

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANILAN
L-MANDELONİTRİL- B- GENTİOBİOSİD' İN RATLARDA YAPAY
OLUŞTURULMUŞ MEME KANSERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UFUK GÜNAY DOĞAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA
OCAK 2020**

Tezin Başlığı: Gıda Takviyesi Olarak Kullanılan L-Mandelonitril- β -Gentiobiosid' in Ratlarda Yapay Oluşturulmuş Meme Kanserine Etkisinin Araştırılması

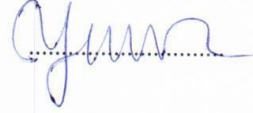
Tezi Hazırlayan: Ufuk Günay DOĞAN

Sınav Tarihi: 28.01.2020

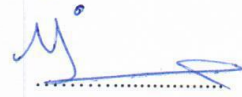
Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Tez Danışmanı : **Prof.Dr. Muhittin YÜREKLİ**
İnönü Üniversitesi



Jüri Başkanı : **Prof.Dr. Mehmet İlker DOĞRU**
Aksaray Üniversitesi



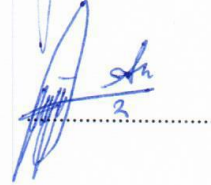
Prof.Dr. Dilek ASMA
İnönü Üniversitesi



Doç.Dr. Hüseyin KAHRAMAN
İnönü Üniversitesi



Doç.Dr. Arzu DOĞRU
Aksaray Üniversitesi



Prof. Dr. Kazım TÜRK

Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Gıda Takviyesi Olarak Kullanılan L-Mandelonitril- β -Gentiobiosid’ in Ratlarda Yapay Oluřturulmuř Meme Kanserine Etkisinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışmanın, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dūřecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ufuk Günay DOĞAN

ÖZET

Doktora Tezi

GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANILAN L-MANDELONİTRİL- β - GENTİOBİOSİD' İN RATLARDA YAPAY OLUŞTURULMUŞ MEME KANSERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ufuk Günay DOĞAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anbilim Dalı

76+ x sayfa

OCAK 2020

Danışman: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda görülen önemli bir sağlık problemidir. Meme kanserinin bilimsel tıbbi tedavisinde kullanılan yöntemlerinin başarı şansının görece düşük olması ya da tedaviye bağlı ağır yan etkileri olması nedeniyle hastalar alternatif tıbbi yöntemleri kullanmayı tercih edebilmektedir.

Alternatif tıp, başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde, hastalığın semptomlarını hafifletmek ve hastaların yaşam kalitesini arttırmak için dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerde çok yaygın olarak bulunan parazit ve otoburlara karşı savunmada kullanılan siyanojenik glikozitlerden amigdalin önemli bir kimyasal ajan konumundadır. Acı kayısı çekirdeğinden elde edilen amigdalin'in pek çok kanser türlerinde anti-tümör etkinliği belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada, amigdalin'in meme kanseri üzerindeki koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada yerel pazardan alınan acı kayısı çekirdeğinden amigdalin elde edilmiştir. Elde ettiğimiz amigdalin'in FTIR yöntemi ile kalitatif analizi yapılarak ve SEM elektron mikroskopunda görüntülenerek varlığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise yapay yöntemle kanser yapılan sıçanlarda amigdalin'in olası etkileri araştırılmıştır. Bu aşamada deney hayvanları koruma (10 mg amigdalin) ve tedavi (50 mg amigdalin) uygulaması olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplar aynı zamanda kendi aralarında dozaja bağlı farklı gruplara ayrılmıştır. Tedavi grubunda ayrıca kanser tedavisinde kullanılan Tamoksifen ilacı (0.05) mg deneklere verilmiştir.

Koruma gruplarında hem BRCA1, BRCA2 ifadeleri hem de kandaki bakır ve çinko seviyeleri analiz edilmiştir. Amigdalin uygulamasıyla BRCA1 ve BRCA2 düzeyleri kontrole göre hafif artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca koruma grubunda kontrole göre kandaki bakır seviyelerine bakıldığında artış gözlenirken, çinko seviyelerinde ise kanserli hücrelerde belirgin bir düşüş gözlenmiştir.

Tedavi gruplarında kontrol gruplarına göre BRCA1 ve BRCA2 düzeylerinin meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen değerlerinde olduğu gibi yükselme göstermiştir. Hem amigdalin A ve B hem de tamoksifen uygulanan gruplarda BRCA2 düzeyleri BRCA1'e göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, amigdalin'in meme kanserinden korunma ve tedavisinde etkili bir ajan olarak kullanılabilceği fikrini vermektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Amigdalin, Meme kanseri, BRCA1, BRCA2, Tamoksifen



ABSTRACT

Ph. D.Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF L-MANDELONITRILE- B- GENTIOBIOSID USED AS FOOD SUPPLEMENTS ON ARTIFICIAL BREAST CANCER IN RATS

Ufuk Günay DOĞAN

Inonu University
Graduate School of Natural and
Applied Sciences Department of Biology

76+ x pages

JANUARY 2020

Supervisor: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ (Ph.D.)

Breast cancer is an important health problem in women World wide. Because the methods used in scientific medical treatment of breast cancer have a relatively low chance of successor have severe side effects due to treatment, patients may choose to use alternative medical methods.

Alternative medicine is widely used in the treatment of many diseases, especially cancer, in the World to all eviate the symptoms and improve the quality of life of patients. Amygdaline, one of the cyanogenic glycosides used in defense against parasite sand herbivores, which is very common in plants, is an important chemical agent. Anti-tumor efficacy of amygdalin obtained from bitter apricot kernel has been determined in many cancer types. In this study, we aimed to investigate the protective and therapeutic effects of amygdaline on breast cancer.

This study was carried out in two stages. In the first stage, amygdalin was obtained from bitter apricot kernel from the local market. The presence of amygdalin was determined by qualitative analysis by FTIR method and visualized by SEM electron microscope. In the second stage of our study, the possible effects of amygdaline in rats treated with artificial cancer were investigated. At this stage the experimental animals were divided in to two groups as protection (10 mg amygdalin) and treatment (50 mg amygdalin). These groups are also divided into different dosage-dependent groups among themselves. In the treatment group, Tamoxifen drugused in the treatment of cancer was administered to 0.05 mg subjects.

Both BRCA1, BRCA2 levels and copper and zinc levels in blood were analyzed in protection groups. BRCA1 and BRCA2 maintained their levels with amygdalin administration and a slight increase in relative to control was analyzed. In addition, the protection group showed an increase in copper levels in the blood when compared to the control, while the zinc levels did not decrease significantly in cancer cells.

In the treatment groups, BRCA1 and BRCA2 levels increased as in tamoxifen values used in the treatment of breast cancer compared to the control groups. Both amygdalin A, B and tamoxifen treated groups were found to have higher BRCA2 level than BRCA1.

The results of this study suggest that amygdalin can be used as an effective agent in the prevention and treatment of breast cancer.

KEYWORDS: Amygdaline, Breast cancer, BRCA1, BRCA2, Tamoxifen

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini benden esirgemeyen, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan çok değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocam Sayın Doç. Dr. Yunus ÖNAL'a,

Tez sürecinde yapılan toplantılarda fikirlerini ve önerilerini paylaşan tez izleme komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Dilek ASMA'ya ve Sayın Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN'a,

İstatistiksel çalışmalarımda desteğini benden esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ'a,

Manevi desteklerinden dolayı Sayın Kimyager Hatice ÖNAL'a ve Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER'e,

Gıda takviyesi olarak kullanılan L-Mandelonitril- β -Gentiobiosid' in ratlarda yapay oluşturulmuş meme kanserine etkisinin araştırılması (BAP FDK-2017-973) konulu projemizi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne,

Canım annem ve kardeşlerime, artık aramızda olmayan ilk öğretmenim sevgili babama,

Her daim yanımda olan sevgili eşim Demet DOĞAN'a, biricik oğlum Ömer Berk'e,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.....

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Siyanür.....	5
1.2.1. Siyanür metabolizması.....	8
1.2.2. Siyanür'ün canlı organizmalar üzerindeki etkisi	10
1.3. Siyanojenik glikozitler.....	12
1.3.1. Amigdalin.....	15
1.3.2. Amigdalin'in kimyasal yapısı.....	16
1.3.3. Amigdalin'in etki mekanizması.....	19
1.4. Laetril.....	20
1.5. Kanser.....	21
1.5.1. Meme kanseri.....	25
1.5.2. Meme kanserinde biyoreseptörler.....	27
1.5.2.1. BRCA-1.....	28
1.5.2.2. BRCA-2.....	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Çalışmada kullanılacak amigdalinler.....	39
3.1.1. Çalışmada kullanılan ajanlar.....	39
3.1.2. Çalışmada kullanılan siyanoglukozit bitki.....	39
3.1.3. Ekstraksiyon ve izolasyon prosedürü.....	39
3.1.4. İzoleamigdalin FT-IR analizi.....	40
3.2. Amigdalinin meme kanseri üzerine etkisine yönelik deneyler.....	40
3.2.1. Çalışmada kullanılan ajanlar.....	40
3.2.2. Çalışmada kullanılan karsinojenik ajan.....	40
3.2.3. Çalışmada kullanılacak olası anti-karsinojenik ajanlar.....	41
3.2.4. Çalışmada kullanılacak anti-karsinojenik ajan.....	41
3.2.5. Çalışmada kullanılan deney hayvanı.....	41
3.2.6. Çalışmada uygulanan deney protokolü.....	41
3.2.7. Deney periyodunun sonlanması.....	42
3.2.8. Koruma grubu kan örnekleri Cu ve Zn ICP OES element analizleri.....	43
3.2.8.1. Çözünürleştirme işlemleri.....	43
3.2.8.2. İndüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analiz işlemleri.....	43
3.2.9. Meme dokusunun ELISA testi için hazırlanması.....	44
3.2.10. Çalışmada kullanılan BRCA 1/ BRCA 2 biyobelirteç protokolü....	44
3.2.11. İstatistiksel analiz.....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	45
4.1. Amigdalin eldesi.....	46

4.2.	Hayvan deneyleri.....	48
4.2.1.	Kanser koruma grubu.....	49
4.2.1.1.	Kanser koruma grubunda organların morfolojik görünümü.....	49
4.2.1.2.	Kanser koruma grubunda BRCA1 ve BRCA2 protein aktiviteleri...	51
4.2.1.3.	Kanser koruma grubunda, kanda bakır ve çinko element değerleri..	53
4.2.1.4.	Kanser koruma grubu istatistiksel analiz değerleri.....	55
4.2.2.	Kanser tedavi grubu.....	56
4.2.2.1.	Kanser tedavi grubunda organların morfolojik görünümü.....	56
4.2.2.2.	Kanser tedavi grubunda BRCA1 ve BRCA2 protein aktiviteleri....	58
4.2.2.3.	Kanser koruma grubunda, kanda bakır ve çinko element değerleri..	60
4.2.2.4.	Kanser tedavi grubu istatistiksel analiz değerleri.....	60
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	61
6.	KAYNAKLAR	64
	ÖZGEÇMİŞ	74



