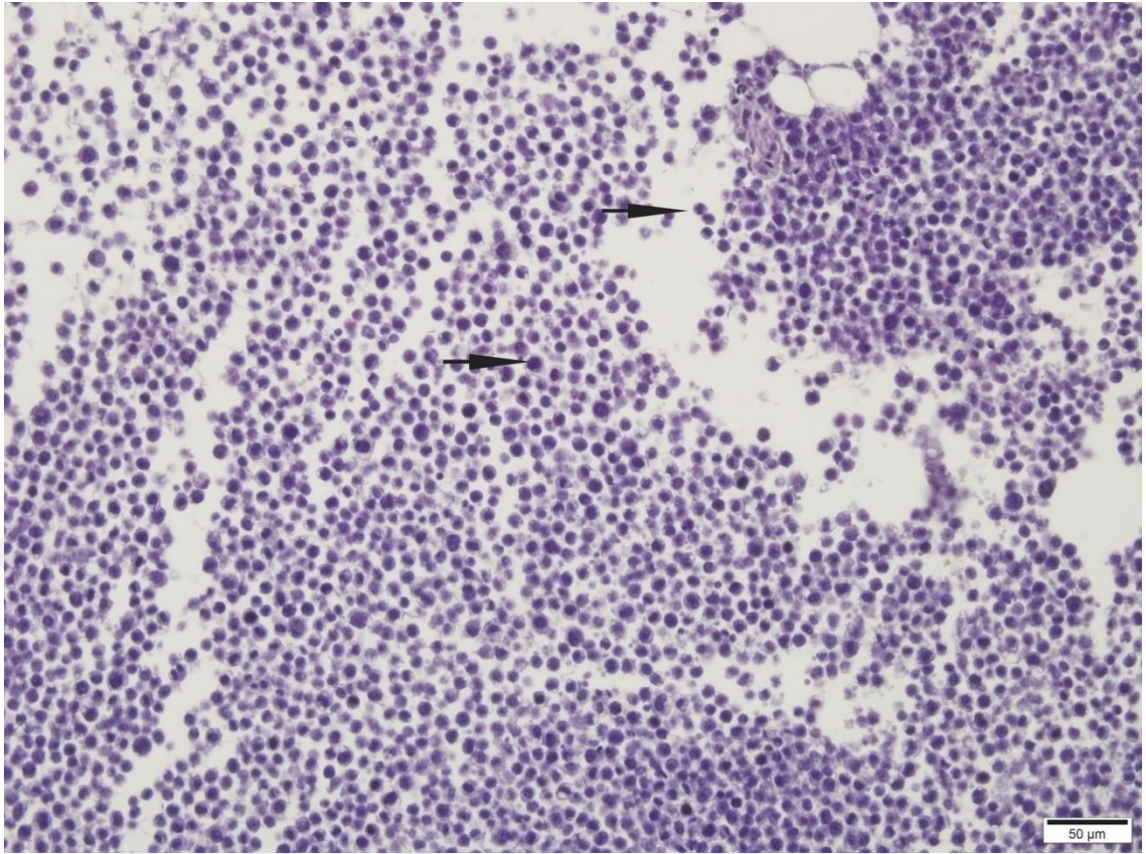
4.1.3. Dokuların histopatolojik incelenmesi

Deney sonunda (9. gün) tüm hayvanların genel anestezi altında karın boşlukları cerrahi girişimle açılıp organlar morfolojik olarak incelendiğinde negatif kontrol ve 5-FU grubundaki hayvanların organlarının morfolojik olarak normal görünmesine karşılık pozitif kontrol grubundaki hayvanların tamamında, gilaburu gruplarındaki hayvanların birkaçında özellikle bağırsaklarda olmak üzere karın içi organlarda yoğun yapışıklıklar gözlemlendi (Şekil 4.4.A.). 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların birkaç tanesinde bağırsakların yoğun bir şekilde ödemli olduğu tespit edildi (Şekil 4.4.B).



Şekil 4.4. **A.** Pozitif kontrol grubuna ait karın içi organları yapışmış hayvan. **B.** 50 kDa altı gilaburu verilmiş bağırsakları ödemli hayvan.

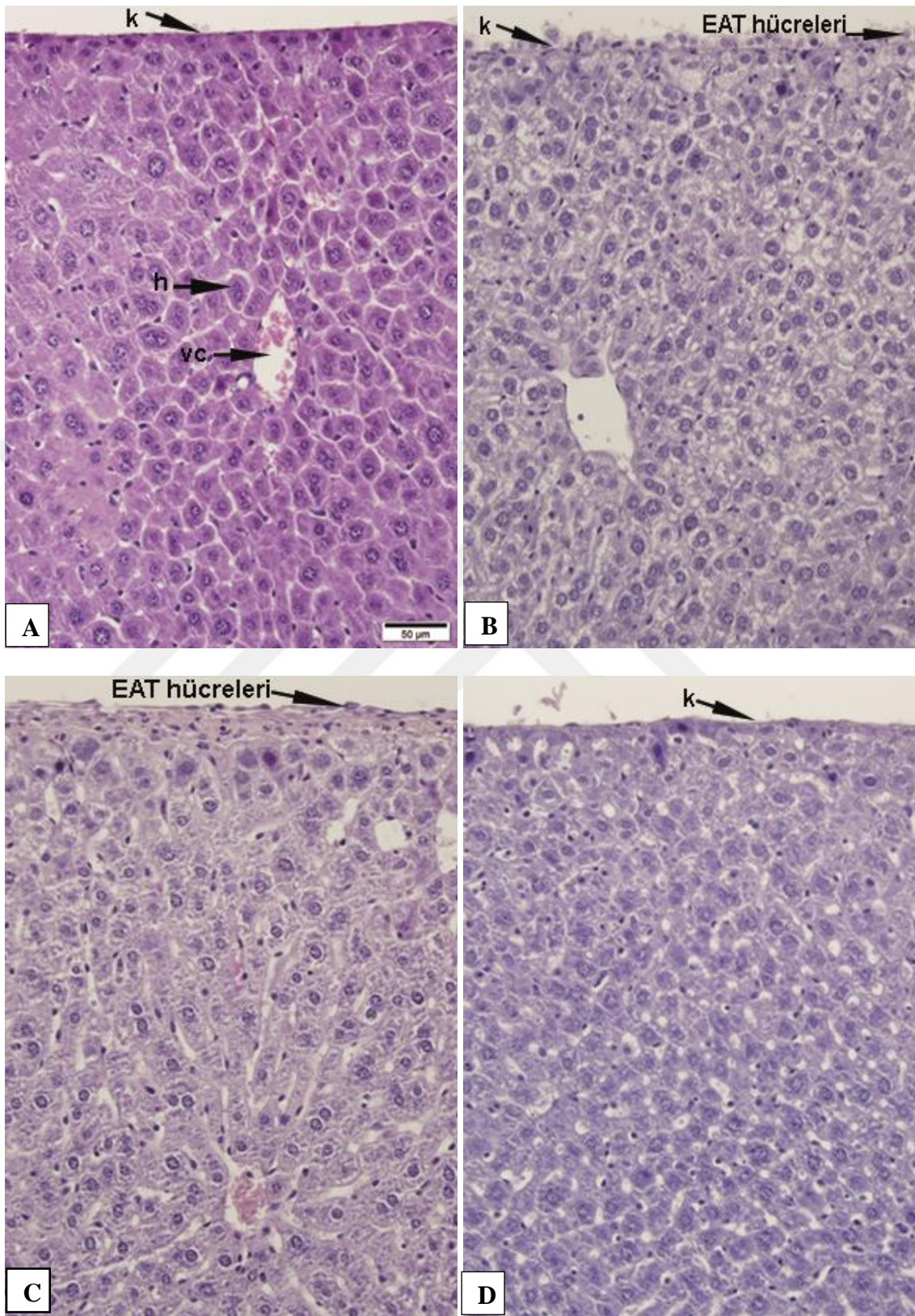
Hayvanların karın içi organlarından alınan dokuların kesitleri histopatolojik yönden değerlendirildiğinde negatif kontrol ve 5-FU grubundaki hayvanlardan alınan dokular normal histolojik özelliklere sahip iken, pozitif kontrol ve 50 kDa altı gilaburu gruplarındaki hayvanlara ait dokularda doku kapsülünde ve bağ dokusu üzerinde dağınık halde EAT hücre toplulukları gözlemlendi. Pozitif kontrol ve gilaburu gruplarındaki bazı hayvanların karın boşluğunda sıvı tümöre ilaveten gelişmiş olan katı tümör parçaları histolojik takip işlemlerinden geçirildikten sonra alınan mikroskop görüntüleri EAT hücrelerini histopatolojik olarak tanımlamak için kullanıldı. Bu kesitlerde EAT hücreleri farklı büyüklük ve şekilde iri hiperkromatik çekirdekli ve eozinofilik sitoplazmalı olarak görüldü (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. EAT hücrelerinin histopatolojik görünümü. Ok işaretleri farklı büyüklüklerdeki EAT hücrelerini göstermektedir (H&E 20X).

4.1.3.1. Karaciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme

Yapılan değerlendirmeler neticesinde negatif kontrol grubu (sağlıklı hayvanlar), 5-FU grubu ve 50 kDa üstü gilaburu grubuna ait hayvanların karaciğer parankim dokularının normal histolojik özelliklerde olduğu görüldü. Vena centralis etrafında ışınal tarzda dizili hepatositlerin (karaciğer hücresi) yer aldığı ve sinuzoidlerin normal yapıda olduğu not edildi. Pozitif kontrol grubuna ait hayvanların karaciğerlerini saran periton etrafında çok sayıda EAT hücresi görülürken 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların karaciğerlerini saran peritonun dışında pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Karaciğer dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kD altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organın kapsülü, **h-**hepatosit, **vc-** vena centralis.

4.1.3.2. Dalak dokusunda histopatolojik değerlendirme

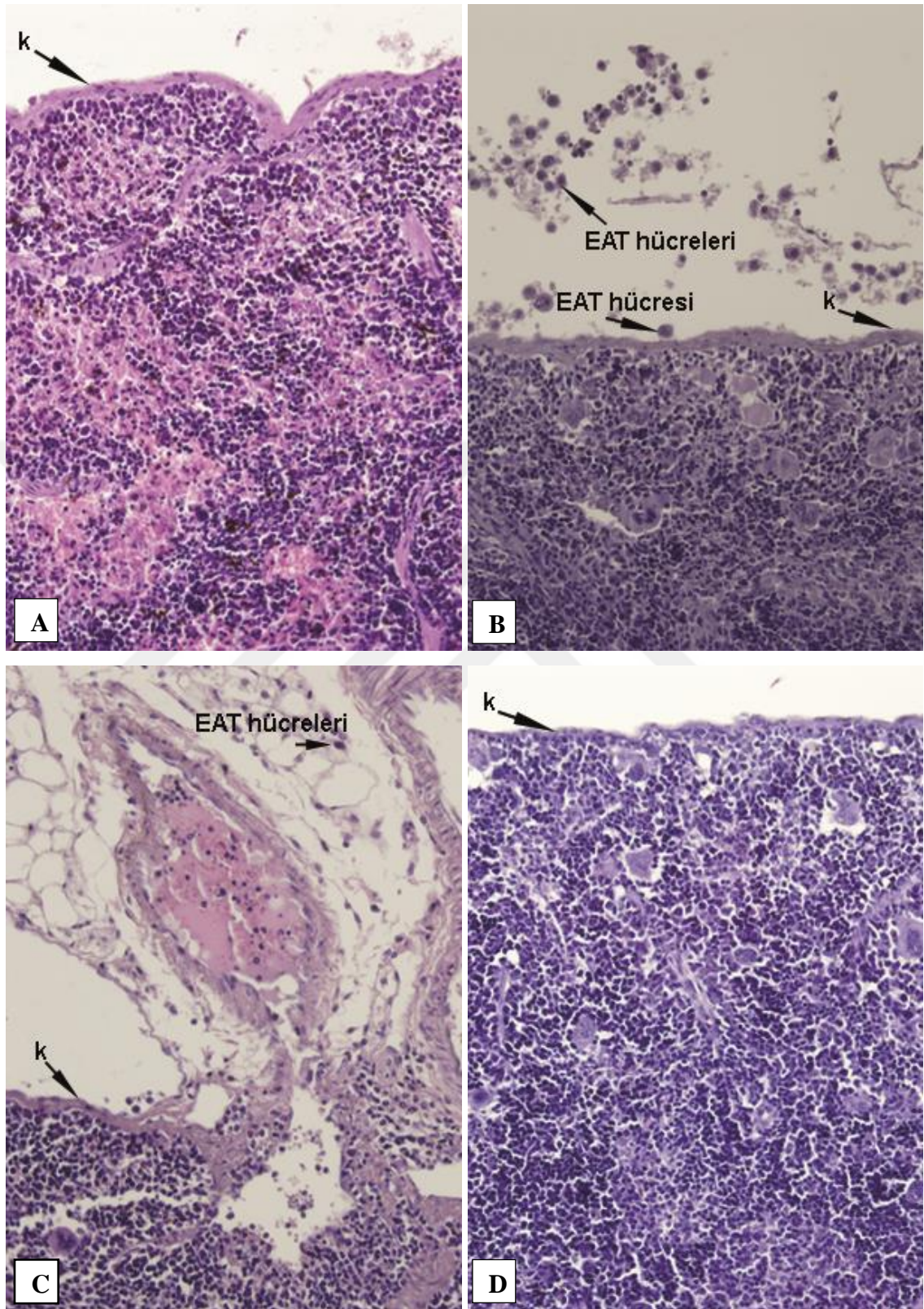
Negatif kontrol grubundaki hayvanların dalak dokularının normal histolojik özelliklerde olduğu görüldü. Pozitif kontrol grubuna ait hayvanların, 5-FU grubundaki hayvanların ve 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların dalak kapsülü etrafında yağ dokusu içinde çok sayıda EAT hücresi görülürken 50 kDa üstü gilaburu verilen hayvanların dalak kapsülü etrafında pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.7.).