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Çevrede siyanür kaynakları.....	7
Şekil 1.2.	Siyanürün metabolik yolları.....	9
Şekil 1.3.	Siyanürün hücre sel solunum üzerindeki etkisi.....	10
Şekil 1.4.	Doğal amigdalin'in aktif formu.....	17
Şekil 1.5.	Amigdalin'in hidrojen siyanüre dönüşümü.....	18
Şekil 1.6.	Neoamigdalin.....	19
Şekil 1.7.	D-Mandelonitril-β-glukuronid veya laetril.....	21
Şekil 1.8.	Kadınlardaki kanser türleri ve oranları.....	26
Şekil 4.1.	Amigdalinlerin SEM elektron mikroskopu görüntüleri.....	47
Şekil 4.2.	Amigdalin A, B, FT-IR analizi.....	47
Şekil 4.3.	Ratlarda kanser oluşum başlangıcı.....	49
Şekil 4.4.	DMBA enjeksiyonu ile beraber 10 mg Amigdalin A uygulanan ratların sağlıklı kontrole göre organlarda oluşan morfolojik farklar.....	50
Şekil 4.5.	DMBA enjeksiyonu ile beraber 10 mg Amigdalin B uygulanan ratların sağlıklı kontrole göre organlarda oluşan morfolojik farklar.....	50
Şekil 4.6.	BRCA 1'nin kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B düzeylerinin karşılaştırılması(%).....	51
Şekil 4.7.	BRCA2'nin kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B düzeylerinin karşılaştırılması(%).....	52
Şekil 4.8.	Kandaki Bakır (Cu) yüzdesi, kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B'nin miktarı(%).....	53
Şekil 4.9.	Kandaki Çinko (Zn) yüzdesi, kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B'nin miktarı(%).....	54
Şekil 4.10.	Tedavi grubu ratlara gavaj yolu ile 50 mg Amigdalin A uygulaması.....	56
Şekil 4.11.	Tedavi grubu ratlara gavaj yolu ile 50 mg Amigdalin B uygulaması.....	57
Şekil 4.12.	Tedavi grubu ratlara gavaj yolu ile 0,05 mg Tamoksifen uygulaması.....	57
Şekil 4.13.	BRCA 1'in kanser tedavi grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A, Amigdalin B ve Tamoksifen uygulamasının karşılaştırılması (%).....	58
Şekil 4.14.	BRCA 2'nin kanser tedavi grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A, Amigdalin B ve Tamoksifen uygulamasının karşılaştırılması (%).....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	TAT terapilerinin başlıca kategorileri.....	3
Çizelge 1.2.	Siyanojenik glikozit içeren bazı bitki çeşitleri.....	14
Çizelge 3.1.	kan örnekleri için uygulanan mikrodalga çözünürleştirme programı.....	43
Çizelge 4.1.	Koruma grubu deneklerin istatistiksel analizi.....	55
Çizelge 4.2.	Tedavi grubu deneklerin istatistiksel analizi.....	60



SİMGELER VE KISALTMALAR

TAT	Tamamlayıcı ve alternatif tıp
NCCAM	Ulusal tamamlayıcı ve alternative sağlık merkezi
KBRN	Kimyasal biyolojik radyolojik nükleer tehditler
EPA	Çevre Koruma Ajansı
US-FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
MPST	3-merkaptopiruvat kükürt transferaz enzimi
BRCA	Meme kanser geni
HPV	İnsan papilloma virüsü
IARC	Uluslararası kanser araştırma ajansı
DMBA	Dimetilbenz [a]antrasen



1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

İnsanlık tarihinin başlangıcından modern zamanlara kadar hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkisel kaynaklı ilaçlar, modern tıbbın doğmasından günümüze değin hastalar tarafından, tıp otoritelerince reddedilmesine rağmen tamamlayıcı ve destek amaçlı olarak kontrolsüzce kullanılmaya devam etmektedir. Günümüzde halen bazı ülkelerde reçetesiz olarak ilaç sınıfında satışına izin verilen bitkisel kaynaklı bu ürünler, aynı zamanda da bilgi çağının nimetlerinden faydalanılarak internet üzerinden tüm dünyaya gıda takviyesi adı altında kimi ülkelerin yasal sınırlamalar koymasına rağmen kontrolsüzce satışı yapılmaktadır.

Teknolojinin ilerlemesiyle bitkisel ilaçların yerini modern tıpta, sentetik ve yarı sentetik üretilen ilaçlar almıştır. Bu ilaçların piyasaya sürülmesi önceden standardize edilmiş ve hastaya ulaşmadan belirli protokoller zincirinde araştırmalara tabi tutulması uluslararası anlaşmalarla zorunlu kılınmıştır. Dev sanayili ilaç şirketlerinin Ar-Ge çalışmaları sonucunda ortaya çıkan, piyasaya çıkmadan önce deney hayvanları ve ardından yasal izinle hedef hastalıktan muzdarip gönüllü insanlar üzerinde denendikten sonra peş peşe olumlu sonuçlar alındığı rapor edilmesiyle gerekli izinler alan üretici firma tarafından satışa çıkarılan ve ilgili ülkelerin sağlık yetkililerince onanarak eczanelerde son kullanıcıya satılan daha güvenli olduğu iddia edilen kimyasal ilaçlar almıştır. Ama bunca katı kurallara rağmen bu sistematik prensiplerden geçen ve hastalara ulaştırılan kimyasal ilaçlardan daha sonra insanlar üzerinde önceden öngörülmeven yan etkilerinin ortaya çıkmasından dolayı, geri toplatılanlar da olduğu yaşanan bir gerçektir.

Öte yandan yaşadığımız çağda, otoritelerce güvensiz kabul edilip satışı ve yöntemleri birçok ülkede yasaklandığı halde, tedavi adı altında çeşitli kürler içeren adjuvan metotlar, popülaritesini canlı tutarak hasta insanların modern tıbbın tedavi yöntemlerinin yanında çoğunlukla destek maksadıyla tamamlayıcı ve alternatif tıp (Complementary and Alternative Medicine-TAT)'a başvurulması son yıllarda kimyasal ve sentetik ilaçlara göre tekrar giderek artan bir ivme kazanmıştır [1]. TAT,

sağlık hizmetlerinin sağlandığı kurumların dışında büyük ölçüde var olan geniş çaplı şifa konseptleri, yaklaşımları ve tedavileridir. Tam olarak ne olduğu ve bu terim altında hangi tedavi yöntemlerinin özetlenmesi gerektiği konusunda önemli bir belirsizlik olmakla beraber [2], tamamlayıcı terapi yöntemleriyle alakalı bir Amerikan kuruluşu olan, Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Sağlık Merkezi (NCTAT) tarafından Çizelge 1.1’de gösterilen, farmakolojik ve biyolojik tedaviler, alternatif tıbbi sistemler, manipülatif ve vücut bazlı yöntemler, zihin-beden müdahaleleri, beslenme terapötikleri, enerji, egzersiz ve manevi terapiler gibi sekiz ana kategoride sınıflandırılan 200’den fazla konvansiyonel olmayan terapiler zincirini içerir [3, 4, 5]. Bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin hastalarca tüketimi bu tedavi yöntemlerinin olmazsa olmazıdır [6].

Bitkisel ilaçların hastalarca kullanım nedenlerinin başında, geleneksel ve kemoterapötik tedavi yöntemlerindeki memnuniyetsizlik ve yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır [1, 7]. Ayrıca hekim ve ilaçlara erişimin zor olduğu Afrika ve Asya’daki ülkelerde, bitkisel tedavi tıbbi tedaviden daha yaygın olarak yapılmaktadır [3]. Kemoterapik ve radyoterapik tedavilerin başarı yüzdesi oldukça sığ olduğundan terapi esnasında yüksek toksik madde içeren ilaçların yan etkilerinin azaltılarak tedavi sürecinde yaşam kalitesinin artırılması [7] ve bundan daha önemlisi tedavi başarısızlığı gerçekleştiğinde hastalarda, başka seçenekleri kalmamış hissiyatı uyanınca tamamlayıcı ve TAT tedavinin etkin bir parçası haline gelir [8]. Doğal bileşiklerin hastalarca destek amaçlı yaygın kullanımının aksine, bunların tedavideki etkinlikleri hakkındaki bilgi günümüzde bile oldukça azdır.

Kanser, çağın vebası olarak adlandırılmaktadır. TAT özellikle yüksek tümör tedavisi alan hastalar arasında oldukça popülerdir. Son yıllarda yapılan istatistiksel araştırmalara göre Amerika Birleşik Devletler’inde kanserli hastaların %80’i, Avrupa’da kanser hastalarının %50’den fazlası geleneksel tedaviyle eşzamanlı TAT’a da başvurmaktadır [1, 7]. Almanya’da yapılan bir araştırmada çeşitli yayınlardan toplanan verilere göre alternatif tıp yöntemleri, onkolojik hastalıklara yakalanan insanlar arasında %90 kullanım oranı gösterdiği tespit edilmiştir. Kullanıcıların çoğunluğu güvenliği ve etkinliği için TAT’da: diyet ve besin takviyelerine (yaklaşık %75), vitaminlere (%50)ve fitoterapiye (yaklaşık %25-35) ek olarak başvurmuştur [9].

Çizelge 1.1. TAT terapilerinin başlıca kategorileri [5]

Tedavi Yöntemi	Tanım	Örnekler
Alternatif Tıbbi Sistemler	Alternatif tıbbi sistemler, teori ve uygulamanın eksiksiz sistemleri üzerine kuruludur.	Akupunktur, Ayurveda, Homeopati, Naturopati, Geleneksel Çin Tıbbı, Tibet Tıbbı
Enerji Terapileri	Biyolojik alan terapileri , insan vücudunu çevreleyen ve içine giren enerji alanlarını etkilenmesi amaçlanmıştır. Bu tür alanların varlığı henüz bilimsel olarak kanıtlanmamıştır. Elektromanyetik tabanlı tedaviler , darbeli alanlar, manyetik alanlar veya alternatif akım veya doğru akım alanları gibi geleneksel olmayan elektromanyetik alanların kullanılmasını içerir.	Q i toplamı, reiki, terapötik dokunuş Darbeli (navızlı) elektromanyetik alanlar, Miknatis tedavisi
Egzersiz Terapileri	İnsan sağlığını geliştiren egzersiz ve hareket sistemlerini içerir.	T'aichi, yoga asana
Manipülatif ve Vücut Bazlı Yöntemler	TAT'da manipülatif ve vücut temelli yöntemler, vücudun bir veya daha fazla bölümünün manipülasyonuna ve/veya hareketine dayanır.	Kayropraktik, Tedavi edici masaj, Osteopati, Refleksoloji
Zihin-Beden Müdahaleleri	Zihin-beden tıbbı, zihnin bedensel fonksiyon ve semptomu etkileme kapasitesini arttırmak için tasarlanmış çeşitli teknikler kullanır.	Meditasyon, Hipnoz, Sanat terapisi, Görüntü, Gevşeme terapisi, Destek grupları, Müzik terapisi, Bilişsel-davranışsalterapi, Aromaterapi
Beslenme Terapötikleri	Beslenme terapötikleri, besleyici maddeler ve besleyici olmayan maddeler, kemo-önleyici maddeler olarak kullanılan biyoaktif besin bileşenleri ve kanser önleme veya tedavi stratejileri olarak kullanılan özel besinler veya diyetlerdir.	Vejetaryen ve Makrobiyotik diyet, Gerson terapisi, Kelley/ Gonzalez rejimi, Vitaminler, Soya fitoöstrojenler, Antioksidanlar, Selenyum, Koenzim Q10
Farmakolojik ve Biyolojik Tedaviler	Farmakolojik ve biyolojik tedaviler, bazı reçeteli ilaçların, hormonların, karmaşık doğal ürünlerin, aşuların ve genel tıpta henüz kabul edilmeyen diğer biyolojik müdahalelerin reçetesiz kullanımını içerir.	Antineoplastonlar, 714X, Düşük doz naltrekson, İmmüno-koruyucu tedavi, Laetril, Hidrazin sülfat, Melatonin
Alt kategori: <i>Karmaşık Doğal Ürünler</i>	Hastalıkların tedavi edilmesi amaçlı, bitkilerden veya deniz canlılarından elde edilen ham madde özütlerinden elde edilen karışımlar.	Otlar ve bitkisel özler, Ökseotu, Çay polifenol karışımları, Köpekbalığı kıkırdağı
Manevi Terapiler	Bir insanı barış hissi, başkalarıyla bağlantısı ve hayatın anlamı, amacı hakkındaki inançlar da dahil olmak üzere derin, çoğunlukla dini inanç ve hislere odaklayan terapilerdir.	Şifa dua, Manevi şifa