4.1.3.3. Böbrek dokusunda histopatolojik değerlendirme

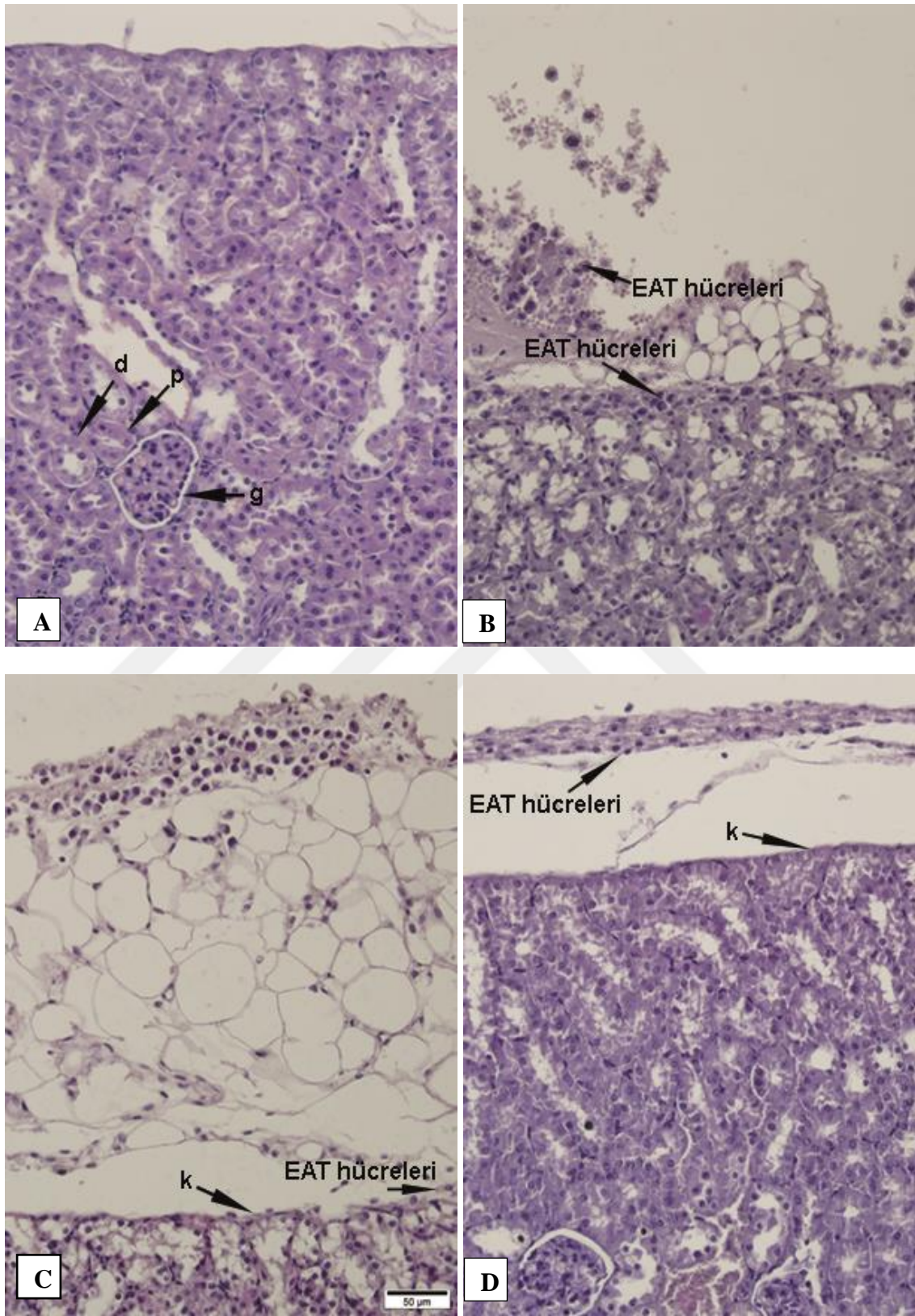
Karaciğer ve dalak dokularına benzer şekilde negatif kontrol grubundaki hayvanlar ile 5-FU grubundaki hayvanların böbrek dokularının normal histolojik özelliklerde olduğu görüldü. Proksimal ve distal tübüllerin, böbrek cisimciklerinin normal görünümde olduğu tespit edildi. Pozitif kontrol grubuna ait hayvanların böbreklerini çevreleyen periton etrafında yağ dokusu içinde çok sayıda EAT hücresi görülürken 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların böbrek dokusu üzerinde pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu; 50 kDa üstü gilaburu verilen hayvanların böbrek peritonun dışında ise 50 kDa altı gilaburu grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu belirlendi (Şekil 4.8.).

4.1.3.4. Testis dokusunda histopatolojik değerlendirme

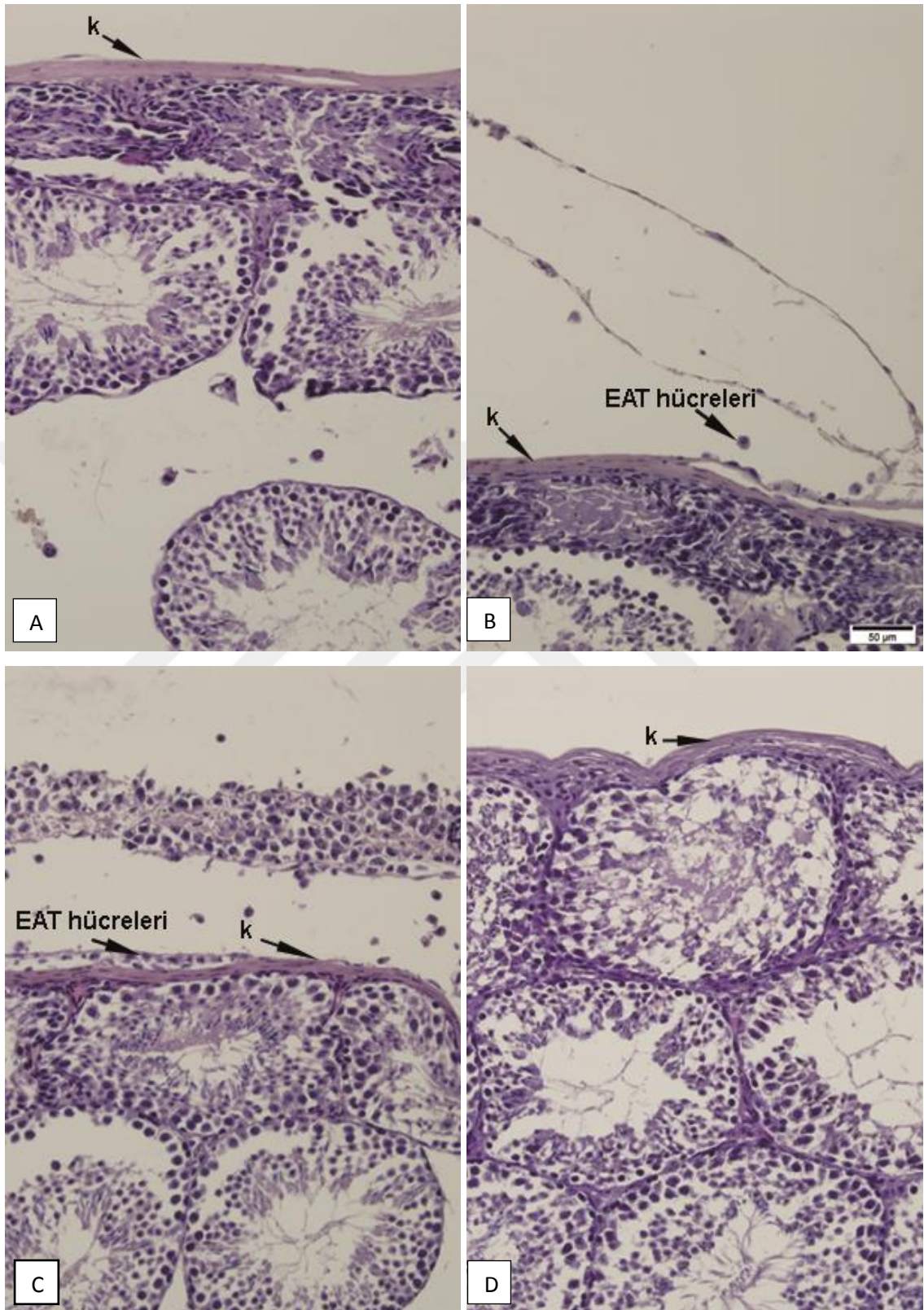
Negatif kontrol grubundaki hayvanların ve 5-FU grubundaki hayvanların testis dokularının benzer histolojik özelliklerde olduğu görüldü. Pozitif kontrol grubuna ait hayvanların ve 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların testislerini saran kapsül etrafında yağ dokusu içinde çok sayıda EAT hücresi görülürken 50 kDa üstü gilaburu verilen hayvanların testis kapsüllerinin dışında pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.9.).



Şekil 4.7. Dalak dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organın kapsülünü göstermektedir.



Şekil 4.8. Böbrek dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-** organ kapsülü, **d-**distal tübül, **p-**proksimal tübül, **g-**corpusculum renale



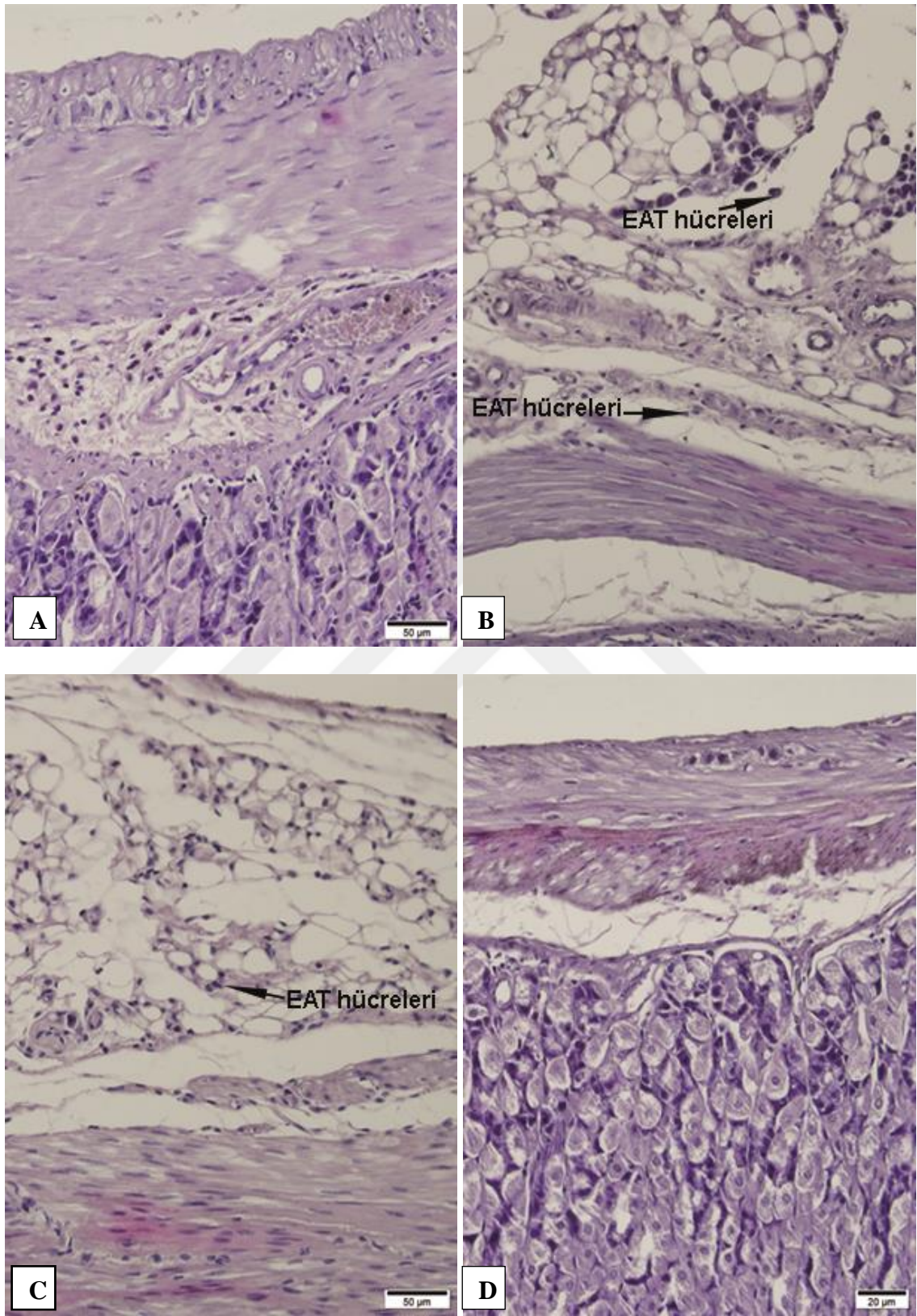
Şekil 4.9. Testis dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu. **k-**organ kapsülünü göstermektedir.

4.1.3.5. Mide Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme

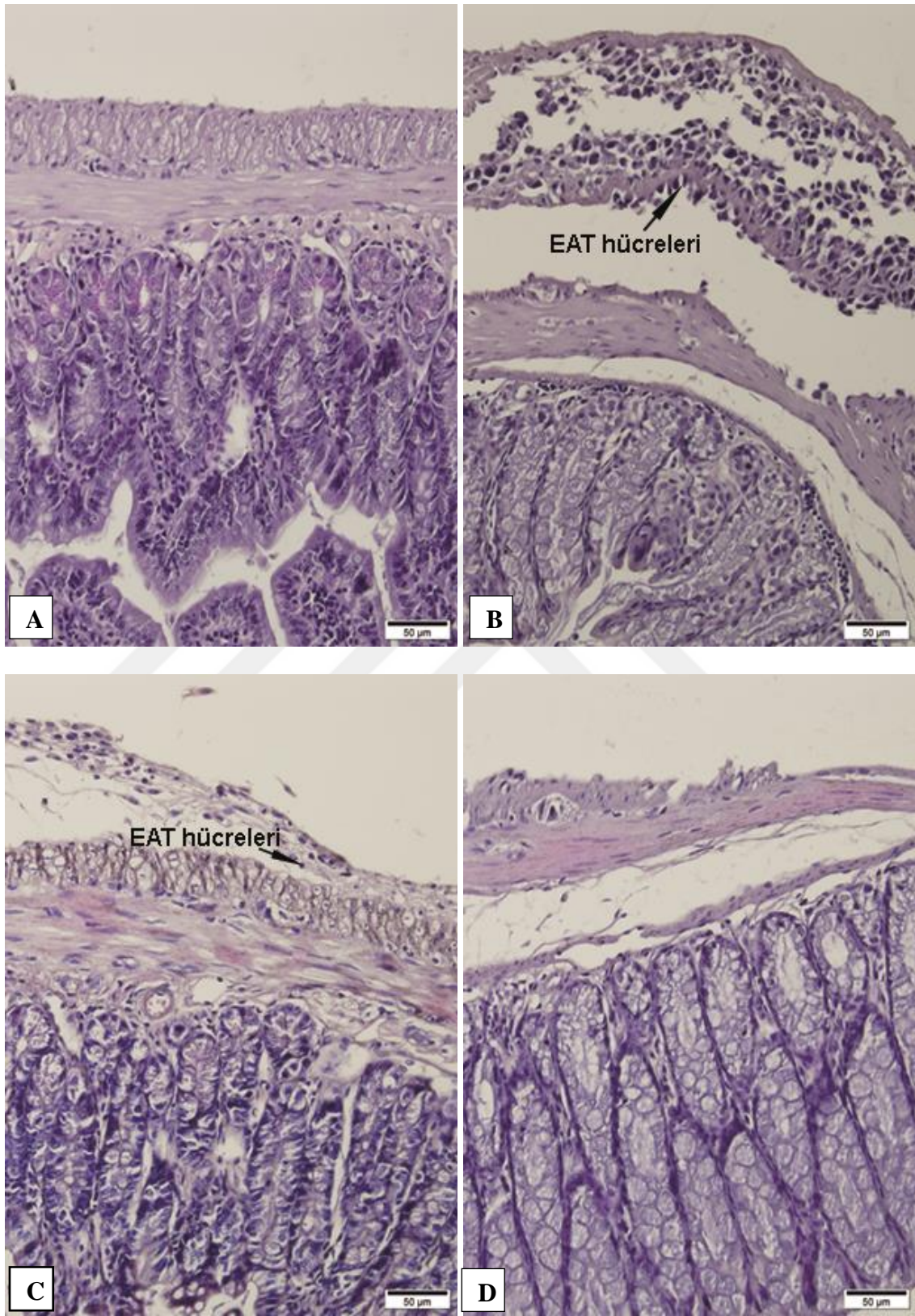
Negatif kontrol grubundaki hayvanlarla 5-FU grubundaki hayvanların mide kesit görüntülerinin benzer histolojik özelliklerde olduğu, tunica muscularis'in içten dışa oblik, sirküler ve longitudinal seyreden üç tabakalı düz kas liflerinden oluştuğu görüldü. Pozitif kontrol grubuna ait hayvanların ve 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların midelerinin çevreleyen tunica serosa tabakasında çok sayıda EAT hücresi görülürken 50 kDa üstü gilaburu verilen hayvanların mide tunica serosa'sında pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.10.).

4.1.3.6. İnce ve Kalın Bağırsak Dokusunda Histopatolojik Değerlendirme

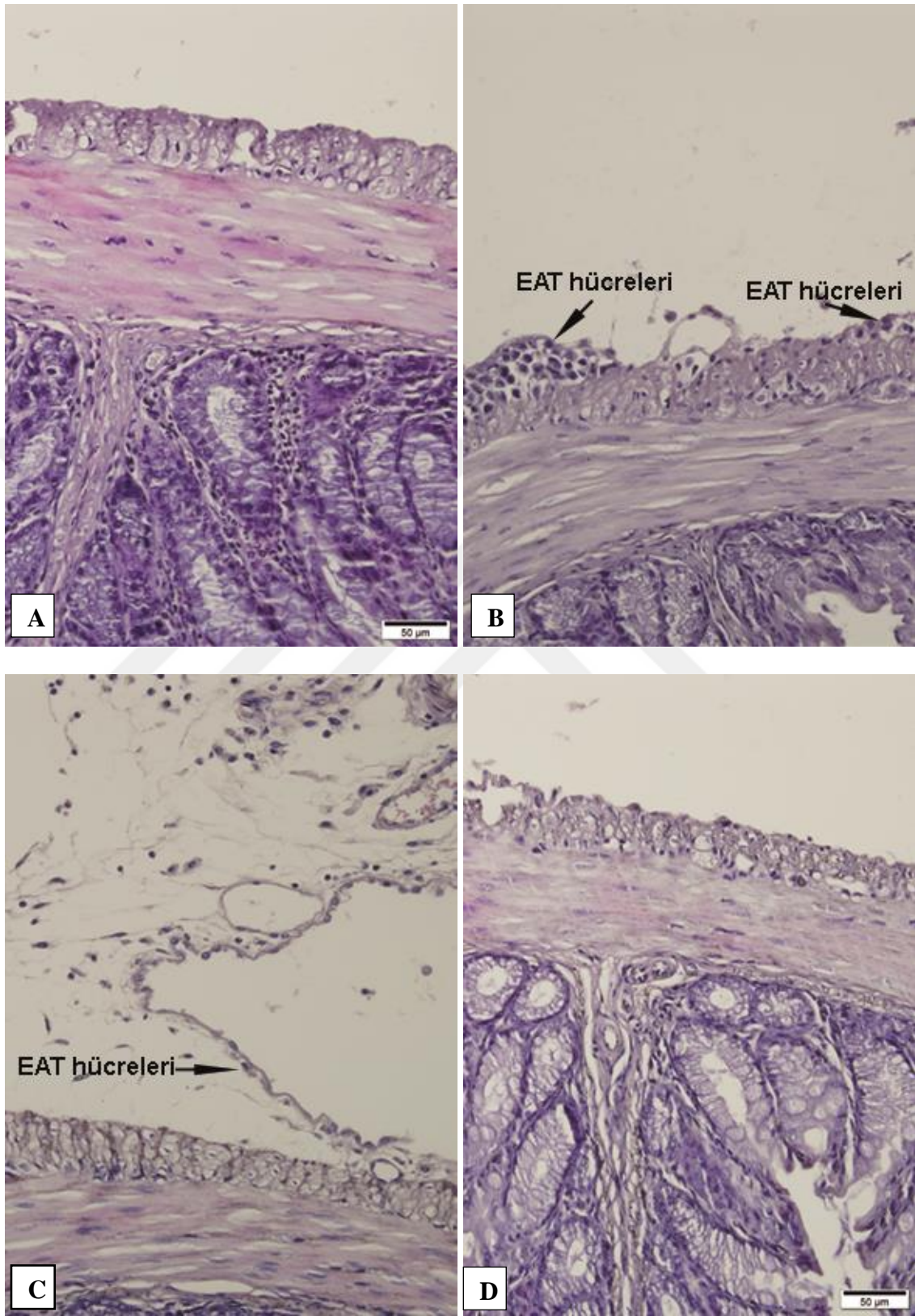
Midede olduğu gibi negatif kontrol grubundaki hayvanların ve 5-FU grubundaki hayvanların ince ve kalın bağırsak dokularının benzer histolojik özelliklerde olduğu görüldü. Pozitif kontrol grubuna ait hayvanların ve 50 kDa altı gilaburu verilen hayvanların ince ve kalın bağırsaklarının tunica serosa tabakası etrafında ve yer yer de tunica muscularis tabakasında çok sayıda EAT hücresi görülürken 50 kDa üstü gilaburu verilen hayvanların ince ve kalın bağırsaklarında pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda EAT hücresi bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.11 ve 4.12.).



Şekil 4.10. Mide dokusuna ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu.



Şekil 4.11. İnce bağırsağa ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu.



Şekil 4.12. Kalın bağırsağa ait görüntüler (H&E 20X). **A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 50 kDa altı gilaburu grubu ve **D:** 50 kDa üstü gilaburu grubu.

4.1.4. Hayvanların yaşam süresinin değerlendirilmesi

Deneysel prosedür sonunda (9. günden sonra) yaşam süresini ölçmek için kendi haline bırakılan hayvanlardan pozitif kontrol grubuna ait son hayvan 8. günde, 50 kDa altı gilaburu grubundaki hayvanların sonuncusu 30. günde ve 50 kDa üstü gilaburu grubundaki hayvanların sonuncusunun ise 32. günde öldüğü görüldü. En uzun ortalama yaşam süresi 50 kDa altı gilaburu grubundaki hayvanlarda görüldü (Tablo 4.3). Yaşam süresi takip edilen hayvanlardan ölümünü takiben birinci saat içinde nekropsi yapılabilenlerde karın boşluğu açıldığında karın içinde yoğun yapışıklıklar, metastatik ve tümöral yapılar gözlemlendi (Şekil 4.13).

Tablo 4.3.Gruplara göre hayvanların yaşam süreleri

Gruplar (n=7)	Hayvanların kesim sonrası yaşam süresi/ gün												Ort. yaşam süresi (gün)
	1.	3.	4.	5.	7.	8.	11.	16.	19.	28.	30.	32.	
Pozitif kontrol	a	a	--	aa	aa	a							4.5
5-FU	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+∞
50 kDa altı gilaburu	--	a	a	--		a	a	a	--	a	a		14.3
50 kDa üstü gilaburu	aa	--	a	aa	--	--	--	--	a	--	--	a	9.5



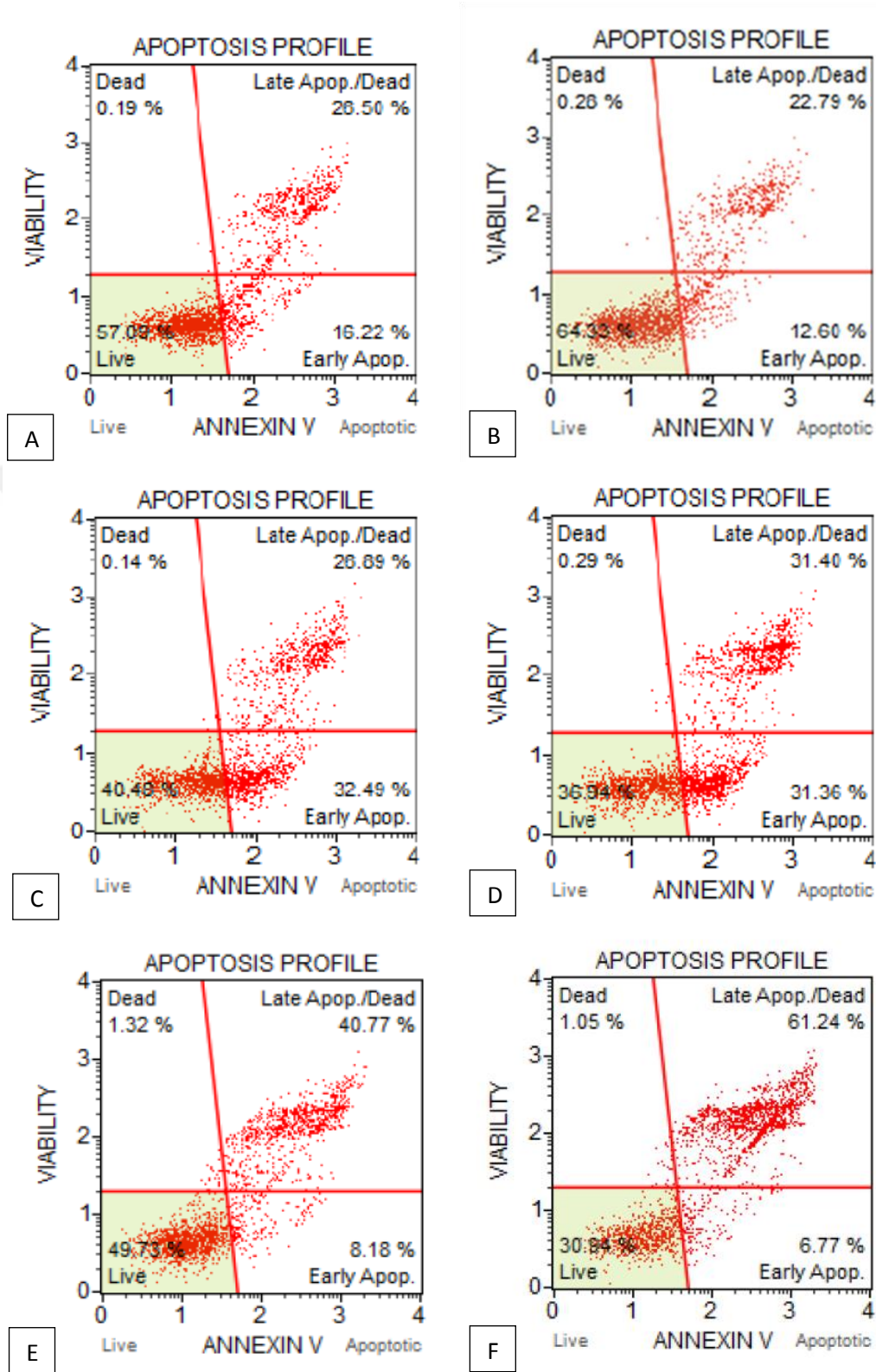
Şekil 4.13. Yaşam süresi takip edilen hayvanların karın boşluğu açıldığında genel görünüm.

4.2. *In vitro* Değerlendirmeler

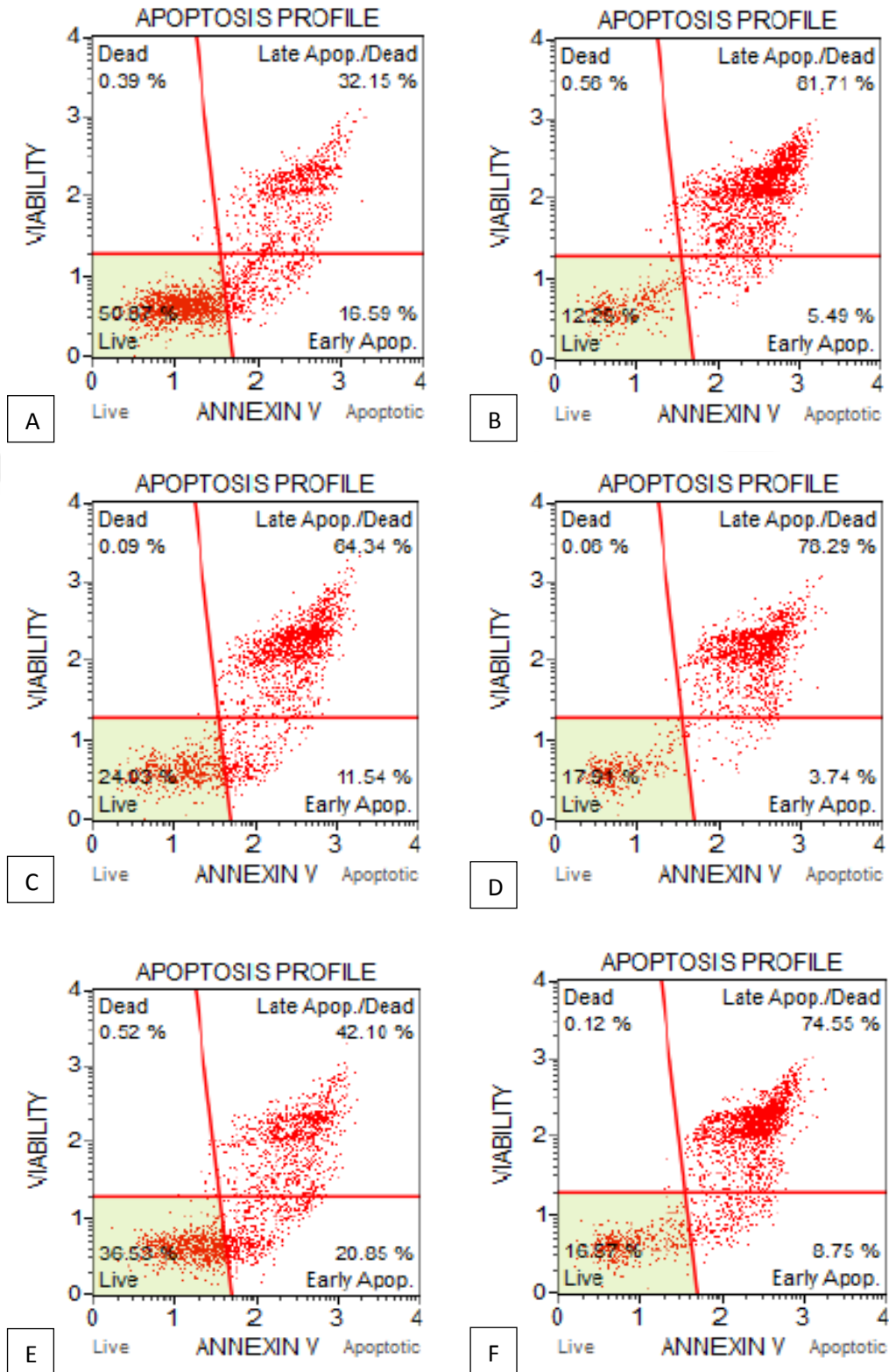
Farklı molekül ağırlıklarına sahip gilaburu meyve suyu ekstraktlarının EAT hücreleri üzerine *in vitro* etkisi çeşitli parametrelerle değerlendirildi. 3, 24 ve 48 saat inkübatörde kültüre edilen hücrelerde apopitoza, hücre döngüsüne ve mitotik aktiviteye dair parametreler ölçüldü.