Siyanürün varlığı yazılı eski Mısır ve Roma tarihinden beri bilinmektedir. Eski yazıtlarda önemli insanların rakiplerini, düşmanlarını ve zorda kaldıklarında kendi kendilerini modern bilim tarafından siyanojenik glikozit içerikli olduğu bilinen meyvelerden yapılmış içeceklerle öldürdüğü yazılmıştır. Daha sonra kimyasal yöntemlerle saflaştırarak elde edilen siyanür tuzları tarihin çeşitli zamanlarında silah olarak kullanılmıştır [10]. Ama asıl olan genel kullanım ikincil metaboliti hidrojen siyanür (HCN) olan siyanoglikozit içerikli bitkiler şifacılar ve alternatif tıp uzmanlarınca basit hastalıklardan başa çıkması zor hastalıklara kadar insanları kurtarmak için yapılan macun, şurup vb. de kullanılmıştır.

Siyanojenik glikozit içerikli organik bileşik içeren bitkiler, öteden beri TAT'ın ilgi alanına girmektedir. Doğada en çok karşılaşılan siyanojenik glikozitlerden olan amigdalin en fazla kayısı, badem, kiraz, elma, erik, armut ve şeftali gibi Rosaceae familyasından *Prunus* cinsi meyvelerin çekirdeklerinde bulunur [11]. İçeriğindeki HCN sebebiyle özellikle kanser hastalığıyla konvansiyonel olmayan mücadele amaçlı yapılan pek çok kürde kullanılmıştır.

Amigdalin'in hastalıklardaki başarısı üzerinde kanıta dayalı araştırmalar geçmişten günümüze kadar yeterince irdelenmemiştir ve bu çalışmaların bilimsel bulguları hala tartışmalıdır. Karşıtları amigdalin'in etkisiz ve hatta toksik olduğu kanısında iken [12, 13], savunular ise kanser tedavisinde doğal bir ürün olarak amigdalin'i dikkate almaktadır [1, 14, 15].

Uzun yıllar amigdalin üzerinde çalışmalar seyrek kalmış, zamanın bilimsel otoritelerince kanserle mücadelede zaman kaybı olduğu ilan edilerek bir bıçak gibi kesilmişken son yıllarda giderek artan bilimsel araştırmalarla amigdalin tekrar popüleritesini arttırmaya başlamıştır.

Yurdumuz, dünyada kayısı (*Prunus armeniaca* L.,Rosaceae) yetiştiriciliği alanında söz sahibi ülkelerden biridir. Özellikle tadı, kalitesi, yıllık 400.000-600.000 ton taze kayısı ve 100.000-150.000 ton kuru kayısı üretim rekoltesi ve kuru kayısı ihracatımızın %80 ile 85'ini karşılayan Malatya ili Türkiye kayısı üretiminde bir markadır [16]. Bu yüksek rekolteye paralel olarak tonlarca amigdalin içerikli acı ve tatlı kayısı çekirdeği elde edilmektedir. Tatlı kayısı çekirdekleri özellikle çerez olarak tüketilirken, içerdiği fazla miktardaki amigdalin yüzünden acı bir tada sahip acı çekirdek türleri de iç ve dış piyasada tıpkı acı badem gibi ilaç niyetine satılmaktadır.

Türkiye'de tatlı kayısı çekirdeğinin kullanıldığı çeşitli yöresel yemekler öteden beri kültürel olarak kabul görmesine rağmen, bilhassa ilaç niyetine tüketilen acı kayısı çekirdeğinin yetişkin nüfus tarafından bir seferde en fazla sekiz ile 10 adet, çocukların ise daha az tüketmesi gerektiği, meyveyi yetiştiren halk tarafından bilinen yaygın bir eski bilgidir [13].

Çalışmamızın sonucunda dikkate değer veriler alınması halinde, hem insanoğlunun kanserle mücadelesine bilimsel bir adım atılmasında hem de ilimizin can damarı ve ülkemizin önemli tarımsal ekonomi kaynaklarından kayısı bitkisinin, yurdumuz ekonomisine, gıda tüketimi yanında tıbbi ilaç endüstrisinde yönelik pazar katkısı sağlayacağı fikrini de güçlendirmesi amaçlanmaktadır.

1.2. Siyanür

Siyanür, bir karbon atomunun bir azot atomuna üç molekül ($C\equiv N$) bağla bağlanmasından oluşan bir kimyasal gruptur (tipik olarak CN^- olarak gösterilir), siyanitler ise (iki veya daha fazla atomun birleşmesiyle oluşan maddeler) bir siyanid grubu içeren bileşiklere verilen isimdir [17]. Günümüzde bile idamlarda, cinayetlerde ve intiharlarda sıklıkla kullanılmasından dolayı ününü devam ettiren siyanürün varlığı ve işlevi antik çağlardan beri bilinmektedir. Tam olarak saflaştırılıp kimya literatürüne geçmesi 1782 yılında bir laboratuvar kazasında siyanür zehirlenmesinden ölen İsveçli kimyager Scheele tarafından gerçekleştirilmiştir [10]. Yazılı insanlık tarihinden alınan bilgilere göre eski çağlardan günümüze kadar geçen süre içinde siyanür ve siyanür türevleri, insanlara ve 20. yüzyılın başından itibaren ordulara karşı toplu öldürme maksadıyla Avrupalılar tarafından kimyasal silah olarak kullanılmıştır. 21. Yüzyılda bile siyanür ve türevlerinin gelecekteki konvansiyonel veya konvansiyonel olmayan çatışmalarda insanlar için bir tehdit oluşturmaya devam etmesi kuvvetli ihtimaldir [10, 17]. Siyanür gibi kimyasal, biyolojik vb. potansiyel saldırı tehditlerine karşı modern ordular, Kimyasal Biyolojik Radyolojik Nükleer Tehditler (KBRN) birimlerini oluşturmuşlardır.

Siyanür iyonları içeren bileşikler, çoğunlukla hücresel solunum sürecine müdahale eden, birçok hastalığa ve hatta ölüme neden olan, hızlı etkili bir zehirdir. Siyanür doğada gaz, sıvı, katı ve bitkisel formda bulunur (Şekil 1.1). Gaz formu olan

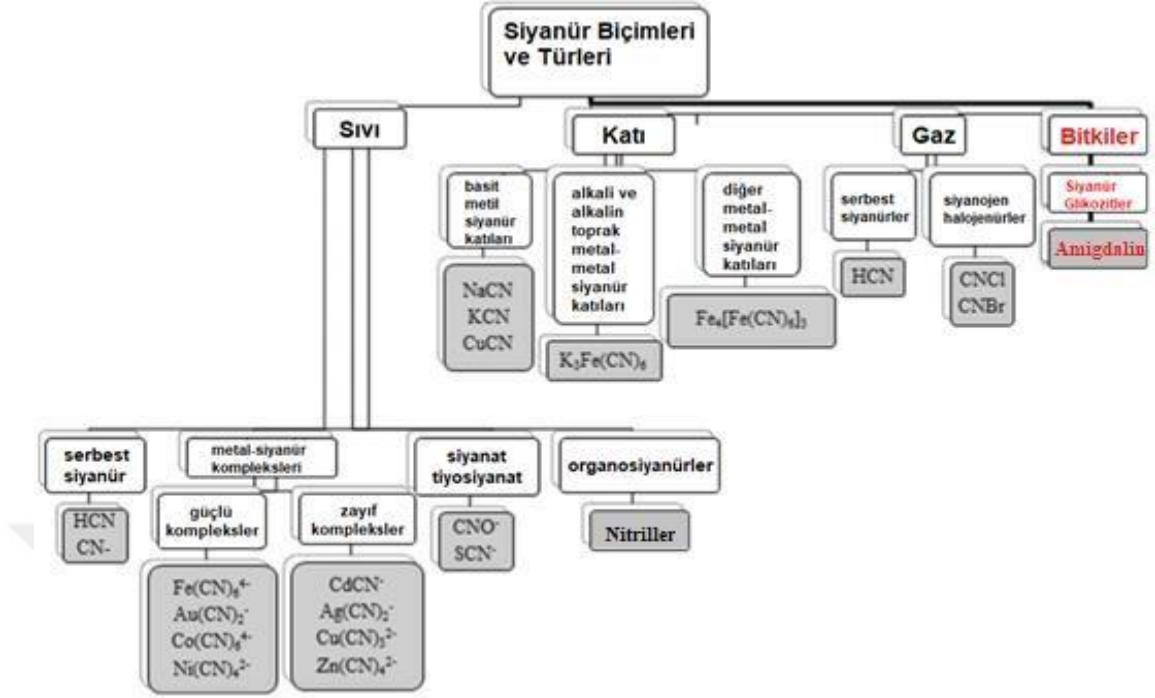
hidrojen siyanür (HCN); renksiz, acı bademi andıran batıcı bir kokusu olan gazdır. Sıvı formu gaz hali gibi renksizdir ve hidrosiyamik asit ya da prussik asit olarak adlandırılır, %2-4 oranında suda çözelti halinde bulunup “Scheele asidi” olarak da anılmaktadır [18]. Bununla birlikte, kalsiyum, sodyum ve potasyumun oluşturduğu siyanür tuzları beyaz renkli katı kristalize suda çözünebilir ve kadmiyum (Cd), bakır (Cu) ve çinko (Zn) ile oluşturdukları zayıf ya da orta kararlılıktaki kompleks bileşikler zayıf-asitte ayrışabilir maddelerdir [10, 19, 20].

Siyanür, sıcak ve kuru havada son derece uçucu bir maddedir. Kaynama noktası 26°C ' dir. Yüksek derişimde, havada yanıcıdır. Molekül ağırlığı 26.018 g/mol oldukça düşüktür, sudan hafiftir ve uçucu bir bileşik olması nedeniyle kolaylıkla difüzyona uğrar.

Siyanür, bazı bitki ve işlenmiş gıdalarda doğal olarak bulunur, bitkilerin siyanojenik glikozit içerikli türlerinin oral yolla tüketilmesiyle canlı organizmada sindirime bağılı olarak ikincil metabolit olan siyanür üretilebilir [13, 14, 19].

Sanayileşmiş ülkeler, endüstriyel faaliyetlerinden dolayı yılda yüz binlerce ton siyanür türevi üretmektedir. Siyanür birçok kimyasal sentezde, elektro kaplamada, plastik işlemede, altın ve gümüş ekstraksiyonunda, tabaklama, metalurji vb. bir fumigant olarak kullanılır. Siyanüre en büyük maruz kalma riski, insanoğlunun sanayi üretimlerinden kaynaklı solunması, cilt emilimi ve yutulması ile gerçekleşir [20,21].

Siyanür türevleri:



Şekil 1.1. Çevrede siyanür kaynakları [21]

Aslında doğada insanoğlu hemen hemen her gün bir şekilde siyanürle temas halindedir. Bunun sonucu olarak da bir siyanür detoksifikasyon sistemine sahiptir. Siyanürler, su, toprak, solunan hava, gıda maddeleri gibi çeşitli çevresel elementlerle kan, idrar ve tükürük gibi biyolojik maddelerde litre başına mikrogram ile litre başına miligram seviyelerinde bulunur [21].

Siyanür günümüzde devletler, teröristler, şirketler ve bireyler tarafından çeşitli nedenlerden dolayı insanlık için yararlı veya zararlı sonuçlar elde etmek amacıyla kullanılmaya devam etmektedir.

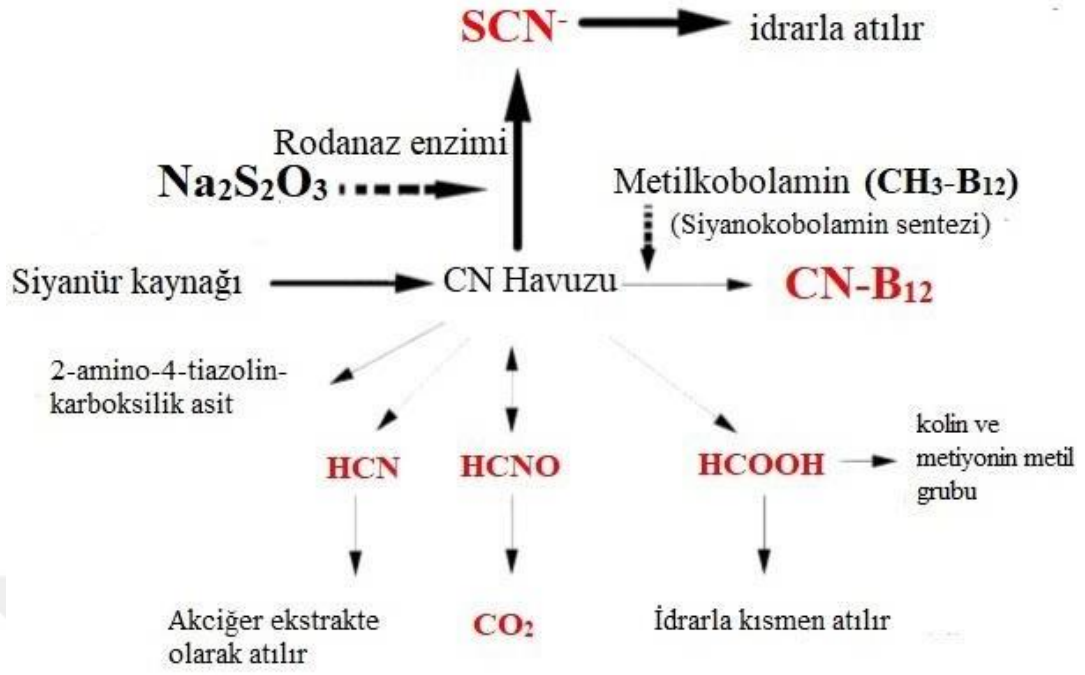
1.2.1. Siyanür metabolizması

Siyanür, aşırı derecede toksik doğal bir maddedir ve detoksifikasyonu ile yaşadığımız ekosistemin bir parçasıdır (Şekil 1.2).

Yüksek yapılı canlılarda fizyolojik olarak siyanür metabolizmasının birkaç mekanizması vardır.

- (a) rodanaz veya 3-merkaptopiruvat kükürt transferaz enzimi (MPST) ile tiyosiyanata dönüşüm;
- (b) 2-aminotiyazolin -4-karboksilik aside dönüşüm;
- (c) 1 karbonlu bir metabolik havuza dahil olma;
- (d) siyanokobalamin(B12 vitamini) oluşturmak için hidroskobalamin ile birleştirmedir [17].

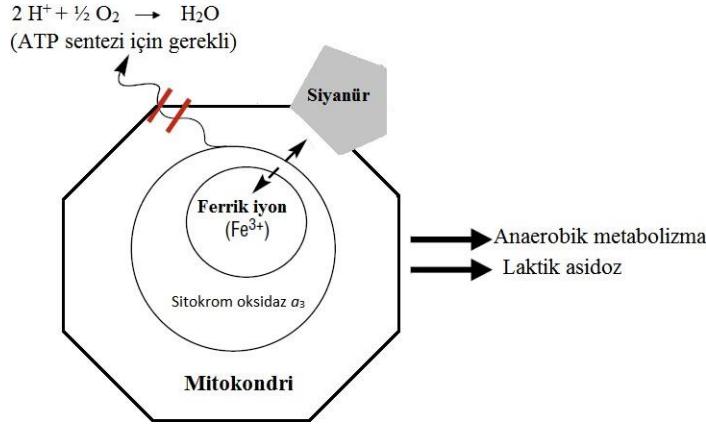
Siyanür metabolizmasında, akciğerden atılım, sisteine bağlanma, oksidasyon ve tiyosülfat yol izleri gibi mekanizmalar rol oynar. Hidroskobalamin siyanürü zararsız siyanokobalamine dönüştürüp ardından tiyosiyanat oluşturur. Tiyosiyanat aminoasitlerle birleşerek dokularda oksitlenip karbondioksit vb. bileşiklere dönüştürülür. Karaciğer ve böbrekte rodanaz ya da tiyosülfat-sülfür transferaz enzimi ile tiyosiyanatların biyotransformasyonu gerçekleştirilir. Bu iki enzim organizmada farklı noktalarda farklı aktivite gösterir. Rodanaz enzimi (pH 8,6) fizyolojik pH'da (7,4) genelde daha aktiftir [22]. Öldürücü olmayan dozlarda CN⁻'nin çoğunluğu *in vivo* karaciğerde özellikle rodanaz enzimi yardımıyla 20 dakika ile 1 saatlik bir zaman aralığında SCN⁻ ye dönüştürülür ve idrarla atılır [23]. Siyanürün az bir bölümü hidroskobalamininden (B12 vitamini prekürsörü) siyanokobalamin oluşumunda rol oynar. Kalsiyum siyanamid ve akrilonitril düşük toksisiteye sahiptir ancak söz konusu reaksiyonlar detoksifikasyon için yeterli olamamaktadırlar.



Şekil 1.2. Siyanürün metabolik yolları (CN, siyanür; Na₂S₂O₃, sodyum tiyosülfat; SCN⁻, tiyosiyanat; CN-B₁₂, siyanokobalamin; HCN, hidrosiyanik asit; HCNO, siyanik asit; HCOOH, formik asit) [23]

Siyanür bileşikleri hangi yolla vücuda girerse girsin etki mekanizması aynıdır. Fakat bu durum akut zehirlenme olaylarında çabuk geçer. Siyanür aktivitesinin temel etkisi, solunum zincirinin kilit bir enzimi olan üç değerli sitokromoksidaz demiri ile birleştirmeyi içerir. Bu kombinasyon hücre içi solunumun engellenmesine ve laktik asit sentezinin artmasına neden olur [22].

Akut zehirlenmelerde siyanür hücreye girdiğinde mitokondrial sitokrom a₃'ü bloke eder (Şekil 1.3). Sitokromoksidaz-siyanür komplekslerinin oluşması ile hızlı bir şekilde sitokromoksidaz inhibisyonu gerçekleşir. Sonuçta elektron taşıma sistemi bloke olur. Sitokromoksidaz bloke olunca Krebs döngüsündeki pirüvat transformasyonu inhibe olur ve sonuçta laktat birikimi ve metabolik asidoz oluşur [17, 22-25].



Şekil 1.3. Siyanürün hücresel solunum üzerindeki etkisi (Siyanür, mitokondri içindeki sitokromoksidaz a₃'deki ferrik iyonu ters yönde bağlanır ve oksijenin suya indirgenmesini bloke ederek hücresel solunum etkili bir şekilde durdurulur) [25].

Akut siyanür zehirlenmelerinde sitokromoksidazın bloke edilmesinin en önemli etkiye sahip olmasının yanı sıra, katalaz, peroksidaz, hidroksokobalamin, fosfataz, tirozinaz, askorbik asit oksidaz, ksantinoksidaz ve süksinikdehidrogenaz aktivitelerini de inhibe eder ve bu da canlıda siyanür toksisitesinin belirlenmesine katkıda bulunabilir [17].

Siyanür zehirlenmesinin hücrede solunum aktivitesinin tamamen durdurmadığı durumlar da söz konusudur. Tamamen etkilenen hücrelerde bile az da olsa bir miktar solunum devam edebilir. Bu düşük düzeyde gerçekleşebilen solunum sitokrom-b'yi aktive edebilir bazen de hücrede flavin aerobik dehidrogenaz enzim aktivitesi de görülebilir [24].

1.2.2. Siyanür'ün canlı organizmalar üzerindeki etkisi

Siyanür, Environmental Protection Agency (EPA) tarafından bilinen en toksik madde olarak tanımlanmıştır [22]. Siyanür iyonları, çeşitli endüstriyel faaliyetlerin ve bitkisel gıda alışkanlıklarının doğal bir sonucu olarak solunum, deri, mukoza ve oral yollarla organizmaya girebilir. Emilimi çok hızlıdır, solunum yoluyla birkaç saniye, sindirim yoluyla birkaç dakikadır. Kana ulaştığında alyuvarlara ve çok az miktarda da plazma proteinlerine bağlanır. Dokulara dağılımı çok hızlıdır.

Siyanürle yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* bilimsel çalışmalara göre, siyanür toksisitesinden ölen hücreler endonükleazları sitoplazmaya bırakarak DNA parçalanmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla genotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [17].