4.2.1. Annexin V

Bu test içinde erken apopitoz, geç apopitoz ve total apopitoz'daki hücrelerin yüzdesel oranları 3, 24 ve 48 saat için gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve sonuçlar not edildi. Sonuçların oluşturulmasında Muse Cell Analyzer cihazından alınan ham veri grafikleri esas alındı. Cihazın oluşturduğu grafiklerde yatay ve dikey eksenlerin kesişmesiyle oluşan dört bölme izlendi. Testin içeriğindeki işaretleyicilerin oluşturduğu hücre popülasyonları bu bölmelerde (sol üstte ölü hücreler, sağ üstte geç apopitoza giren hücreler, sol altta canlı hücreler, sağ altta erken apopitoza giren hücreler) gözlemlendi. Üç saatlik kültür sonunda erken apopitoz, geç apopitoz ve total apopitoza ait değerlerde gruplar arasında anlamlı ($p>0,05$) fark görülmedi (Tablo 4.5, 4.6, ve 4.7). 24 saatlik sonuçlara ait grafiksel veriler Şekil 4.15, 48 saatlik sonuçlara ait grafiksel veriler ise Şekil 4.16' da görülmektedir.



Şekil 4.14. 24 saatlik kültür sonunda gruplara göre apoptoz oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400µg/ml gilaburu grubu.



Şekil 4.15. 48 saatlik kültür sonunda gruplara göre apoptoz oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200 µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400 µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200 µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubu.

4.2.1.1. Erken Apoptoz

24 saatlik kültür sonunda pozitif kontrole göre 50 kDa altı gruplarda artan bir erken apoptoz değeri gözlenirken (bu değer 200 µg/ml gilaburu grubunda anlamlıydı), 50 kDa üstü gruplarda ise erken apoptoz değeri daha düşüktü ($p<0,011$). 48 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde ise kontrole göre hem 5-FU, hem de 50 kDa altı ve üstü 400µg/ml gilaburu gruplarında erken apoptoz değerlerinde anlamlı ($p<0,001$) bir düşüş mevcuttu (Tablo 4.4). Bu sonuçlar 50 kDa altı 200 µg/ml gilaburunun erken apoptozu artırıcı bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.4.Kültüre edilen EAT hücrelerinin erken apoptoz (%) bulguları.

Gruplar	Erken apopt. 3 saat (ort±sd)	Erken apopt. 24 saat(ort±sd)	Erken apopt. 48 saat(ort±sd)
Pozitif kontrol	12,80±9,87	12,78±3,22 ^{ab}	17,46±0,75 ^b
5-FU	14,90±3,10	13,90±1,17 ^{ab}	5,33±0,28 ^a
50 kDa altı gilaburu 200 µg/ml	4,91±2,65	24,28±10,04 ^b	10,93±4,75 ^{ab}
50 kDa altı gilaburu 400 µg/ml	11,15±13,37	19,81±7,98 ^{ab}	5,38±1,42 ^a
50 kDa üstü gilaburu 200 µg/ml	16,51±17,13	9,43±2,00 ^a	14,52±7,00 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400 µg/ml	11,07±5,88	8,30±3,74 ^a	9,80±3,95 ^a
Gruplar arası p değeri	0,439	0,011	<0,001

4.2.1.2. Geç Apoptoz

24 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde pozitif kontrol grubuna göre sadece 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubunda geç apoptoz değerinin yüksek olduğu ($p<0,001$), 48 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde ise tüm grupların değerlerinin kontrol grubundan daha yüksek değerlere sahip olduğu kaydedildi ($p<0,001$), (Tablo 4.5.). Bu sonuçlar 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburunun geç apoptozu artırıcı etkisinin 24 saat sonunda daha fazla, 50 kDa altı gilaburu gruplarının ise 48 saat sonunda daha etkin ve 5-FU değerlerine yakın olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.5.Kültüre edilen EAT hücrelerinin geç apoptoz (%) bulguları.

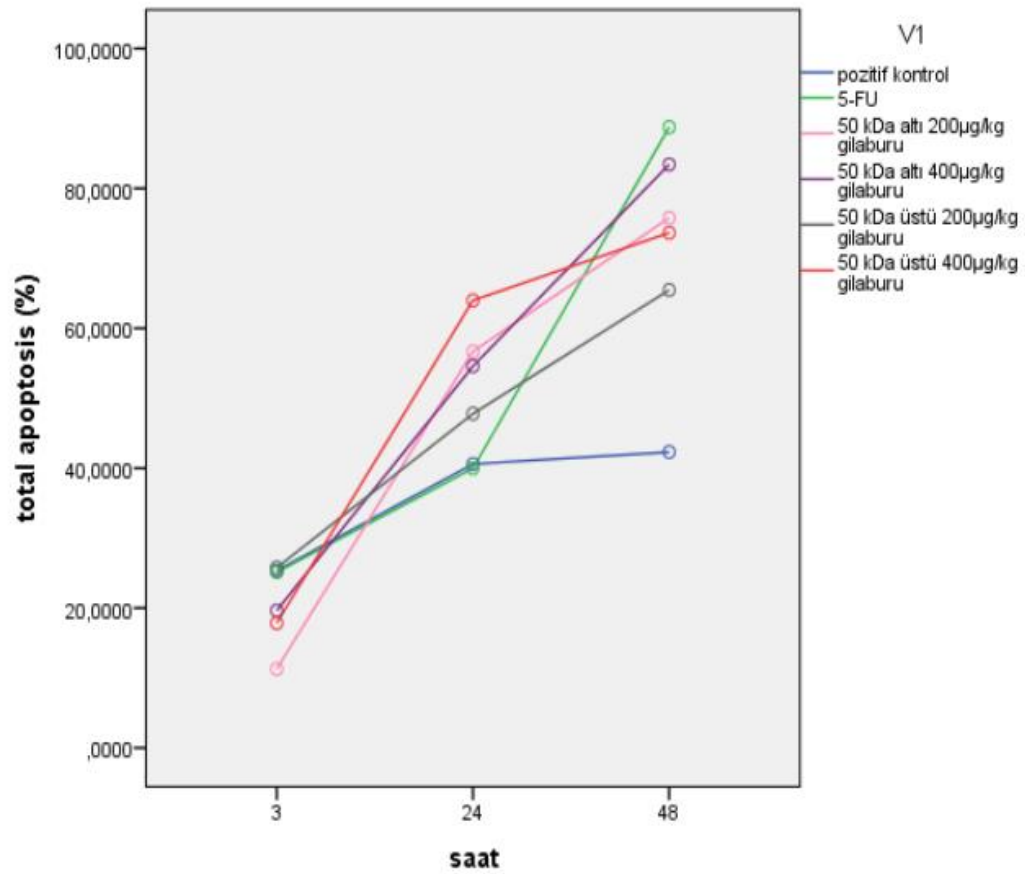
Gruplar	Geç apop. 3 saat (ort±sd)	Geç apop. 24 saat (ort±sd)	Geç apop. 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	12,5±6,27	27,8±1,25 ^a	30,76±1,25 ^a
5-FU	10,20±2,20	26,06±3,70 ^a	85,10±3,55 ^b
50 kDa altı gilaburu 200 µg/ml	6,38±3,60	32,40±10,04 ^a	64,82±12,38 ^b
50 kDa altı gilaburu 400 µg/ml	8,50±4,08	34,75±14,30 ^a	78,01±6,84 ^b
50 kDa üstü gilaburu 200 µg/ml	9,22±3,41	38,35±5,43 ^a	50,96±16,77 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400 µg/ml	6,77±3,51	55,71±13,32 ^b	63,87±17,15 ^b
Gruplar arası p değeri	0,176	<0,001	<0,001

4.2.1.3. Total Apoptoz

24 saatlik kütürden sonra hücrelerdeki total apoptoz sonuçları değerlendirildiğinde pozitif kontrole göre 5-FU grubu hariç tüm gilaburu gruplarında artan bir total apoptoz değeri gözlenirken ($p<0,05$), 48 saatlik sonuçlar total apoptoz değerlerinde pozitif kontrole göre tüm gruplarda anlamlı ($p<0,05$) bir artışın olduğunu gösterdi (Tablo 4.7). Tedavi grubu olan 5-FU grubu ile gilaburu grupları karşılaştırıldığında ise total apoptoz değerlerinin 24 saat sonunda gilaburu gruplarında daha yüksek olduğu ($p<0,05$), 48 saat sonunda ise özellikle 50 kDa altı gilaburu gruplarında 5-FU grubuna yakın olduğu görüldü (Tablo 4.6).

Tablo 4.6.Kültüre edilen EAT hücrelerinin total apoptoz (%) bulguları.

Gruplar	Tot. apop. 3 saat (ort±sd)	Tot. apop. 24 saat (ort±sd)	Tot. apop. 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	25,34±10,28	40,58±1,97 ^a	42,30±10,99 ^a
5-FU	25,13±4,64	39,96±4,45 ^a	88,76±4,93 ^b
50 kDa altı gilaburu 200 µg/ml	11,28±5,46	56,67±7,56 ^{ab}	75,78±8,06 ^b
50 kDa altı gilaburu 400 µg/ml	19,65±14,66	54,58±19,02 ^{ab}	83,42±6,35 ^b
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	25,77±19,33	47,78±5,97 ^{ab}	65,47±16,03 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	17,85±6,94	63,98±11,20 ^b	73,65±17,13 ^b
Gruplar arası p değeri	0,254	0,011	<0,001



Şekil 4.16. Kültüre edilen EAT hücrelerinin total apoptoz değerlerinin değişimi.

4.2.2. Hücre döngüsü

Bu test içinde gruplar arası G_0/G_1 , S, ve G_2/M total fazındaki hücrelerin oranları (%) 3, 24 ve 48 saatlik kültür sonunda karşılaştırıldı. G_0/G_1 evresi'ne ve S evresi'ne ilişkin sonuçlar değerlendirildiğinde 3 saatlik kültür sonuçlarında gruplar arasında anlamlı fark görülmedi.

4.2.2.1. G_0/G_1 Evresi Sonuçları

24 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde G_0/G_1 evresindeki hücrelerin oranlarının pozitif kontrole göre diğer grupların tamamında daha yüksek olduğu ($p < 0,05$), 48 saatlik sonuçlarda ise pozitif kontrole göre 50 kDa üstü 400 µg/ml grubu hariç diğer gruplarda G_0/G_1 evresindeki hücrelerde anlamlı bir azalmanın ($p < 0,001$) söz konusu olduğu görüldü (Tablo 4.8). Bu durum 5-FU ve gilaburu gruplarının 24 saat sonunda fazla etkin olmadığı ancak 48 saatlik kültür sonundaki sonuçların (50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu

grubu hariç) hücrelerin DNA sentezi (S fazı) öncesi hazırlık aşamasında tutularak DNA sentezine geçişi engellediğini göstermektedir.

Tablo 4.7. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak G₀/G₁ evresindeki değişim oranları

Gruplar	G ₀ /G ₁ 3 saat (ort±sd)	G ₀ /G ₁ 24 saat (ort±sd)	G ₀ /G ₁ 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	27,72±10,99	28,38±8,14 ^a	41,45±0,69 ^c
5-FU	31,41±7,55	35,73±3,34 ^b	36,67±4,40 ^{ab}
50 kDa altı gilaburu 200 µg/ml	28,89±11,86	32,45±3,58 ^{ab}	33,98±3,10 ^{ab}
50 kDa altı gilaburu 400 µg/ml	36,56±4,00	33,20±4,78 ^{ab}	29,05±2,87 ^a
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	26,10±8,51	35,78±3,07 ^b	33,17±5,85 ^a
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	29,09±3,51	36,70±1,48 ^b	42,00±4,10 ^c
Gruplar arası p değeri	0,172	0,041	<0,001

4.2.2.2. S Evresi Sonuçları

24 saat kültür sonunda S evresindeki hücre oranlarında da gruplar arasında istatistiksel olarak bir farkın olmadığı, 48 saatlik sonuçlarda ise pozitif kontrole göre 50 kDa altı 400 µg/ml gilaburu grubunda bir azalma, diğer gilaburu gruplarında ise anlamlı bir artışın olduğu görüldü (p<0,002), (Tablo 4.8). Bu sonuçlar 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubunun DNA sentezini engellediğini göstermektedir.