Siyanürlerin toksik etkilerine en duyarlı olanı, oksijenin en hızlı metabolizmasına sahip dokulardır, bu nedenle beyin ve kalp kası ilk akla gelendir. Siyanürün etkisiyle oluşan hipoksiya tüm vücut hücrelerinin işlevini bozar. Toksik doz büyük ölçüde bir siyanür iyonu içeren bileşik tipine bağlıdır. Literatürde sunulan birçok veriye dayanarak, siyanürlerin toksisitesinin büyük ölçüde oluşum şekillerine bağlı olduğu sonucuna varılabilir. En toksik olan serbest siyanür iyonlarının (HCN , CN^-) aksine kompleks siyanür bileşikleri en az toksik olanlarıdır [26, 27].

Siyanür iyonları içeren bileşikler, hücre sel solunum işlemini bozdukları için hızla hareket eden zehirlerdir. Siyanür aktivitesinin temel etkisi, solunum zincirinin kilit bir enzimi olan üç değerlikli sitokromoksidaz demiri ile birleştirmeyi içerir. Bu kombinasyon hücre içi solunumun engellenmesine ve laktik asidin sentezinin artmasına neden olur. Sitokromoksidazın bloke edilmesinin en önemli etkiye sahip olmasına rağmen, CN^- iyonlarının diğer enzimleri de inhibe ettiği unutulmamalıdır (glutamat dekarboksilaz, ksantinoksidaz, süperoksitdismutaz, NO sentaz ve nitritredüktaz). Siyanür iyonu, lipidperoksidasyonu nedeniyle sinir sistemine doğrudan zarar verebilir [28].

Siyanürlerin insanlar tarafından yutulması ve mesleki maruziyet raporları siyanürün tiosiyanata dönüştürüldüğünü gösterir. Yetişkin bir insan için tahmini ölümcül doz 1,5 mg CN^-/kg vücut ağırlığıdır. Solunum yoluyla şiddetli zehirlenme belirtileri, 53 mg HCN/m^3 'te gözlenirken, gıda ile alınan öldürücü doz yaklaşık 200-300 mg'dır [29]. Siyanüre uzun süre maruz kalmak, vücut zayıflığına ve hipotiroidizm, böbrek hasarı ve düşükler gibi çeşitli hastalıklara yol açabilir. Siyanür maruziyetini takiben oluşan tiroid etkileri, tiroid bezinde iyot alımı ve kullanımı ile siyanür metaboliti olan tiyosiyanatın etkileşiminden kaynaklanmaktadır [17, 23].

Siyanürün öldürücü en az dozu (LD_{50}) farklı siyanür bileşikleri için değişiklik gösterir. Ölümden önce büyük bir kısmı emilmeden atılır. Erişkinlerde (70 kg) öldürücü en az doz değerleri NaCN için, 150 mg; KCN için 200 mg; HCN için 100 mg'dır. Akut HCN zehirlenmelerinde ilk olarak merkezi sinir sistemi

etkilenmektedir. Siyanürün besin zincirinde birikimi (biyomagnifikasyon) bildirilmemiştir. Gaz haldeki HCN'nin LD₅₀ değeri 100-300 mg/L'dir [22]. Solunum yolu ile alınan siyanür 10-60 dakika içerisinde ölüme neden olur. Siyanür konsantrasyonu arttıkça ölüm süresi azalır. Eğer 2000 mg/L HCN solunum yolu ile alınırsa 1 dakika içerisinde ölüm gerçekleşir [24].

Siyanür maruziyetinin insanlarda ve hayvanlarda karsinojeniteye neden olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır [17]. Canlı organizmaya yabancı olmayan ve kendine ait detoksifiyasyon mekanizması olan siyanürün, hücresel öldürme mekanizması programlı hücre ölümüne(apoptozis) uyarlanarak kanser hücrelerine karşı mücadelede bir umut ışığı olabilir.

1.3. Siyanojenik glikozitler

İnsanlar ve hayvanlar tarafından yenilen birçok bitkide siyanojenik glikozitler bulunmaktadır. Siyanojenik glikozitler 2500'den fazla bitki türü tarafından azot metabolizmasının ikincil metaboliti olarak üretilmektedir. Siyanojenik glikozitler, Fabaceae, Rosaceae, Leguminosae, Linaceae ve Compositae gibi bazı bitki familyalarında yaygındır [30, 31]. İnsan ve hayvanlar tarafından vücuda alınan siyanojenik glikozitler, bağırsak mikroorganizmaları veya bitkisel besin kaynaklı enzimlerin etkisiyle hidrojen siyanür (HCN) oluşturabilirler. Siyanojenik glikozitlerin toksik HCN oluşturma potansiyelleri sebebiyle bitkilerin parazit ve herbivorlara karşı savunmalarında önemli bir kimyasal silah konumundadır ve memeliler içinde büyük bir tehlikedir. Acı tatları ve doku hasarı üzerindeki etkileriyle de bunu göstermektedirler. Bu tür herbivorlar, siyanojenik glikozitleri metabolize etme yeteneğini de evrimsel olarak kazanmışlardır. Ayrıca birkaç Arthropoda türünde (Diplopoda, Chilopoda, Insecta içinde) siyanojenik glikozitleri sentezleyebilirler [31, 32]. Bilinen yaklaşık 25 çeşit siyanojenik glikozit vardır ve bunlar genellikle elma, kayısı, kiraz, şeftali, erik, ayva, badem gibi bitkilerin yenilebilir kısımlarında, özellikle de bu tür meyvelerin tohumlarında bulunur [33]. Genel olarak, üretilen siyanojenik glikozitlerin seviyesi, çevresel faktörlerin yanı sıra bitkinin yaşına ve türüne de bağlı olarak değişiklik göstermektedir [30]. Öğütülmüş badem tozu veya macunu, meyve çekirdeklerinden yapılmış alkollü içeceklerde

siyanojenik glikozitler içerebilen diğer gıda ürünleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle bu yiyecekler de potansiyel hidrojen siyanür kaynaklarını temsil etmektedirler.

Siyanojenik glikozitler, siyanid salınana kadar toksik değildir. Siyanojenik glikozitlerin ve bunların türevlerinin toksisitesi, HCN salınmasına bağlıdır. Siyanür zehirlenmesi gıdalarla alınan siyanür miktarı 0.5-3.5 mg/kg vücut ağırlığı düzeyinde ise meydana gelir. İnsanlarda siyanür zehirlenmesinin belirtileri kusma, mide ağrısı, ishal, kasılma ve ağır vakalarda ölüm olduğu bildirilmiştir [34]. Siyanojenik glikozitlere örnek olarak amigdalin, prunasin, linamarin, lotaustralin, lucumin, vicianin, sambunigrin gösterilebilir. Sekonder metabolit olan siyanojenik glikozitlerin üretiminde çeşitli aminoasitler rol oynamaktadır. Siyanojenik glikozidlerdeki yapısal çeşitliliğin fazla olmasına rağmen, neredeyse hepsinin altı farklı amino asitten L-valin, L-izolösin, L-lösin, L-fenilalanin veya L-tirozin ve siklopentenil-glisin'den türetildiği düşünülmektedir. Linamarin ve lotaustralin, valin, izolösin ve lösinden; prunasin, amigdalin ve sambunigrin fenil alaninden üretilmektedir [30, 35]. Aminoasitler nitrillere, nitriller hidroksillenerek α -hidroksinitrillere, α -hidroksinitriller de glikoz eklenerek siyanojenik glikozitlere dönüştürülmektedir [36].

Siyanojenik glikozitlerin hidrolizi, siyanojenik bitkilerin herbivorlar tarafından yenilmesiyle başlar. Böylece β -glikozidaz enzimlerinin aktivitesi sonucu karbonhidrat ve α -hidroksinitrile dönüştürülür. Oluşan α -hidroksinitril ya kendi kendine ya da hidroksinitrilliyaz enzimi ile toksik HCN ve aldehit veya keton oluşacak şekilde ayrışır. Siyanojenik glikozitler ile hidroliz enzimlerin bitkilerde farklı kısımlarda bulunmaları fiziksel bir hasar oluşmaksızın HCN üretimini engeller [36, 37].

Glikozitlerin hidrolize edilmesi ile açığa çıkan HCN, dolaşıma geçtikten sonra methemoglobin ile birleşir ve siyanomethemoglobin oluşturur. Serbest kalan siyanür iyonları ise solunumda görevli temel bir enzim olan sitokromoksidazın yapısındaki demirle birleşip bu enzimi inaktive ederler. Buna bağlı olarak histotoksik bir anoksia sonucunda ölüm meydana gelebilir [38].

Bir siyanojenik bitkinin toksisite değerleri öncelikle hayvan ve insanların tüketimi ile ortaya çıkan hidrojen siyanür konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek

miktarda siyanojenik glikozit içeren kayısı çekirdeklerinin aşırı tüketimi insan ve hayvanlarda akut ya da kronik zehirlenmeye neden olabilir. Kayısı çekirdekleri bütün olarak yutulduğunda çok miktarda siyanür salınımına neden olmazken, ancak dişlerin arasında ezilerek tüketilirse lizozomal bir enzim olan emülsin sayesinde çok miktarda siyanür ortaya çıkar. Kayısı çekirdeği siyanür içeriği 0.122-3.09 mg/gram arasında değişmekte, ortalama 2.92 mg/gram olduğu bilinmektedir. İnsanlar için öldürücü doz 0.56 mg/gram-1.52 mg/kg'dır [39]. İnsan ve hayvanlar tarafından tüketilen bazı bitkilerin yenilebilir kısmında fazla miktarda bulunan siyanojenik glikozitler ve siyanojen içerikleri Çizelge 1.2'de verilmiştir [40].

Çizelge 1.2. Siyanojenik glikozit içeren bazı bitki çeşitleri [40]

Kaynak Bitki Cinsleri	Siyanojenik Glikozit	Siyanojen İçeriği (mg/kg, HCN)
Cassava (<i>Manihotesculenta</i>)- Kök	Linamarin	15-1000
Sorgum (<i>Sorghumvulgare</i>) – Yaprak	Dhurrin	750-790
Keten (<i>Linumusatissimum</i>)- Tohum unu	Linamarin, linustatin, neolinustatin	360-390
Lima fasülyesi(<i>Phaseoluslunatus</i>)	Linamarin	2000-3000
Dev taro (<i>Alocasiamacrorrhizos</i>) – Yaprak	Trigloshin	29-32
Bambu (<i>Bambusaarundinacea</i>) – Genç sürgünler	Taksifilin	100-8000
Elma (<i>Malusspp.</i>)–Tohum	Amigdalin	690-790
Şeftali (<i>Prunus persica</i>) – Çekirdek	Amigdalin	710-720
Kayısı (<i>Prunus armeniace</i>) – Çekirdek	Amigdalin	785-813, 89-2170, 2.2Nektar
Erik (<i>Prunus spp.</i>)–Çekirdek	Amigdalin	696-764
Şeftali nektarı (<i>Prunus persica</i>)	Amigdalin	196-209
Kiraz(<i>Prunus spp.</i>)	Amigdalin	4,6 Nektar
Acı badem(<i>Prunus dulcis</i>) – Çekirdek	Amigdalin	4700

Siyanojenik glikozitlerin yenilebilen bitkilerle alımında olumsuz etkilerini önlemek için tüketiciler yiyecekleri tüketmeden önce uygun şekilde hazırlamalıdır. Bu bitkilerin yenilmeden önce toksin seviyelerini azaltmak için küçük parçalara bölünmesi ve pişirilmesi önerilmektedir. Ayrıca meyve suyu yapımında meyvelerin

ezilmeden önce çekirdeklerinin çıkarılmasıyla da zehirlenmenin önüne geçilmiş olunur [41].

1.3.1. Amigdalin

Kelime anlamı Yunancada: ἀμυγδαλή, amygdálē, "badem" olan amygdalae den türetilmiş Amigdalin (Mandelonitril β -d-gentiobiosid) ilk olarak Fransız biyokimyacılar Pierre-Jean Robiquet ve Antoine Boutron-Charlard tarafından 1830 yılında, acı badem olarak da bilinen *Prunus dulcis* ağacının tohumlarından izole edildi ve ardından 7 yıl sonra Alman kimyagerler Liebig ve Wohler tarafından detaylı incelenerek "emulsin" olarak adlandırıldı [13, 15, 42]. Sonraki yıllarda kayısı (*Prunus armeniaca*), ayva, siyah kiraz, kiraz, erik, şeftali, vb. Rosaceae familyası özellikle *Prunus* cinsinin diğer birçok türünün meyve tohumuna (çekirdeğine) belirgin bir acı tat veren amigdalin içerdiği tespit edilmiştir [13, 30].

Amigdalin, bitkiden izole edildikten 15 yıl sonra ilk defa Rusya'da kanser tedavisinde kullanıldı [43]. Fakat dünya çapında çok büyük ilgi görmesi 1920 yılında Dr. Ernst Theodore Krebs tarafından yeniden keşfedilerek kansere karşı mücadelede etkili olabileceğinin duyurulmasının ardından Amerika Birleşik Devletlerinde kanserle tedavi amaçlı olarak kullanılmasına başlanmıştır [13]. Amigdalin, 1970'li yılların sonuna kadar popüler olan geleneksel olmayan, anti- kanser tedavilerinden biriydi ve 1978 de 70.000 ABD'li kanser hastasının amigdalin kullanmış olduğu rapor edildi [1]. Amigdalin ve türevlerinin sonraki yıllarda yapılan deneylerde çok toksik olduğu ve kanser tedavisinde faydalı olmadığı görüşü hakim olup, bu bileşik ile yapılan tedavi amaçlı çalışmalar 1980'lerde hızlı bir şekilde bilimsel otoritelerce durmuş, ardından da Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (US-FDA) tarafından kanser hastaları için ilaç olarak satışı yasaklanmıştır [14]. Bununla birlikte günümüzde insanlar tarafından hala kansere karşı alternatif bir çare olarak modern tıp yanında destek amaçlı hastalar tarafından bireysel olarak kullanılan amigdalin Meksika ve Çin gibi FDA'nın etkin olmadığı ülkelerde internet sitelerinden temin ederek tüm dünyada kullanmaya devam edilmektedir.

Literatüre giren amigdalin üzerinde kanıta dayalı araştırmalar günümüzde bile hala üzerindeki soru işaretlerini kaldırarak düzeyde değildir. Amigdalin'in kanser

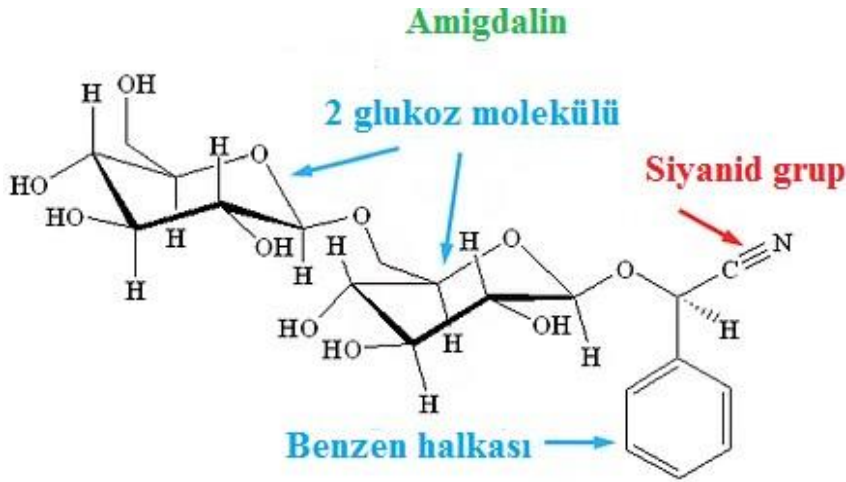
tedavisinde güvensiz olduğu iddia edilmesine rağmen, uygun dozlarda yapılan az sayıdaki bilimsel araştırmalarda, ciddi akut bir toksisiteye karşılaşılmamıştır [1, 14, 15]. Bu konudaki zehirlenme vakaları ise aşırı dozda tüketilmiş amigdalin içerikli hap, meyve çekirdekleri ve sebzelerden kaynaklanan hasta hikayelerinin hastane vaka raporları, derleme ve gazetelerden duyurulmasıdır [12, 13, 44-46]. Bunun yanında amigdalin'in organizma üzerindeki etki mekanizmaları günümüzde halen tam olarak tespit edilememiştir.

Güncel araştırmalarda bazı dikkat çekici yeni bulgulara ulaşılmaktadır. Örneğın amigdalin'in kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri, kanser büyümesini inhibe etmek ve tümör hücrelerine besin kaynağı bloke ederek vücutta karsinojen maddeler ayrıştırma, bir anti-tümör bileşiği, serbest HCN ile ilişkilidir. Bu yönde bir çalışmada insan kanser hücrelerinde amigdalin tedavisi diğerk dokulara kanser yayılmasında hücre döngüsü ile ilişkili genlerin aşağı regülasyonu yoluyla hücre döngüsünün durdurulması apoptotik hücre ölümünü teşvik ve metastazını bloke etmek suretiyle potansiyel sitotoksik ve anti-kanser etkisi olabileceğı gibi bu konuda yapılmış bazı güncel araştırmalarda kansere karşı olası çeşitli faydaları rapor edilmiştir [1-7].

1.3.2. Amigdalin'in kimyasal yapısı

Amigdalin'in 1837 yılında izole edildikten sonra Alman kimyagerler Liebig ve Wohler tarafından tanımlanarak [13] Emil Fisher tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir [47]. 1935'te Vierhover ve Mack, amigdalin'in ek biyokimyasal özelliklerini özetleyerek emülsin ve seyreltik asit ile *in-vitro* hidroliz sırasında, bir HCN ve benzaldehit molekülünün ayrıca iki glikoz molekülünün salındığını buldular [13].

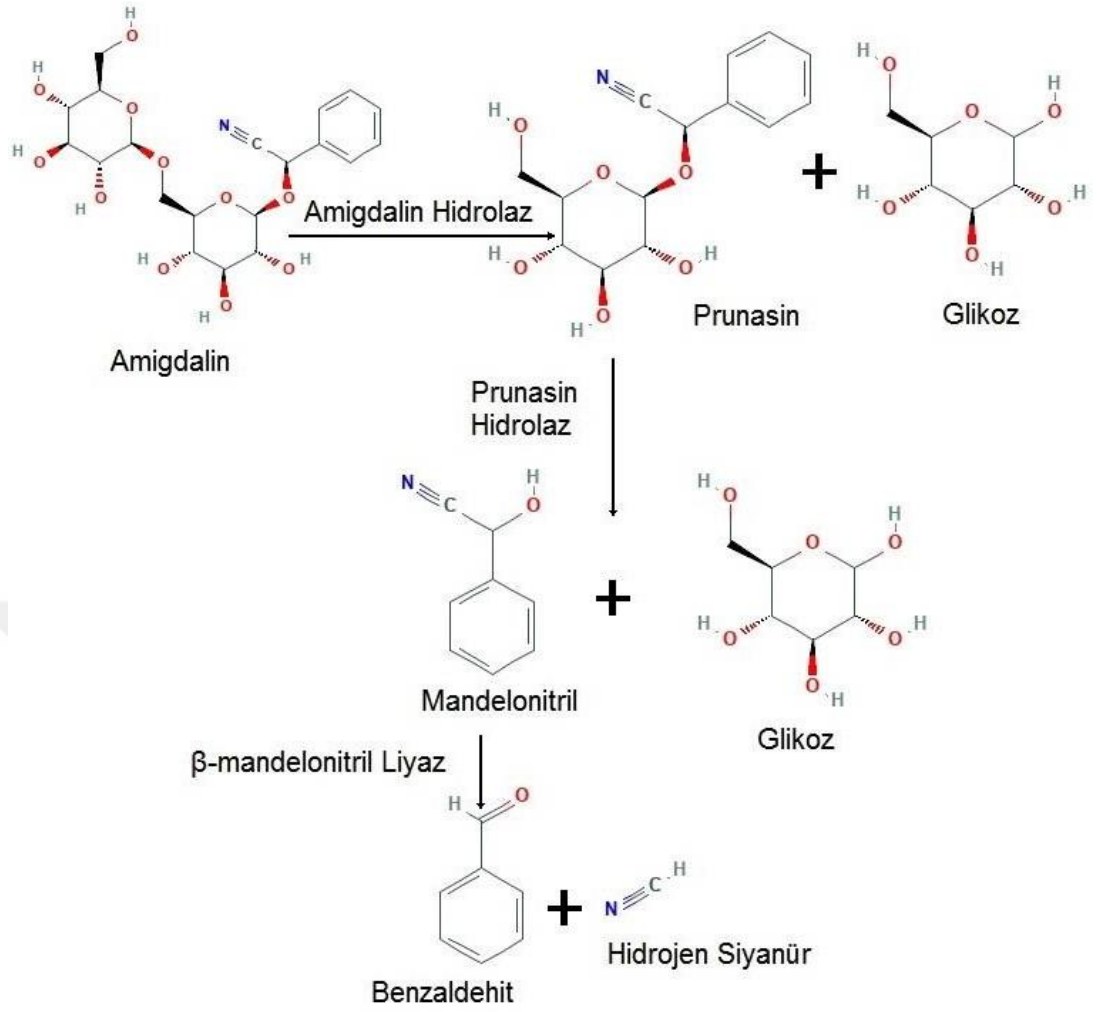
Moleküler formülü $C_{20}H_{27}NO_{11}$ ve molekül ağırlığı 457.43 g/mol, görünümü beyaz-bej, suda çözünürlüğü 50 g/L, erime noktası 223–226 °C olan [14] amigdalin'in açıklanan kimyasal yapısında iki glukoz molekülü ve bir siyanid grup içeren benzen halkasından oluşmaktadır (şekil 1.4).