Tablo 4.8. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak S evresindeki değişim oranları

Gruplar	S 3 saat (ort±sd)	S 24 saat (ort±sd)	S 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	21,73±9,71	27,11±10,00	16,88±8,96 ^{ab}
5-FU	18,79±2,53	28,31±2,67	18,31±2,94 ^{ab}
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	17,61±2,91	25,59±1,57	21,57±1,94 ^b
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	17,61±2,88	25,52±3,68	13,58±2,01 ^a
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	23,09±7,84	23,96±2,48	20,15±3,05 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	15,14±2,36	22,64±3,66	21,85±1,09 ^b
Gruplar arası p değeri	0,059	0,311	0,002

4.2.2.3. G₂/M Evresi Sonuçları

G₂/M evresine ilişkin sonuçlar değerlendirildiğinde 3 saatlik kültür sonucunda pozitif kontrole göre 50 kDa üstü 200 µg/ml gilaburu grubu hariç diğer gruplarda anlamlı bir azalmanın (p<0,001) var olduğu görüldü. 24 ve 48 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde G₂/M evresindeki hücre oranının tüm gruplardaki değerlerin genel olarak düştüğü,

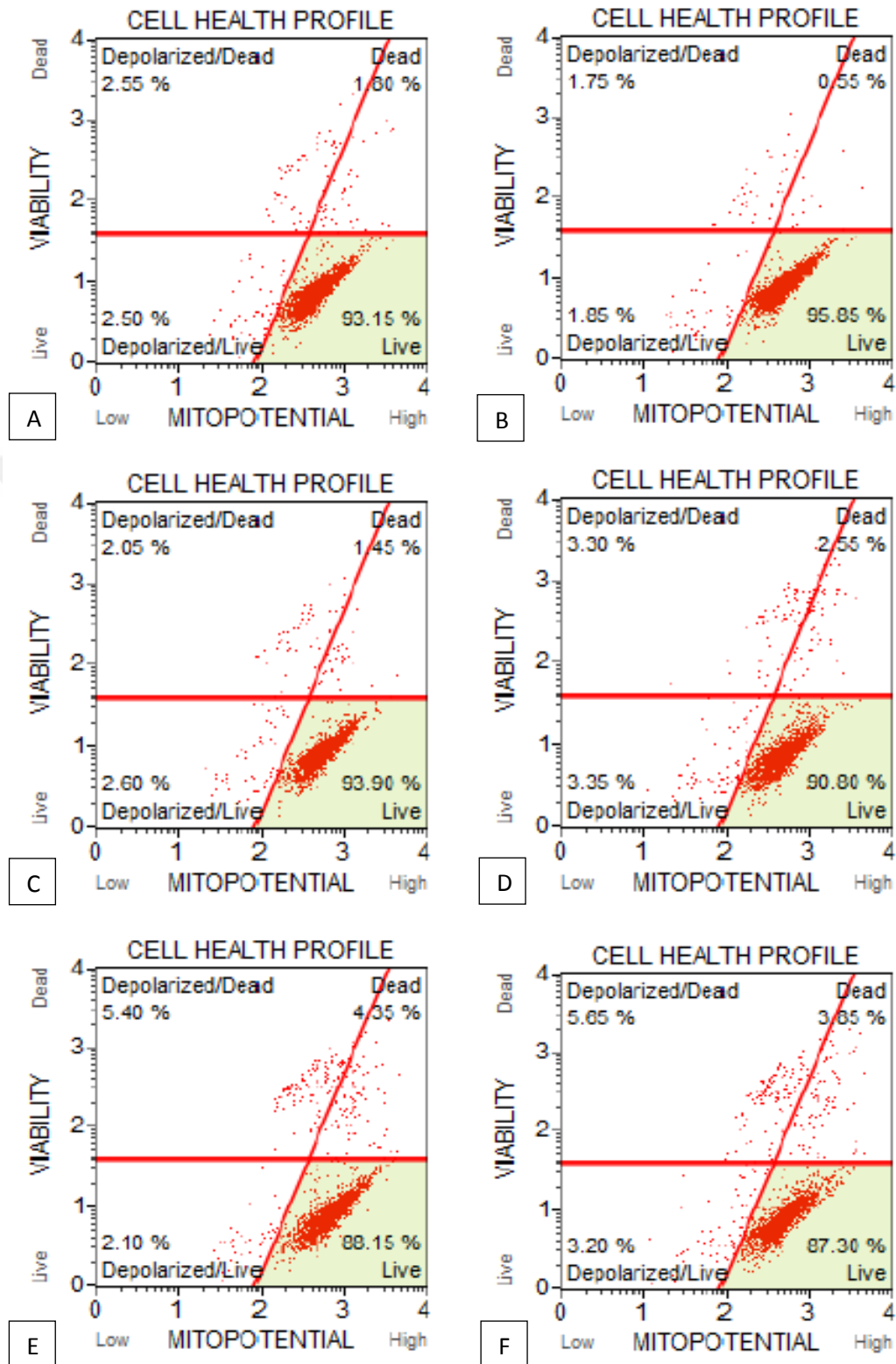
kontrol grubuna göre diğer gruplardaki düşüşün anlamlı ($p<0,05$) olduğu kaydedildi (Tablo 4.10). Bu durum 5-FU ve gilaburu gruplarının pozitif kontrol grubuna göre mitozu yavaşlattığı/durdurduğu, rakamsal verilere bakıldığında 50 kDa üstü gilaburu gruplarının 5-FU grubunun etkisine daha yakın etki gösterdiğini göstermektedir.

Tablo 4.9. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak G₂/M evresindeki değişim oranları

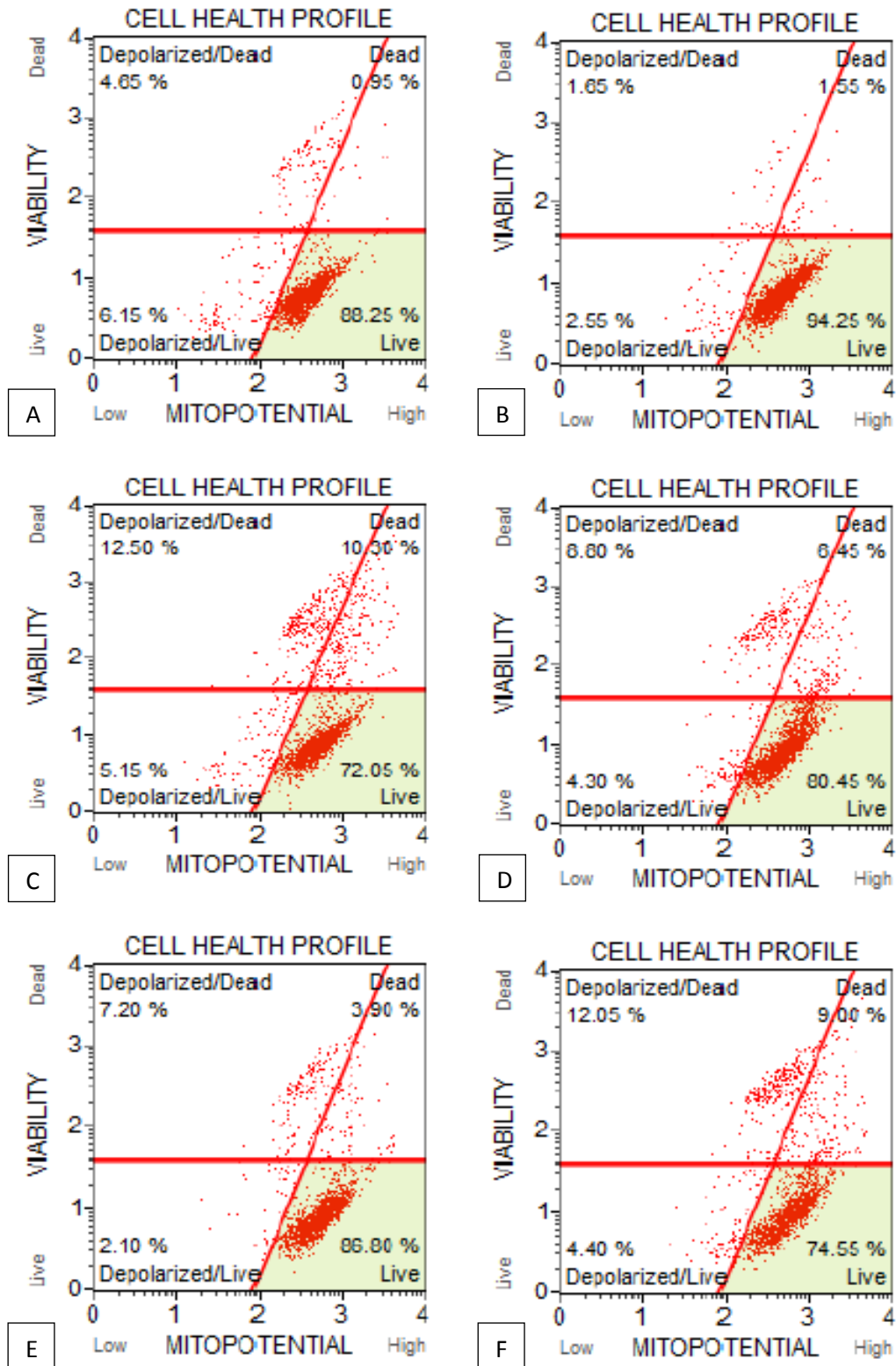
Gruplar	G ₂ /M 3 saat (ort±sd)	G ₂ /M 24 saat (ort±sd)	G ₂ /M 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	39,38±13,53 ^c	38,78±9,57 ^b	25,64±19,32 ^b
5-FU	31,60±11,25 ^b	22,25±2,32 ^a	10,32±2,01 ^a
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	22,57±6,27 ^a	22,43±4,50 ^a	13,71±2,33 ^a
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	16,72±1,95 ^a	22,91±4,97 ^a	13,49±2,84 ^a
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	37,83±7,17 ^c	18,69±3,65 ^a	11,98±1,91 ^a
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	27,11±2,14 ^b	20,46±2,04 ^a	12,45±3,74 ^a
Gruplar arası p değeri	<0,001	<0,001	0,031

4.2.3. Mitotik Aktivite

Bu test içinde canlı/ölü hücrelerin; depolarize canlı, depolarize ölü ve toplam depolarize hücrelerin yüzde oranları 3, 24 ve 48 saat için gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve sonuçlar not edildi. Sonuçların oluşturulmasında Muse Cell Analyzer cihazından alınan ham veri grafikleri esas alındı. Cihazın oluşturduğu grafiklerde yatay ve dikey eksenlerin kesişmesiyle oluşan dört bölümde izlendi. Testin içeriğindeki işaretleyicilerin oluşturduğu hücre popülasyonları bu bölmelerde (sol üstte depolarize ölü hücreler, sağ üstte ölü hücreler, sol altta depolarize canlı hücreler, sağ altta canlı hücreler) gözlemlendi. 24 saatlik sonuçlara ait grafiksel veriler Şekil 4.17, 48 saatlik sonuçlara ait grafiksel veriler ise Şekil 4.18' de görülmektedir.



Şekil 4.17. 24 saatlik kültür sonucunda gruplara göre hücrelerin mitotik aktivite oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200 µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400 µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200 µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubu.



Şekil 4.18. 48 saatlik kültür sonucunda gruplara göre hücrelerin mitotik aktivite oranlarını temsil eden Muse Cell Analyzer cihazı veri grafikleri. **A.** Pozitif kontrol grubu, **B.** 5-FU grubu, **C.** 50 kDa altı 200µg/ml gilaburu grubu, **D.** 50 kDa altı 400µg/ml gilaburu grubu, **E.** 50 kDa üstü 200 µg/ml gilaburu grubu, **F.** 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubu.

4.2.3.1. Canlı ve Ölü Hücre Sayısı

Canlı ve ölü EAT hücresi oranına dair sonuçlar değerlendirildiğinde 3 saatlik kültür sonucunda gruplar arasında hücre canlılığı oranında anlamlı bir farklılık görülmezken (Tablo 4.10), ölü hücre oranında kontrol grubuna göre 50 kDa altı 400 µg/ml ve 50 kDa üstü 200 µg/ml gilaburu gruplarında anlamlı ($p<0,05$) bir artış mevcuttu (Tablo 4.11).

24 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde canlı hücre yüzdesinde pozitif kontrol grubuna göre 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubunda anlamlı bir düşüş (Tablo 4.10), ölü hücre oranında ise yine 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubunda bir artışın olduğu ($p<0,001$) görüldü (Tablo 4.12). 48 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde canlı hücre yüzdesinin pozitif kontrole göre gilaburu gruplarında anlamlı ($p<0,0001$) bir düşüş olduğu, bu düşüşün ise 50 kDa üstü 400 µg/ml gilaburu grubunda en fazla olduğu görüldü (Tablo 4.10). Yine ölü hücre yüzdesinin pozitif kontrol grubuna göre tüm gilaburu gruplarında arttığı ($p<0,0001$) ve bu artışın 50 kDa üstü gilaburu gruplarında daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.11). 24 ve 48 saatlik kültür sonucunda pozitif kontrol grubuna göre özellikle 400 µg/ml gilaburu grubunda canlı hücre miktarındaki azalma ve ölü hücre miktarındaki artış, gilaburu meyve suyunun EAT hücreleri üzerinde sitotoksik (hücreleri öldürücü) etkisinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.10. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak canlılık oranlarındaki değişim

Gruplar	Canlı hücre 3 saat (ort±sd)	Canlı hücre 24 saat (ort±sd)	Canlı hücre 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	93,43±0,98	93,66±0,98 ^{bc}	90,53±2,04 ^c
5-FU	93,83±1,05	95,73±0,30 ^c	93,86±0,51 ^c
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	94,57±0,90	93,76±2,56 ^{bc}	88,21±6,69 ^{bc}
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	93,30±1,36	94,07±1,72 ^{bc}	83,41±4,87 ^b
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	92,77±1,39	90,76±2,75 ^{ab}	85,35±2,33 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	93,63±1,95	89,61±2,54 ^a	75,44±1,49 ^a
Gruplar arası p değeri	0,246	<0,0001	<0,0001

Tablo 4.11. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak ölü hücre oranlarındaki değişim

Gruplar	Ölü hücre 3 saat (ort±sd)	Ölü hücre 24 saat (ort±sd)	Ölü hücre 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	0,40±0,34 ^a	1,56±0,58 ^b	0,83±0,20 ^a
5-FU	0,50±0,45 ^a	0,33±0,30 ^a	1,20±0,26 ^a
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	1,01±0,24 ^a	2,08±1,25 ^b	4,27±2,63 ^b
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	1,31±0,46 ^b	1,87±0,51 ^b	7,40±2,52 ^c
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	1,41±0,57 ^b	2,66±0,93 ^b	4,11±0,75 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	1,08±0,44 ^a	3,58±1,15 ^c	7,71±1,00 ^c
Gruplar arası p değeri	0,021	<0,0001	<0,0001

4.2.3.2. Depolarize Canlı Hücre Miktarı

Depolarize canlı EAT hücresi oranına dair sonuçlar değerlendirildiğinde 3 ve 24 saatlik kültür sonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 4.12). 48 saatlik kültür sonunda ise kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarında anlamlı bir azalmanın ($p<0,0001$) varlığı tespit edildi (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak depolarize canlı hücre oranlarındaki değişim

Gruplar	Dep. canlı 3 saat (ort±sd)	Dep. canlı 24 saat (ort±sd)	Dep. canlı 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	4,00±0,60	2,23±0,25	6,36±0,47 ^b
5-FU	4,00±0,00	2,06±0,20	3,06±0,60 ^a
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	2,75±0,73	2,23±0,63	3,38±0,89 ^a
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	3,23±1,12	2,17±0,54	3,52±0,81 ^a
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	3,08±1,30	2,11±0,59	3,21±1,05 ^a
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	3,12±0,86	2,43±0,71	3,92±0,97 ^a
Gruplar arası p değeri	0,442	0,905	<0,0001

4.2.3.3. Depolarize Ölü Hücre Miktarı

Depolarize ölü EAT hücresi oranında 3 saatlik kültür sonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmezken (Tablo 4.14) 24 saatlik kültür sonuçları değerlendirildiğinde depolarize ölü hücre oranı pozitif kontrol grubuna göre 50 kDa üstü gilaburu gruplarında yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$), (Tablo 4.13). 48 saatlik kültür sonuçlarının ise pozitif kontrol grubuna tüm gilaburu gruplarında anlamlı

derecede ($p < 0,0001$) yüksek, 50 kDa üstü gilaburu gruplarında ise en yüksek oranda olduğu tespit edildi (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak depolarize ölü hücre oranlarındaki değişim

Gruplar	Dep. ölü 3 saat (ort±sd)	Dep. ölü 24 saat (ort±sd)	Dep. ölü 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	2,16±0,28	2,23±0,25 ^a	2,33±2,21 ^a
5-FU	1,70±0,51	1,90±0,10 ^a	1,86±0,23 ^a
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	1,67±0,21	1,91±1,04 ^a	4,13±3,58 ^b
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	2,15±0,50	1,90±0,84 ^a	5,65±2,95 ^b
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	2,76±0,71	4,48±2,25 ^b	7,33±1,05 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	2,18±1,10	4,35±1,16 ^b	12,95±1,58 ^c
Gruplar arası p değeri	0,079	<0,0001	<0,0001