Şekil 1.4. Doğal amigdalın'ın aktif formu (dekstrorotatör (R) konfigürasyona sahiptir) [14]

Günümüze kadar yayımlanmış bilimsel makalelerde L-Mandelonitril-beta(β)-gentiobiosid, (-)-D-mandelonitril β -D-gentiobiosid, Amigdolasid, D-Amigdalın, (R)-Amigdalın, DL-Amigdalın, İzamigdalın gibi pekçok isimle adlandırılmasının yanında çoğu araştırmacının da yarı sentetik laetril formuyla karıştırılarak bilimsel bir isim karmaşasında bulunan amigdalın'ın sistematik ismi (2R)-2-fenil-2-[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihidroksi-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5trihidroksi-6-(hidroksimetil) oksan-2-yl] oksimetil] oksan-2-yl] oksiasetonitrildir [48].

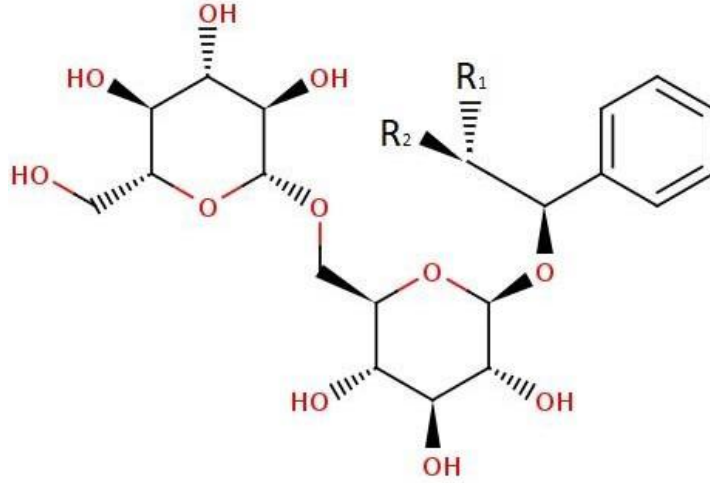
Amigdalın ($C_{20}H_{27}N_0O_{11}$), doğada en fazla kayısı, badem gibi özellikle Rosaceafamilyasının bitki tohumlarından (çekirdeklerinden) izole edilen siyanojenik bir glukozittir. Canlı bir organizmada bu siyanoglukozit içerikli bitkiler amigdalın (D-mandelonitril β -D gentiobisit) hidrolaz ailesinden β -glukosidaz enzimiyle parçalandığı zaman R-prunasin (D-mandelonitril β -D-glukozit) ve glukoz açığa çıkar. R-prunasin, bir glukoproteinolan prunasinhidrolaz enzimiyle parçalanarak R-madelonitril ve bir glukoz açığa çıkar. R-mandelonitril, bulunduğu bölgeye göre farklı özellikler gösteren bazıları da flavoprotein olan ve çeşitli aromatik ve alifatik hidroksinitrillere (siyanohidrinler) karşı etkin olan (R)-mandelonitrilliyaz enzimiyle son olarak bir benzaldehit ve hidrojen siyanür açığa çıkar (Şekil 1.5) [48].



Şekil 1.5. Amigdalın'ın hidrojen siyanüre dönüşümü [48]

Amigdalın'ın, laboratuvar ortamında saflaştırması için bugüne kadar pek çok metod geliştirilmiştir. Uygulanan bu metodlarda canlı organizmadaki su yerine daha fazla başarı sağlanmasından dolayı çözügen olarak alkol ve eter vb. kullanılmaktadır.

Bazen laboratuvar ortamında amigdalın eldesinde ısı, ışık, nem gibi optimum şartlarda kontaminasyon problemleri sonucu oluşan enzim denatürasyonu ile doğal kabul edilen R-Amigdalın yerine Neo-Amigdalın elde edilebilir (Şekil 1.6). Neo-amigdalın, R-amigdalın'ın aktif (S) izomeridir ve doğada bulunmaz. Bilimsel literatürde kullanılan izoamigdalın de aslında R-amigdalın ve S-Amigdalın epimerlerinin karışımının adıdır [49].



D-amigdalin : R1-H, R2 -CN

Neoamigdalin : R1-CN, R2-H

Şekil 1.6. Neoamigdalin, Fischer (Fischer, 1895) tarafından bildirildiği gibi sulu amonyak içindeki D-amigdalin'den hazırlanmıştır [49]

1.3.3. Amigdalin'in etki mekanizması

Amigdalin, Mandelonitril ve iki adet D-glikoz, disakkarit içeren bir gentiobiyozdur [10]. Oral yoldan uygulanan amigdalin insan gibi yüksek sindirim sistemine sahip canlılarda sindirim enzimleri ile prunasin ve glikoza hidrolize olduğu ve takiben ince bağırsakta prunasinin mandelonitrile indirgendiği düşünülmektedir [36]. Mandelonitril benzaldehit ve hidrosiyamik asit (HCN) dönüştürülmesi bağırsak mikroflorasından kaynaklanmaktadır [48].

Amigdalin kendisi toksik değildir, ancak amigdalaz ve glukozidaz gibi bazı enzimler tarafından hidrolize edilerek oluşan dekompoze ürünü olan HCN zehirli bir maddedir [34]. Mandelonitril β -d-gentiobiosid bağırsakta bilinen en az iki yolla bozunabilir. Birinci yolda, proksimal jejunumdaki (ince bağırsağın orta kısmı) memeli β - glukosidazlar, molekülü glikoz ve prunasine hidroliz eder. Bu serbest kalan prunasin değişmeden dolaşıma geçer. İkinci yol ise bakteriyel β -glukosidazların aracılık ettiği alt gastrointestinal sistemde ortaya çıkar. Amigdalin üzerinde etkili olan bağırsak mikroflorası tamamen onu mandelonitril'e indirgemektedir. Amigdalin'in toksisitesi muhtemelen bağırsaktaki prunasine dönüşmesine bağlıdır. İntravenöz amigdalin muhtemelen pek çok hücre tarafından alınmadığı için nispeten toksik olmayan bir bileşiktir veya hücre içi hidroliz hızı

yavaştır. Bununla birlikte, prunasinin, hücrelere taşınması ve karaciğer enzimleri ve diğer β -glikozidaz içeren organlar tarafından bozunduğu bildirilmiştir [13, 22, 48].

Amigdalin'in içerdiği siyanürden kaynaklı oluşan toksisite, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğuna dair literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur [14]. İnsan kanser hücrelerinde amigdalin tedavisi diğer dokulara kanser yayılmasında hücre döngüsü ile ilişkili genlerin aşağı regülasyonu yoluyla hücre döngüsünün durdurulması, apoptotik hücre ölümünü teşvik ve metastazını bloke etmek suretiyle potansiyel sitotoksik ve anti-kanser etkisi literatürde bildirmiştir [15].

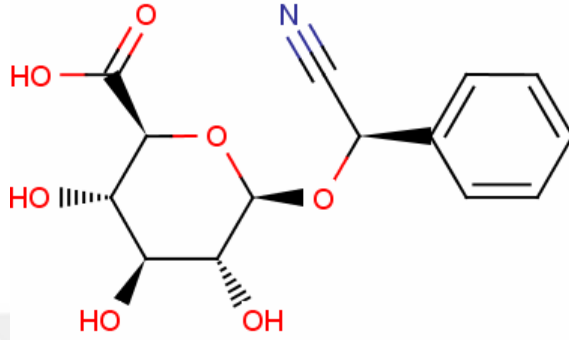
1.4. Laetril

Amigdalin'in hap formunun dünya çapında tanınması ve Dr. Ernst Theodore Krebs tarafından pazarlanmaya başlamasıyla olmuştur. Bunun ardından yıllar boyunca kullanılan doğal amigdalin'in hastalığa karşı çare yerine çok toksik olması ve hastaların zamansız ölümüne bizzat sebep olduğu iddaları üzerine 1950'li yılların başında, Dr. Krebs'in oğlu Dr. Ernst Krebs Jr., tarafından üretilen toksisitesi azaltılmış Amerikan patentli, amigdalin'in intravenöz formu olan laetril üretilmiştir. Laetril teknik olarak vitamin olmamasına rağmen Vitamin B17, Arı-17 veya Aprikern vs. adı altında kanser hastalığına çare ve koruma olarak, hatta küçük çocuklar için önemli bir gıda takviyesi adı altında piyasaya sürülmüştür [13].

Moleküler formülü $C_{14}H_{15}NO_7$ ve molekül ağırlığı 309.27 g/mol görünümü beyaz toz, suda çözünürlüğü 83 g/L, erime noktası 214-216⁰ C'dir.

Laetril (karboksamit ve mandelonitril), (LAEvorotatory and mandeloni**TRILE**) ana bileşiği amigdalin'den yapısal olarak farklıdır. Laetril (D-Mandelonitrile- β - glucuronide), amigdalin'den bir glikozid grubunun hidrolitik olarak uzaklaştırılmasıyla oluşan yarı-sentetik bir yapıdadır [7]. Meksika'da üretilen laetril ezilmiş kayısı çekirdeklerinden saf elde edilirken, ABD'de D-glukoronik asit ve Mandelonitril'den oluşan yarı sentetik bir bileşiktir [50]. Fakat genelde bu iki formda yaygın bir yanlış isimlendirme ile bilimsel olarak amigdalin olarak adlandırıldı. Laetril, 1970'lerde popüler bir geleneksel olmayan anti-kanser tedavi ilaçlarından oldu. 1978 yılında, 70.000 ABD'li kanser hastası kendi iradeleri ile destek ve tedavi

amaçlı laetril kullanmıştır [51]. Bununla beraber Laetril hiçbir zaman ABD Gıda ve İlaç İdaresi veya Avrupa Komisyonu tarafından kansere karşı ilaç olarak onaylanmamıştır. Laetril'in kimyasal yapısı Şekil 1.7' de verilmiştir.



Şekil 1.7. D-Mandelonitril-β-glukuronid veya laetril, $C_{14}H_{15}NO_7$. (Bu bileşik, kendisini bir glukozit yerine bir glukuronid yapan COOH grubu hariç prunasine benzer) [15]

1.5. Kanser

Kanser insanlık tarihi boyunca bilinen en büyük sağlık problemlerinden biridir. Kanser hakkında bilinen en eski kayıtlar M.Ö 3000 yılına kadar uzanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen “cancer” veya “carcinos” kelimelerinden türemiştir. Tümör terimi ise ilk defa (M.Ö 460-370), Hipokrat tarafından kullanılmış ve bu yapıya ‘Carsinoma’ demiştir. M.S.II. yüzyılda ise Yunan doktor Galen hastalıklı dokuların etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için “kanser” terimini kullanmıştır [52]. Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan kompleks bir hastalıktır. Tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilir [53, 54].

Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temel olarak genlerle ilişkili olan bir hastalıktır. Kromozomlar üzerinde

bulunan genler sıkıca paketlenmiş durumda olup bu genlerin üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişimler doğrudan hücrenin işlevini etkileyebilir. Her ne kadar gende meydana gelen bir hasara bağlı olarak, DNA tamir sistemleri genin işlevini yeniden kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı sağlanamaz. Bu durumda genlerin ürünü olan proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesi hücresel işlevlerde bozulmaya yol açar. Genin işlevini değiştiren bir başka etmen ise genin yapısını değiştirmeden işlevinin değişmesine neden olan metillenme, asetillenme, fosforillenme, ribozillenme gibi epigenetik modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar sadece özel bir bölge üzerinde etki gösterebileceği gibi kromozomların tamamını veya büyük bir bölümünü etkileyen bölgesel delesyonlar, insersiyonlar veya inversiyonlar şeklinde de görülebilir [53, 55].

İnsan genomundaki yaklaşık 25.000 genin yalnızca küçük bir kısmı kanserle ilişkilidir. Aynı gendeki değişiklikler sıklıkla kanserin farklı formları ile ilgilidir. Kanser oluşumunda en büyük role sahip olan 3 gen grubu bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir [53].

Onkogenler: Hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan normal genler olan proto-onkogenler, mutasyonlar, artmış gen ifadesi, gen duplikasyonları veya kromozal yeniden düzenlemeler nedeniyle etkin hale geçip onkogen haline dönüşebilirler. En bilinen onkogenlere örnek olarak RAS, Erk, MYC gibi genler gösterilebilir.

Tümör baskılayıcı genler: Hücrenin bölünmesini ve çoğalmasını kontrol eden, hasar durumunda DNA tamirini başlatan, tamir girişiminin başarısız olması durumunda apoptozu tetikleyen gen gruplarına ise tümör baskılayıcı genler denir. Bunlardan en bilineni ve en çok çalışılanı TP53 genidir. Delesyonlar, nokta mutasyonları, epigenetik susturmalar, kromozomların düzgün ayrılamaması ve mitotik rekombinasyonlar tümör baskılayıcı genin işlevinin kaybolmasına yol açarak hücre döngüsündeki kontrol kaybolmasına ve sonuçta da karsinogeneze neden olabilirler.

DNA tamir genleri: Bir diğer önemli gen grubu ise, hasarlı DNA'yı tamir etmek üzere gerekli proteinleri o bölgeye çeken ve böylece genin işlevinin yeniden kazanılmasını sağlayan DNA tamir genleridir. DNA tamir genlerinin bir diğer önemli işlevi ise tamirin başarısız olması durumunda hücrenin apoptotik olarak yok

edilmesini sağlamaktır. Ancak bu önemli gen grubundaki işlev kayıpları hücrenin kanserleşmesinde sıklıkla karşılaşılan bir problemdir. En çok bilinen DNA tamir genlerinden bir tanesi, işlevinin bozulması nedeniyle meme kanserinin oluşmasına yol açan BRCA (meme kanseri) genidir [53, 56, 57].

Kısacası kanser oluşumunda, onkogenler ve tümör-baskılayıcı genler karsinogenezde birbirleriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde etkili genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar [56, 57].

Sonuç olarak kanser tek bir sebebe değil birden fazla sebebe bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. Bunun yanı sıra kanserin ortaya çıkmasında tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı, alkol, kötü beslenme, obezite, virüsler, iyonize radyasyon, mesleki hastalıklar ve çevresel kirlenmeler sayılabilir. Hepatit B, Hepatit C ve HPV (insan papilloma virüsü) gibi virüsler karsinogenezde çok çalışılan virüslerdir [55]. Hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık rastlanan ve ölüme neden olan kanser türü akciğer kanseridir. 2. sırada ise erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda ise meme kanseri gelmektedir [58].

Normal şartlar altında sağlıklı hücreler, dış membrandan sinyal aldıklarında büyür ve bölünerek çoğalırlar. Dışarıdan gelen sinyaller hücre içine girip nükleusa aktarılır ve süreç başlar. Hücre bölünmeden önce çevresini kontrol eder, yeterli miktarda besin olup olmadığını, büyüyecek yer olup olmadığını kontrol ettikten sonra ve şartlar uygunsa büyümeye başlar. Hücreler önceden belirlenmiş olan hacim ve sayıya gelene kadar büyürler ve birbirlerine temas ettikleri anda büyümeyi durdururlar yani kontakt inhibisyon meydana gelir. Bu şekilde hücre bölünmesi kontrol edilir. DNA'nın veya hücrenin elemanlarından birinin hasarlı olması durumunda hücreler büyümeyi ve bölünmeyi durdurarak tamir edilmek üzere hücre döngüsündeki Go fazına geçerler. Hücre burada gerekli düzenlemeler ile tamir edilirse tekrar döngüye girer ve yaşamına devam eder. Ancak tamir edilemeyecek kadar hasar almış olması durumunda, apoptoz mekanizması ile programlı bir şekilde ölüme gönderilir veya immün sisteme ait hücreler hasarlı hücreyi yok ederler. Böylece hasarlı DNA'nın sonraki nesillere aktarılması engellenmiş olur.

Kanser hücreleri ise bu normal hücrelerden farklı olarak kendi metabolizmaları olan son derece akıllı hücrelerdir. Kanser hücreleri normal hücrelerin sahip olmadığı pek çok özelliğe sahiptir. Bunlar:

- Hücre yüzeyinde bulunan reseptörler ile daha sık sinyal alırlar.
- Kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemleri vardır.
- Yandaki hücreye temas sonrası bölünmeyi durdurmaz yani kontak inhibisyon gerçekleşmez, büyümeye ve çoğalmaya devam ederler.
- Sağlıklı hücreler her tipteki besini kullanabilirken, kanser hücreleri ise sadece glikolizden gelen glukozu kullanabilirler. Kandan şekeri normal hücrelere oranla yaklaşık 100 kat daha fazla alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar.
- Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki sitoplazmayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler.
- Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz aktivitesini koruyarak sonsuz şekilde replike olup çoğalabilirler.
- Dolaşım sistemine girip uzaktaki bir yere hareket edebilir ve yeni bir yere yerleşerek bu yeni bölgede kanserleşmeyi başlatabilirler(metastaz).
- Apoptozdan kaçabilirler.
- Genetik ve epigenetik olarak stabil değildirler [53, 54, 59, 60].

Kanser hücreleri son derece akıllı hücrelerdir çünkü az oksijen, az besin, zorlu koşullara karşı gösterdiği direnç ve zaman içerisinde bu koşulları kendi lehine çevirmesi ile yaşama tutunur. Kanser hücreleri zamanla transforme olabilir yani şekil değiştirebilir. Normal hücrelerin belli bir zemine tutunarak büyümesi ve yaşaması mümkünken, kanser hücreleri herhangi bir yere tutunmadan da yaşayabilir ve büyüyüp çoğalabilirler. Birçok kanser türü başlangıçta belirti vermez ayrıca her kanser türünün aynı olmadığı unutulmamalıdır. Kanser tipine bağlı olarak görülen genel belirtiler değişiklik gösterebilir. Bu nedenle her kanser türüne yaklaşım farklı olmaktadır. Ancak unutulmaması gereken erken teşhisle birlikte iyi bakımın

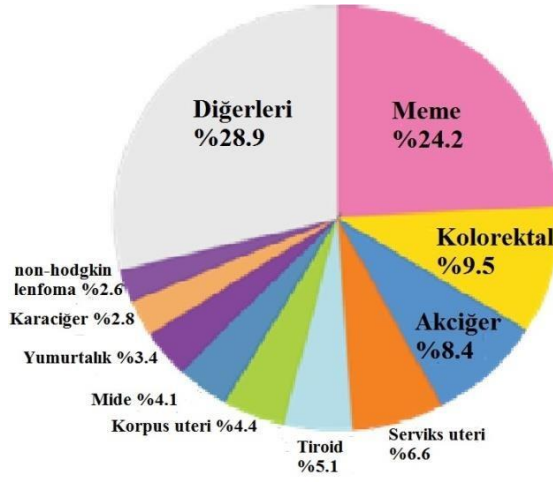
beklenen hayat süresini ve kalitesini arttırdığıdır. Bu nedenle yeni yöntemler denenmektedir.

Her ne kadar bazı standartlar belirlenmiş olsa da her kanser türüne özgü olarak farklı yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır. Bilinen 100'den fazla kanser türü olmasına ve belli tipteki kanserler için olabildiğince standart yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen kanser aynı zamanda kişisel bir hastalıktır. Dünya üzerindeki hiçbir insanın DNA'sı birbirine benzemediği için kişilerin benzer tedavilere farklı cevaplar vermesi de bir gerçektir. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Standart olarak kabul edilen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlere ek olarak aşilar, biyolojik, hormonal, hedeflenmiş ve gen terapiler giderek artan sayıda kullanılmaya başlanmıştır [53-55, 60].

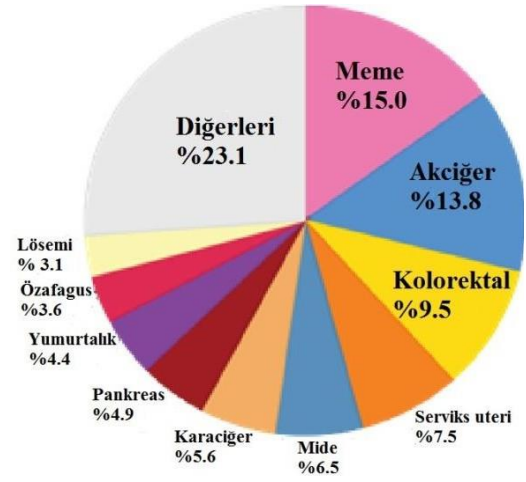
1.5.1. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlarda görülme sıklığı bakımından değerlendirildiğinde 1. sırada, kanserden kaynaklanan ölümler dikkate alındığında ise akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 raporuna göre 2018'de tahmini 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon kanserden kaynaklı ölüm olmuştur. Her iki cinsiyette de en fazla kanserli vakaların %11.6' sını ve ölümlerle sonuçlanan vakalarda ise %18.4 ile akciğer kanseri yer almaktadır.

İkinci en fazla kanser oranında kadınlarda %11.6 ile meme kanseridir. Bu oran akciğer kanseri için 2 milyon 93 bin ile ifade edilirken, meme kanseri içinse 2 milyon 88 bin'dir. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer, prostat, kolorektal (bağırsak), karaciğer ve mide kanserleri izlemektedir. Kadınlar arasında ise meme kanseri en sık tanı alan kanserdir ve kanser sebepli ölümlerin en başındadır. Bunu akciğer, kolorektal ve serviks (rahim ağzı) kanserleri takip etmektedir. Kadınlarda tespit edilen kanser türleri Şekil 1.8' de gösterilmiştir. Dünya çapında 2018'de yeni teşhis edilmiş, kadınlarda meme kanseri vakaları 2,1 milyon kişidir. Buda neredeyse kadınlar arasındaki 4 kanser vakasından 1'i demektir. Bu hastalık 100'den daha fazla ülkede kanser ölümünün önde gelen ve en yaygın olarak teşhis edilen kanser türüdür [61].



A. Hastalanma oranı(8.6milyon)



B. Ölüm oranı (4.2 milyon)

Şekil 1.8. Kadınlardaki kanser türleri ve oranları [61]

Dünya genelinde ise meme kanserinden hastalanma oranları en fazla olan ülke Avustralya'dır. Ülkede her 100 bin kişiden 468'ine kanser teşhisi konulurken, Avustralya'yı, 438 ile Yeni Zelanda ve 