4.2.3.4. Toplam Depolarize Hücre Miktarı

Toplam depolarize EAT hücre oranı 3 saatlik kültür sonucunda farklılık göstermedi (Tablo 4.14). 24 saatlik kültür sonuçları değerlendirildiğinde pozitif kontrole göre 50 kDa üstü gilaburu gruplarında anlamlı ($p < 0,001$) bir artış mevcuttu ve bu artış oranı 48 saatlik kültür sonuçlarında daha da yüksekti (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Kültüre edilen EAT hücrelerinin zamana bağlı olarak toplam depolarize hücre oranlarındaki değişim

Gruplar	Top. dep. 3 saat (ort±sd)	Top. dep. 24 saat (ort±sd)	Top. dep. 48 saat (ort±sd)
Pozitif kontrol	6,16±0,86	4,80±0,43 ^a	8,66±1,89 ^{ab}
5-FU	5,70±1,17	3,93±0,30 ^a	4,63±0,92 ^a
50 kDa altı gilaburu 200µg/ml	4,41±0,88	4,13±1,39 ^a	7,51±4,26 ^{ab}
50 kDa altı gilaburu 400µg/ml	5,37±1,36	4,05±1,30 ^a	9,16±3,19 ^{ab}
50 kDa üstü gilaburu 200µg/ml	5,85±1,52	6,60±2,46 ^b	10,52±1,88 ^b
50 kDa üstü gilaburu 400µg/ml	5,33±1,70	6,81±1,69 ^b	16,87±2,01 ^c
Gruplar arası p değeri	0,321	0,003	<0,0001

Bu sonuçlar gilaburunun depolarizasyonu artırmak suretiyle EAT hücrelerinin mitokondriyel zar potansiyelini düşürdüğünü göstermektedir. Özellikle 50 kDa üstü gilaburu gruplarının bu artış dolayısıyla mitotik yolağı aktive ederek apoptoz mekanizmasını başlattığı düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek oranda bitkisel kaynaklı gıda tüketen popülasyonlarda, kanser insidansının tüketmeyen veya az tüketenlere kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir (22). Bitkiler kanser tedavisinde uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Bitki kaynaklı anti-kanser ajanlarının araştırılması ile ilgili çalışmalar 1950'lerden itibaren artmıştır (108). Günümüzde kullanılan antikanser ajanların ise yaklaşık %75'inin bitkisel kökenli olduğu tahmin edilmektedir (23). Yapılan çalışmalar bitkilerin haiz olduğu bu antikanser özelliklerin, bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklandığını göstermektedir. Çok sayıda bitkisel besinden ve baharatlardan alınan monofenolik ve polifenolik bileşiklerin, *in vivo* ve *in vitro* olarak kanserin oluşmasını, ilerlemesini ve yayılmasını baskıladığı ya da azalttığı gösterilmiştir (22)

Gilaburu meyvelerinin C vitamini, askorbik asit, flovanoidler, polifenolik bileşikler (7), klorojenik asit ve amentoflavon gibi antioksidanlarca çok zengin olduğu bildirilmiştir (109). Gilaburu meyveleri, yüksek polifenolik bileşik içerikleri ve yüksek antioksidan aktiviteleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Moldovan ve arkadaşları 2012'de yaptıkları çalışmada Romanya'dan topladıkları gilaburu meyvelerinde gerçekleştirdikleri analizlerde bu meyvelerin yoğun antosiyanin içerdiğini kaydetmişlerdir (29).

Soylak ve arkadaşları 2002'de yaptıkları çalışmada Kayseri'nin çeşitli yörelerinden aldıkları gilaburu örneklerinde bazı spektrofotometrik ölçümler yapmış ve tannik asit, askorbik asit, sodyum, potasyum, demir, kalsiyum, magnezyum gibi bileşenlerin miktarını ve pH'larını belirlemişlerdir. Bu çalışmaya göre Gesi ilçesinden alınan gilaburu örneklerinin bu bileşenlerce zengin olduğu görülmektedir (110).

Yılmaztekin ve arkadaşları taze gilaburu ve çeşitli zaman aralıklarında fermente edilmiş gilaburu meyve suları arasındaki içerik karşılaştırmalarında gilaburu meyvelerinin total

fenolik içeriğinin fermentasyonla birlikte arttığı ve fermentasyon periyodu uzadıkça fenolik içeriğin (gallik asit) arttığını fakat buna paralel olarak alkol miktarının da arttığını bildirmişlerdir (37).

Gilaburunun kimyasal kompozisyonuyla ilgili literatürde yer alan çalışmaların, bitkinin yüksek biyoaktivitesiyle ilgili birbirini destekler nitelikte oluşu, bu meyvenin iyi bir besin olmanın yanında çeşitli rahatsızlıkların önlenmesi ve tedavisini hedef alan tıbbi araştırmalara değerli bir konu olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim gilaburu meyvelerinden çeşitli yollarla elde edilen ekstraktlar çok sayıda araştırmaya konu olmuştur (111-114).

Ovodova ve arkadaşları gilaburu meyvelerinin amonyum okzalat ve su ile elde ettikleri ekstraktını suda çözünen polisakkarit fraksiyonlarına ayırmış ve myeloperoksidaz aktivitesini değerlendirerek gilaburunun bazı polisakkaritlerinin, peritoneal makrofajlar ile lizozomal enzimlerin salgılanmasını uyararak fagositozu başlattığını, dolayısıyla immun sistemi uyarıcı bir aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (111).

Altun ve arkadaşları (2010) gilaburu yapraklarından elde edilen ekstrakt'ın ratlarda karbon tetraklorür ile indükledikleri karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkisini araştırmış ve yedi gün boyunca i.p. olarak enjekte edilen 100 mg/kg dozun hafif hepatoprotektif etkisi olduğunu rapor etmişlerdir (115).

Saltan ve arkadaşları ise 2016 yılında ratlarda deneysel olarak oluşturdukları endometriosis modeline gilaburu meyve suyunun metanolik, etil asetatlı ve n-heksan'lı ekstraktlarını 100 mg/kg dozda oral olarak 28 gün boyunca uygulamış ve gilaburunun olumlu etkisini not etmişlerdir (112).

Eken ve arkadaşları (2017) akciğer transplantasyonu sırasında iskemi-reperfüzyonun indüklediği oksidatif hasara karşı ratlara gilaburu meyve suyu'nun metanolik ekstraktını 200 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulamış ve gilaburunun antioksidan etkisinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (114).

Gilaburunun yaygın olarak yetiştiği bir şehirde bulunan Erciyes Üniversitesi'nde çok sayıda gilaburu çalışması yapılmıştır. Dinç ve arkadaşları (2012) tarafından gilaburu meyve suları mikroenkapsüle edilerek fenolik madde, antosiyanin gibi bileşenler tayin edilmiş (36), geleneksel yolla fermente edilmiş gilaburu meyve suyunun ihtiva ettiği

laktik asit bakterilerinin suşları ve bu suşların probiyotik potansiyeli araştırılmış (116), bir diğer çalışmada ise gilaburu meyvesinin metanolik ekstraktı elde edilerek antimikrobiyal etkisi çalışılmıştır (113).

Ömerli tarafından 2015 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yapılan doktora tez çalışmasında gilaburu meyve suyu ekstraktı deneysel olarak böbrek taşı oluşturulan ratlara günlük su tüketim miktarının $\frac{1}{4}$ 'üne denk gelecek şekilde dozlanarak gavaj yoluyla verilmiş ve gilaburunun böbrek taşı oluşumunu yavaşlatıcı ve böbrek taşı hasarlarını azaltıcı etkisinin olduğu rapor edilmiştir (47).

2017 yılında Sarıözkan ve arkadaşları ratlarda Taksan bazlı kemoterapötiklerin oluşturduğu testis ve sperm bozukluklarına karşı gilaburu meyve suyunun koruyucu etkisini araştırmak amacıyla gilaburu meyvelerini kurutup toz haline getirdikten sonra distile su ile yumuşatıp buharlaştırma yoluyla liyofilize etmişler ve elde ettikleri ekstraktı günlük 100 mg/kg dozla oral olarak 10 hafta boyunca hayvanlara vermişlerdir. Sonuç olarak gilaburu tüketiminin bu ilaçların neden olduğu hasarı azalttığını bildirmişlerdir (117).

Gilaburu meyve suyunun kansere karşı etkisiyle ilgili Erciyes Üniversitesi'nde iki çalışma yapılmıştır. Ülger ve arkadaşları (2012) Balb-C ırkı farelerde DMH ile indükledikleri kolon kanserine karşı gilaburu suyunun etkinliğini araştırmışlardır. Bu amaçla önce 12 hafta boyunca haftada bir kez olmak kaydıyla farelere 20 mg/kg s.c. DMH vermişler sonra da gruplardan birine ilk DMH enjeksiyonunu diğer birine de son DMH enjeksiyonunu takiben gilaburu uygulayarak toplamda 30. haftanın sonunda deneyi sonlandırmışlardır. Kolon dokusunda yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda gilaburu suyunun, başlangıç aşamasında kolon kanserinin önlenmesi için yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir (9). Ceylan ve ark. (2018) tarafından gilaburu meyve suyu dondurularak elde edilmiş liyofilize toz ekstraktın, farelerde deneysel olarak oluşturulan Ehrlich Ascites Tumor'e karşı *in vivo* ve *in vitro* etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmanın *in vivo* basamağında i.p. olarak 1×10^6 EAT hücresi verilen Balb-C ırkı erkek farelere 1000, 2000 ve 4000 mg/kg dozlarında gilaburu meyve suyu liyofilize toz ekstraktı PBS içinde çözdürülerek i.p. olarak 10 gün boyunca verilmiş ve daha sonra hayvanlar sakrifiye edilerek dokuları histopatolojik olarak incelenmiş ayrıca Malondialdehit (MDA), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT)

gibi antioksidan enzim parametreleri kontrol edilmiştir. Sonuç olarak gilaburu tedavi gruplarında antioksidan enzim parametrelerinin anlamlı derecelerde arttığı ve histopatolojik sonuçların da bu bulguları destekler nitelikte olduğu rapor edilmiştir (9).

Gilaburu ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların antitümöral etkiyi kanıtlayıcı nitelikte olması, bu hipotezi doğrulayacak daha fazla araştırmanın yapılması için bir gerekçe oluşturmaktadır. Birden fazla bileşen içeren zengin bir kimyasal kompozisyona sahip olan gilaburu meyve suyunun antitümöral etkin maddesinin belirlenmesine katkı sağlamak amacıyla gilaburu meyve suyu içeriğini molekül ağırlıklarına göre ayırmak bir basamak olarak düşünülmüş, Ceylan ve arkadaşlarının (2018) yaptığı araştırmanın bir devamı niteliği taşıyan bu çalışmada 8 haftalık Balb-C ırkı erkek farelerde gilaburu meyve suyunun 50 kDa altı ve üstü molekül ağırlıktaki liyofilize toz ekstraktlarının antitümör etkisi araştırılmıştır.

Ehrlich Ascites Tumor modeli, kolay oluşturulabilen, homojen bir serbest tümör hücresi kitlesi ihtiva eden, maliyeti düşük bir yöntem olması ve hayvandan hayvana transplante edilebilmesi nedenleriyle bitki ekstraktlarıyla yapılan antitümör etkinlik araştırmalarında yaygın olarak kullanılagelen deneysel kanser modellerinden birisidir (65,118-120). Hayvanlardaki ağırlık değişimi, karın çevresindeki değişim, yaşam süresi değişimi, hayvanların sakrifiye edilmesini takiben karın boşluğunda assit sıvısının varlığı, bu sıvının total ve paket hacmi, assit sıvısında bulunan EAT hücresi sayısı, hayvanların dokularının histopatolojik olarak incelenmesi bu parametrelerden birkaçıdır.

Ulaşılabilen mevcut literatürde EAT modeli üzerine gilaburunun etkinliğinin araştırıldığı tek çalışma olan Ceylan ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında 1×10^6 EAT hücresi verilen Balb-C ırkı erkek farelere 1000, 2000 ve 4000 mg/kg dozlarında gilaburu meyve suyu ekstraktı i.p. olarak 10 gün boyunca verilmiş bu süreçte yapılan ağırlık takibi sonucunda pozitif kontrol grubuna göre gilaburu gruplarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (10). Mevcut çalışmada EAT oluşturulan farelere i.p. olarak enjekte edilen 50 kDa altı ve 50 kDa üstü gilaburu ekstraktlarının benzer etki göstererek ağırlık ve karın çevresi artışını durdurduğu görülmüştür.

Daha önce EAT modeli ile yapılan çalışmalarda karın boşluğunda biriken assit sıvısına bağlı olarak karın çevresinin arttığı, assit sıvısının toplam hacmi ile assit sıvısı

içerisindeki hücresel yapıların oluşturduğu paket hacmin kontrol grubu ve deney grupları arasında karşılaştırılabileceği bildirilmiştir (65,118). Yapılan mevcut çalışmada karın çevresi artışının pozitif kontrol grubuna göre tedavi gruplarında azaldığı görülmüştür. Ayrıca pozitif kontrol grubundaki hayvanların karın boşluğundaki asit sıvısı miktarı ve paket volüme göre gilaburu tedavi gruplarında önemli azalma mevcuttu ancak gilaburu gruplarındaki hayvanların büyük çoğunluğunda toplanabilecek miktarda asit sıvısına rastlanmadığı için sonuçlar istatistik olarak karşılaştırılamadı.

Özaslan ve ark. (2007) tarafından *Plantago major*'ün EAT üzerine etkinliğini değerlendirmek için hayvanların mide, karaciğer, ince ve kalın bağırsaklarından alınan doku örnekleri rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildikten sonra kesitler Hematoksilen-Eozin boyama ile boyanarak dokular incelenmiş, kontrol grubunda ince ve kalın bağırsaklarda periton üzerinde yaygın bir EAT hücresi inokülasyonu izlenirken diğer dokularda EAT hücresinin olmadığı kaydedilmiştir (119).

Ceylan ve ark. (2018) tarafından gilaburunun EAT üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmada alınan karaciğer ve böbrek dokusu Hematoksilen-Eozin boyama ile boyanarak dokular incelenmiş, böbrek kapsülü dışında kontrol grubunda çok sayıda EAT hücresi görülürken karaciğer dokusunda tümör hücresine rastlanmadığı not edilmiştir (10). Çınar ve ark. (2016) tarafından çemen ekstraktının EAT üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada alınan mide, dalak, böbrek, karaciğer, ince ve kalın bağırsak dokularının hepsinde kontrol gruplarında yaygın EAT hücresi invazyonu izlenmiştir (120). Yapılan bu çalışmada hayvanlardan alınan karaciğer, böbrek, dalak, testis, mide, ince ve kalın bağırsak dokularının tamamının Hematoksilen-Eozin boyama sonrası histopatolojik değerlendirilmesinde pozitif kontrol grubu dokularının dış yüzeyinde yoğun bir EAT hücresi invazyonu olduğu, pozitif kontrole kıyasla her iki gilaburu tedavi grubunun da daha az tümör dejenerasyonuna uğradığı, buna mukabil 50 kDa üstü gilaburu grubundaki hayvanların dokularının histolojik kesitlerinin negatif kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiği kaydedildi.

Rajeshvar ve ark. (2005), Patra ve ark. (2015) ile Mota ve ark. (2018) EAT üzerine çeşitli bitki ekstraktlarının etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarda hayvanlarda yaşam süresi takibi yapmış ve tedavi gruplarındaki hayvanların yaşam süresinin kontrol gruplarına kıyasla uzadığını not etmişlerdir (65,118,121). Mevcut çalışmada gilaburu

gruplarındaki hayvanların deney bitimi itibariyle ölçülen yaşam sürelerinin pozitif kontrol grubunun neredeyse iki katına kadar uzadığı görüldü.

Gilaburunun *in vitro* olarak kanser hücreleri üzerine etkinliğinin kapsamlı bir biçimde araştırıldığı fazla çalışmaya ulaşılamamıştır. Buna karşılık çeşitli viburnum türlerine ait *in vitro* kanser çalışmaları mevcuttur.

Ya-Ching ve arkadaşları (2002) *Viburnum odoratissium* çiçek ve yapraklarından elde ettikleri metanolik ekstrakt'dan 2 farklı diterpen ve lupan triterpen'i izole etmiş ve bunu insan gastrik tümör hücrelerine 10 mikromolar dozunda inoküle ederek sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişler (122), Fukuyama ve arkadaşları 2005 yılında *Viburnum luzonicum* yapraklarının metanolik ekstraktından izole edilen 4 farklı iridoid alkaloidini HeLa S3 kanser hücre hattına 0,1, 1 ve 10 μM dozlarında verip 72 saat kültüre etmişler ve bu alkaloidlerden ikisinin sitotoksik etkisinin olduğunu kaydetmişler (123), 2008 yılında El-gamal ve arkadaşları *Viburnum awabuki*'nin metanolik ekstraktı'nı bioassay güdümlü mekanizmalarla iki lupan triptenine ayırıp bu türevleri P388 hücre hattına vererek *Viburnum awabuki* ekstraktının bu hücre hattına karşı sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (124). Sonraki yıllarda Ki-Eun ve arkadaşları (2010) *Viburnum sargentii* köklerinin metanolik ekstraktını elde etmiş daha sonra bu köklerden çeşitli bileşikler izole ederek MCF-7 ve A 549 insan kanser hücre hatlarına 25 ve 100 μM dozlarında uygulayarak 24, 48 ve 72 saat kültüre ettikten sonra apoptoz ve hücre canlılığı yönünden test etmiş, sitotoksik ve apoptozu artırıcı etki gördüklerini kaydetmişlerdir (125). Aynı yıl içinde Bibi ve arkadaşları MCF-7 kanser hücre hattı üzerine *Viburnum foetens* yapraklarından elde ettikleri metanolik ekstraktla yaptıkları sitotoksikite testlerinde çeşitli polaritelerdeki metanolik ekstraktların artan derecelerde *in vitro* sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir (126).

Ceylan ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmanın *in vitro* basamağında EAT hücreleri altı kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 150.000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra DPBS'de çözdürülmüş 125, 250, ve 500 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında gilaburu liyofilize toz ekstraktı ile muamele edilerek 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildikten sonra herbir kuyucuktan alınan hücreler tripan mavisi ile boyanıp sayılarak canlı ve ölü EAT hücreleri sayıları belirlenmiş, bu parametre gilaburunun EAT hücreleri üzerine sitotoksikitesinin göstergesi kabul edilmiştir. Sonuç olarak gilaburu

gruplarının hepsinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir sitotoksosite gösterdiği ($p<0,05$), sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı, dolayısı ile en yüksek sitotoksosite gösteren gilaburu dozunun 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğu rapor edilmiştir (10).

Bu çalışmada EAT hücrelerine karşı sitotoksik etkileri incelenecek olan gilaburu toz ekstraktlarının dozları, yapılan pilot çalışmaya göre belirlendi (107). Çalışmada EAT hücrelerinin en üst seviyede invaziv etki göstermelerini sağlamak amacıyla direkt olarak stok hayvandan alınan canlı pasaj hücreleri kullanıldı, 24 kuyucuklu kültür kabına ekilen EAT hücreleri 3, 24 ve 48 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5 CO_2 'li ortamda kültüre edilerek her bir periyot sonunda hücrelerde canlılık oranı (sistotoksosite) yanı sıra hücrelerdeki apoptozu belirlemek için sıklıkla kullanılan Annexin V testi, hücre döngüsü ve mitotik aktivite gibi parametreleri değerlendirildi.

Çeşitli bitkisel ekstraktların kanser hücre hatları üzerine etkisini araştıran çalışmalarda Annexin V analizi sonucunda tedavi gruplarının apoptotik hücrelerin miktarını artırdığı rapor edilmiştir (127-129). Bizim çalışmamızda gilaburu meyve suyu ekstraktlarının 24 ve 48 saatlik kültür sonunda EAT hücreleri üzerindeki apoptozu artırdığı; bu artışın 50 kDa altı gilaburu gruplarında daha belirgin olduğu görüldü ($p<0,001$).

Birçok doğal fitokimyasal ürün, hücre döngüsündeki fazları durdurarak kanserli hücre çoğalmasını baskılayabilmektedir (128). G_0/G_1 fazında, ana hücre döngüsü düzenleyicilerinden olan Siklin E ve Siklin Bağımlı Kinaz -2'ın G_1 fazından S kontrol noktasına hücre geçişini teşvik için birleşerek oluşturdukları kompleksin fonksiyonunun baskılanması ile hücreler G_1 ila S kontrol noktası geçişinde durdurulmaktadır (130).

Lin ve ark. (2018) tarafından *Hedychium coronarium* bitkisinden elde edilen Coronarin D'nin insan hepatokarsinoma hücreleri üzerine *in vitro* etkisinin araştırıldığı çalışmada 24, 48 ve 72 saatlik kültür sonrasında yapılan hücre döngüsü testinde Coronarin D'nin hücre döngüsünü G_2/M fazında durdurduğu (128); Bognar ve ark. (2018) tarafından He-La hücre hattı üzerinde desethylamiodarone'un (DEA) etkisinin araştırıldığı çalışmada DEA'nın hücre döngüsünü G_0/G_1 fazında durdurduğu rapor edilmiştir (129).

Mao ve ark. (2010) tarafından SW480 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatları üzerine *Lycium barbarum* ekstraktının etkinliğinin araştırıldığı çalışmada ekstraktların G_0/G_1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu rapor edilmiştir (130). Yapılan mevcut çalışmada

gilaburu meyve suyu ekstraktlarının tümünün hücre döngüsünün G_0/G_1 fazında bulunan hücre miktarını artırdığı; bu artışın 50 kDa üstü gilaburu gruplarında daha fazla olduğu belirlendi.

Mitokondri aktivitesi temel apoptoz parametrelerinden Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktivasyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Mitokondriyal zar potansiyelindeki azalma, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'u aktive eden Sitokrom c'yi serbest bırakarak apoptozu başlatmaktadır (131).

Lewinska ve ark. (2015), Kim ve ark. (2017), Takeda ve ark. (2018), Lin ve ark. (2018) tarafından çeşitli bitki ekstraktlarının kanser hücre hatları üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarında tedavi gruplarının pozitif kontrol grubuna göre canlı hücre sayısını azalttığı, depolarize hücre sayısını artırmak suretiyle mitokondriyal zar potansiyelini anlamlı olarak azalttığı rapor edilmiştir (128,131-133). Yapılan bu çalışmada gilaburunun mitokondriyal zar potansiyelini azalttığı, toplam depolarize hücre yüzdesinin 50 kDa üstü 400 $\mu\text{g/ml}$ gilaburu grubunda en yüksek olduğu, canlı EAT hücresi yüzdesinin en düşük ve ölü EAT hücresi yüzdesinin en yüksek olduğu grubun yine 50 kDa üstü 400 $\mu\text{g/ml}$ gilaburu grubu olduğu görüldü.

Bulunan bu sonuçların apoptoz'la ilgili yapılan çalışmaların sonuçlarına benzerlik göstermesi, gilaburunun kanser hücreleri üzerinde apoptozu çeşitli mekanizmalarla artırdığını ve bu etkinin her iki gilaburu grubunda görülmekle birlikte 50 kDa üstü moleküler ağırlığa sahip gilaburuda daha net olduğunu kanıtlar niteliktedir. *In vivo* bulgular da bu sonucu desteklemektedir. Yapılan tez çalışmasının sonunda geleneksel tıbbın bir parçası olarak tüketilen gilaburu meyve suyunun kansere karşı uygun bir tedavi edici ajan adayı olabileceğini ve farklı moleküler ağırlıklarına dair yapılan bu araştırmanın kanser araştırmalarına katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. “International agency for Research on Cancer”, WHO, N^o 263, Geneva, Switzerland, September 2018: p 1-5.
2. WEB_1. (2018) Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK) www.tuik.gov.tr/basin-Odasi/haberler/2017_24_20170504.pdf (20.05.2018).
3. Khan M. γ -Sitosterol, a cytotoxic sterol from *Markhamia zanzibarica* and *Kigelia Africana*. *Fitoterapia* 1999; 70: 96–97.
4. Paur I, Balstad TR, Kolberg M, et al. Extract of oregano, coffee, thyme, clove, and walnuts inhibits NF- κ B in monocytes and in transgenic reporter mice. *Cancer Prev. Res* 2010; 3: 653–663.
5. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical reviews* 2009; 109 (7): 3012-3043.
6. Calcabrini C, Catanzaro E, Bishayee A, et al. Marine Sponge Natural Products with Anticancer Potential: An Updated Review. *Mar. Drugs* 2017; 15: 310.
7. Rop O, Reznicek V, Valsikova M, et al. Antioxidant properties of European cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). *Molecules* 2010; 15(6): 4467-4477.
8. Aksoy A, Guvensan A. Ethnoecology of *Viburnum opulus* L. In: International Symposium of Medicinal Plants: Linkages Beyond National Boundaries, Book of the Symposium, pp. 65-70, September 7-9. 2005, Islamabad, Pakistan.
9. Ulger H, Ertekin T, Karaca O, et al. Influence of Gilaburu (*Viburnum opulus*) Juice on 1,2 dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Cancer. *Toxicol Ind Health* 2012; 29(9): 824-829.

10. Ceylan D, Aksoy A, Ertekin T, et al. The effects of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on experimentally induced Ehrlich ascites tumor in mice. *Journal of cancer research and therapeutics* 2018; 14(2): 314.
11. American Cancer Society, "Cancer Facts & Figures" IARC, Atlanta 2017.
12. WEB_2. (2018). cancer.gov.tr. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (25.05.2018).
13. Kösebay D, Göker B. Dünyada ve Türkiye'de Jinekolojik Onkolojinin Tarihçesi. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 2012; 15(2): 31-49.
14. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi* 2007; 22(4): 197-204.
15. Karahasanoğlu H. Resveratrol'ün Kanser Tedavisindeki Yeri ve Önemi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2013: 7-13.
16. WEB_3. (2018). cancerresearch. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment> (20.05.2018)
17. Kurt H, Keşkek ŞÖ, Çil T, et al. Complementary/alternative therapies in patients with breast cancer. *Türk Onkoloji Dergisi* 2013; 28(1): 10-15.
18. Şarışen Ö, Çalışkan D. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat (!). *Sted* 2005; 14(8): 182-187.
19. Adaikan PG, Gauthaman K, Prasad RNV. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*. *The Aging Male* 2001; 4 (3): 163-169.
20. Kamboj VP. Herbal medicine. *Current science* 2008; 78(1): 35-39.
21. Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, et al. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochemical pharmacology* 2013; 86 (9): 1239-1247.
22. WahleKW, Brown I, Rotondo D, et al. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Bio-Farms for Nutraceuticals* 2010; 36-51.
23. Iwamoto LH, Vendramini-Costa DB, Monteiro PA, et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper*

- umbellatum L. leaves. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015; 8
24. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu S. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi 2011; 11(1): 52-67.
 25. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, et al. Plants used against cancer—an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of ethnopharmacology 2000; 73(3): 347-377.
 26. Ünalı ÜE. Tehdit ve Tehlike Altında Bir Kültür Bitkisi: Safran (*Crocus sativus* L.). Journal of Social Science 2007; 17(2): 53-67.
 27. Özel ÇA. Onkogenik *Agrobacterium tumefaciens* A281 Hattı ile Çivit Otu (*Isatis constricta* Davis) Bitkisinde Tümör Oluşumu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 2007; 13(4): 391-394.
 28. Çırak C, Kurt D. Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri ve Kullanım Alanları. Anadolu J. of AARI 2014; 24(1): 38-52.
 29. Moldovan B, Ghic O, Chisbora C, et al. The Influence of Storage on the Total Phenols Content and Antioxidant Activity of the Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) Fruits Extract. Rev. Chim. Bucharest 2012; 63: 463-464.
 30. Ersoy N, Ercisli S, Gundogdu M. Evaluation of European Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes for agro-morphological, biochemical and bioactive characteristics in Turkey. Folia Horticulturae 2017; 29(2): 181-188.
 31. Baytop T. Türkçe bitki adları sözlüğü (2. Baskı), Türk tarih kurumu, Ankara, 1997: 118-119.
 32. Leporatti ML, Ivancheva S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. Journal of ethnopharmacology 2003; 87(2-3): 123-142.
 33. Arslan Burnaz N. *Viburnum opulus* ve *V. orientale* Bitki Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 2007; 5-85.

34. WEB_4. (2018). U.S. Department of Agriculture. <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=VIOP> (07.05.2018).
35. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün (2. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999: 480.
36. Dinç M, Aslan D, İçyer NC ve ark. Gilaburu Suyunun Mikroenkapsülasyonu. *Electronic Journal of Food Technologies* 2012; 7(2): 1-11.
37. Yilmaztekin M, Sislioglu K. Changes in volatile compounds and some physicochemical properties of European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) during ripening through traditional fermentation. *Journal of food science* 2015; 80(4): 687-694.
38. Shange C. Dissertation submitted in partial compliance with the requirements of the Master’s Degree in Technology: Homoeopathy, Durban University of Technology Faculty of Health Sciences, Durban 2015.
39. Herrera CM. Vertebrate-dispersed plants of the Iberian peninsula: A study of fruits characteristics. *Ecological Monographs* 1987; 57: 305-331.
40. Boyacı H, Çöteli E, Karataş F. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) Meyvesindeki A, E Vitamini, Beta-Karoten, Likopen, Redükte ve Okside Glutatyon Miktarlarının Araştırılması. *Erzincan University Journal of Science and Technology* 2016; 9(2): 111-117.
41. WEB_5. (2018). Gobotany <https://gobotany.newenglandwild.org/species/-viburnum/opulus/> (08.05.2018).
42. Altun ML, Saltan-Çitoğlu G, Sever-Yılmaz B, et al. Antioxidant properties of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* Growing in Turkey. *Int J Food Sci Nutr*. 2008; 59(3):175-80.
43. Erdoğan-Orhan I, Altun ML, Sever-Yılmaz BA, et al. 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. *Fournal of Medicinal Food* 2011; 14(4): 434-440

44. Sağdıç O, Aksoy A, Ozkan G. Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant potentials of cranberry (Gilaburu *Viburnumopulus*) Fruit Extract. *Acta Alimentaria* 2006; 35: 487-492.
45. Cesoniene L, Daubaras R, Vencloviene J, et al. Biochemical and Agro Biological Diversity of *Viburnum opulus* Genotypes. *Central European Journal of Biology* 2010; 5 (6): 864-871.
46. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis Avoidance In Cancer. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 68-75.
47. Ömerli A. Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Böbrek Taşı Üzerine Gilaburu (*Viburnum opulus*) Suyunun Etkisi, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2016.
48. Zeybek Ü. Kanser Araştırmaları ve Deneysel Modeller. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2013; 2(5): 1-12.
49. Heijstek MW, Kranenburg O, Rinkes IHMM. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Digestive Surgery* 2005; 22:16-25.
50. Kemp CJ. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harbor Protocols* 2015; 10: 865-874.
51. Aykota MR. Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün ZN (II) ftalosiyanın molekülünün ratlarda deneysel tümör modelinde fototoksisitesinin incelenmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Denizli 2014.
52. Richmond A, Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Disease Models & Mechanisms* 2008; 1: 78-82.
53. Lettre R, Paweletz N, Werner D, et al. Sublines of the ehrlich-lettré mouse ascites tumour a new tool for experimental cell research. *Naturwissenschaften* 1972; 59(2): 59-63.
54. Özaslan M, Karagöz ID, Kılıç IH, ve ark. Ehrlich Ascites Carcinoma. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(13): 2375-2378.
55. Elsaid, FG. The effect of seeds and fruit pulp of *Adansonia digitata* L. (Baobab) on Ehrlich ascites carcinoma. *Food and Nutrition Sciences* 2013;4(08): 38.

56. Ertekin T, Ceylan D, Nisari M, Ülger H. Ehrlich Assit Tümör (EAT) Modeli. Sağlık Bilimleri Dergisi Journal of Health Sciences 2016; 25: 81-87.
57. İşler D. Ehrlich Asit Tümörü Taşıyan Swiss Albino Türü Farelerde Rho- Kinaz İnhibitörlerinden Y-27632 Maddesinin Antitümöral Etkisinin İn vivo Olarak Araştırılması. Yüksek lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep 2011.
58. Tannock IF. A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumors. Cancer research 1969; 29(8): 1527-1534.
59. Lazebnik YA, Medvedeva ND, Zenin VV. Reversible G2 block in the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma cells. Experimental cell research 1991; 195(1): 247-254.
60. Altun S, Ozalpan A. Interactive regeneration of liver and growth of Ehrlich ascites tumor in mice. Biologia-Bratislava 2004; 59(3): 375-382.
61. Klein G. 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 1951; 2: 518-573.
62. Debnath S, Karan S, Debnath M, et al. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis and Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma and in Sarcoma S-180 Tumor. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP 2017; 18(8): 2255.
63. Medhat D, Hussein J, El- Naggat ME, et al. Effect of Au-dextran NPs as anti-tumor agent against EAC and solid tumor in mice by biochemical evaluations and histopathological investigations. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017; 91:1006-1016.
64. Patel M, Antala B, Dowerah ES, et al. Antitumor activity of Pogostemon benghalensis Linn. on Ehrlich Ascites Carcinoma tumor bearing mice. Journal of cancer research and therapeutics 2014; 10(4): 1071.
65. Patra S, Muthuraman MS, Prabhu AR, et al. Evaluation of antitumor and antioxidant activity of Sargassum tenerrimum against Ehrlich ascites carcinoma in mice. Asian Pac. J. Cancer Prev 2015; 16(3): 915-921.

66. El-Far M, Salah N, Essam AO, et al. Silymarin nanoformulation as potential anticancer agent in experimental Ehrlich ascites carcinoma-bearing animals. *Nanomedicine* 2018; 13: 15.
67. Ali H, Yesmin R, Satter MA, et al. Antioxidant and antineoplastic activities of methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. Rhizome against Ehrlich ascites carcinoma cells. *Journal of King Saud University-Science* 2018; 30(3): 386-392.
68. Ozaslan M, Karagoz ID, Lawal RA, et al. Cytotoxic and Anti-proliferative Activities of the *Tetrapleura tetraptera* Fruit Extract on Ehrlich Ascites Tumor Cells. *International Journal of Pharmacology* 2016; 12(6): 655-662.
69. Kim D, Song J, Ahn C, et al. Peroxisomal dysfunction is associated with up-regulation of apoptotic cell death via miR-223 induction in knee osteoarthritis patients with type 2 diabetes mellitus. *Bone* 2014; 64: 124-131.
70. Reed E, Jacob J, Ozols RF, et al. 5-Fluorouracil (5-FU) and leucovorin in platinum-refractory advanced stage ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1992; 46 (3): 326-329.
71. Yoshimoto M, Tada K, Tokudome N, et al. The potential for oral combination chemotherapy of 5'-deoxy-5-fluorouridine, a 5-FU prodrug, and cyclophosphamide for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89 (9):1627-32.
72. Ijichi K, Adachi M, Hasegawa Y, et al. Pretreatment with 5-FU enhances cisplatin cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62(5): 745-752.
73. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(5): 330.
74. Cooper GM. Programmed cell death. *The cell*. In: Cooper GM (ed) Chapter 14. Washington: ASM Pres1994; 592: 6.
75. Güneş, Hasan Veysi. *Moleküler hücre biyolojisi*. İstanbul Tıp Kitabevi, 2014
76. WEB_6. (2018). Earthslab. [https://www.earthslab.com/physiology/the-cell-cycle/\(30.09.2018\)](https://www.earthslab.com/physiology/the-cell-cycle/(30.09.2018)).
77. Bozcuk NA. *Genetik*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2000: 320.

78. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, et al. Genetik kavramlar (8. ed), Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.
79. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 9(3): 51-61.
80. Onal M, Ovet G, Onal O. Review of apoptosis.MOJ Immunol 2016; 3(1): 00073.
81. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. Türkiye Klinikleri Archives of Lung 2003; 4(3): 165-174.
82. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infection and immunity 2005; 73(4): 1907-1916.
83. Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging (Albany NY) 2016; 8(4): 603.
84. Sarioğlu S, Ataman Ş. Apoptoz. Türkiye Klinikleri Journal of Physical Medicine Rehabilitation 2003; 3(1):37-44.
85. Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z. Apoptozis. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi 2012; 3(11): 26-37.
86. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. Jama 1998; 279(4): 300-307.
87. DesagherS, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends in cell biology 2000; 10(9): 369-377.
88. Akmeşe Ş. Varikoselli hastalarda immunohistokimyasal yöntem kullanarak spermlerdeki apoptozisin saptanması ve apoptozis ile sperm parametreleri, serum ve seminal plazmadaki TAS-TOS seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması, Yüksek lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa 2016.
89. Abbro L, Dini L. Common morphological features of apoptotic cell blebs. Italian Journal of Zoology 2003; 70(4): 297-299.

90. Yıldırım İH, Koçak N, Cing Yıldırım S. Programlı hücre ölümü; literatür bilgilerinin Türkçe derlemesi. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2012; 2: 58-66.
91. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. Cell 2001; 104(3): 325-328.
92. Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. Saudi journal of biological sciences 2015; 22(6): 760-772.
93. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology 2007; 35(4): 495-516.
94. Güleş Ö, Ülker E. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008; 19(2): 73-78.
95. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, et al. "Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. Biotechniques 1997; 23(3): 525-531.
96. Kawaminami M, Kawamoto T, Tanabe T, et al. Immunocytochemical localization of annexin 5, a calcium-dependent phospholipid-binding protein, in rat endocrine organs. Cell and tissue research 1998; 292(1): 85-89.
97. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. Journal of immunological methods 1995; 184(1): 39-51.
98. Homburg CH, Haas M, Von dem Borne AE, et al. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. Blood 1995; 85(2): 532-540.
99. Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. Journal of Biological Chemistry 1989; 264(14): 7944-7949.
100. Andree HA, reutelingsperger CP, Hauptmann R, et al. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. Journal of Biological Chemistry 1990; 265(9): 4923-4928.

101. Van Heerde WL, Groot PG, Reutelingsperger CPM. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thrombosis and haemostasis* 1995; 74(02): 172-179.
102. Krysko DV, Roels, Leybaert L, et al. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2001; 49(10): 1277-1284.
103. WEB_7. (2018). Merck millipore. http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product-/Muse-Mitopotential-Assay-Kit,MM_NF-MCH100110#anchor_UG (20.08.2018).
104. Debbasch C, Pisella PJ, Saint Jean M, et al. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved β -blockers on Chang conjunctival cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001; 42(11): 2525-2533.
105. WEB_8. (2019). Gilaburucu www.gilaburucu.com/icerik.asp?icid=58 (14.01.2019).
106. Moore DM, MS, DVM, Aclam D. *Laboratory animal medicine and Science Series II Rat and Mice Biology*. 2000; Office of the animal resources Virginia polytechnic instute and state university.
107. Al Ö, Ülger H, Ertekin T, et al. The Effect of Gilaburu (*Viburnum opulus*) Juice on Ehrlich Ascites Tumor (EAT) Cell Culture. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 2017; 1(10): 1051.
108. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology* 2005; 100 (1-2): 72-79.
109. Erdogan-Orhan I, Altun ML, Sever-Yilmaz B, et al. Antiacetylcholinesterase 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* 2011; 14(4): 434-440.
110. Soylak M, Elci L, Saracoglu S, et al. Chemical analysis of fruit juice of European cranberrybush (*Viburnum opulus*) from Kayseri-Turkey. *Asian Journal of Chemistry* 2002; 14(1): 135.

111. Ovodova RG, Golovchenko VV, PopovSV, et al. The isolation, preliminary structural studies, and physiological activity of water-soluble polysaccharides from the squeezed berries of the snowball tree *Viburnum opulus*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2000; 26(1): 54-59.
112. Saltan G, Süntar I, Ozbilgin S, Ilhan, et al. *Viburnum opulus* L.: A remedy for the treatment of endometriosis demonstrated by rat model of surgically-induced endometriosis. *Journal of ethnopharmacology* 2016; 193: 450-455.
113. Ildiz N, Baldemir A, Altinkaynak C, et al. Self assembled snowball-like hybrid nanostructures comprising *Viburnum opulus* L. extract and metal ions for antimicrobial and catalytic applications. *Enzyme and microbial technology* 2017; 102: 60-66.
114. Eken A, Boşgelmez İİ, Çermik AH, et al. An investigation on protective effect of *viburnum opulus* l. fruit extract against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress after lung transplantation in rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017; 23(3): 437-444.
115. Altun ML, Özbek H, Çitoğlu GS, et al. Hepatoprotective and Hypoglycemic Activities of *Viburnum opulus* L. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science* 2010; 7: 35-48.
116. Sagdic O, Ozturk I, Yapar N, et al. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food research international* 2014; 64: 537-545.
117. Sariözkan S, Türk G, Eken A, et al. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruit extract alleviates testis and sperm damages induced by taxane-based chemotherapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 95: 1284-1294.
118. Rajeshwar Y, Gupta M, and Mazumder UP. Antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Iranian Journal of pharmacology and Therapeutics* 2005; 4(1): 46-50.

119. Ozaslan M, Karagöz ID, Kalender ME, et al. In vivo antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on Balb/C mouse with Ehrlich ascites tumor. *The American journal of Chinese medicine* 2007; 35(5): 841-851.
120. Çınar Ş. Çemen Ekstraktının Antitümöral Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2016.
121. Mota NS, Kwiecinski MR, Zeferino RC, et al. In vivo antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Rich in medium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction. *Food and Chemical Toxicology* 2018; 118: 557-565.
122. ShenYC, Prakash CV, Wang LT, et al. New vibsane diterpenes and lupane triterpenes from *Viburnum odoratissimum*. *Journal of natural products* 2002; 65(7): 1052-1055.
123. Fukuyama Y, Minoshima Y, Kishimoto Y, et al. Cytotoxic iridoid aldehydes from Taiwanese *Viburnum luzonicum*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 2005; 53(1): 125-127.
124. El-Gamal A. Cytotoxic lupane-, secolupane-, and oleanane-type triterpenes from *Viburnum awabuki*. *Natural product research* 2008; 22(3): 191-197.
125. Bae KE, Chong HS, KimDS, et al. Compounds from *Viburnum sargentii* Koehne and evaluation of their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Molecules* 2010; 15(7): 4599-4609.
126. Bibi Y, Nisa S, Waheed A, et al. Evaluation of *Viburnum foetens* for anticancer and antibacterial potential and phytochemical analysis. *African journal of biotechnology* 2010; 9(34): 5611-5615.
127. Kim HJ, You MK, Lee YH, et al. Red pepper seed water extract inhibits preadipocyte differentiation and induces mature adipocyte apoptosis in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research and Practice* 2018; 12(6): 494-502.
128. Lin HW, Hsieh MJ, Yeh CB, et al. Coronarin D induces apoptotic cell death through the JNK pathway in human hepatocellular carcinoma. *Environmental toxicology* 2018; 33(9): 946-954.

129. Bogнар Z, Fekete K, Bogнар R, et al. Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone induces apoptosis in human cervical cancer cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2018; 96(10): 1004-1011.
130. Mao F, Xiao B, Jiang Z, et al. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med Oncol* 2011; 28:121–126.
131. Takeda T, Tsubaki M, Tomonari Y, et al. Bavachin induces the apoptosis of multiple myeloma cell lines by inhibiting the activation of nuclear factor kappa B and signal transducer and activator of transcription 3. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 100: 486-494.
132. Lewinska A, Siwak J, Rzeszutek I, et al. Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. *Toxicology in Vitro* 2015; 29(3): 417-425.
133. Kim EJ, Kim GT, Kim BM, et al. Apoptosis-induced effects of extract from *Artemisia annua* Linné by modulating PTEN/p53/PDK1/Akt/signal pathways through PTEN/p53-independent manner in HCT116 colon cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine* 2017; 17(1): 236.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Özge AL
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri : 14.08.1988, Elazığ
Medeni Durumu : Evli
Tel : +90 5343535591
E-mail : ozgeal@erciyes.edu.tr
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı,
38039 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi, Elazığ	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-2012	Dicle Üni.Veteriner Fak. Cerrahi A.D.	Araştırma Görevlisi
2012-2013	Ankara Üni.Veteriner Fak. Cerrahi A.D.	Araştırma Görevlisi
2013-Halen	Erciyes Üni. Tıp Fak. Anatomi A.D.	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce,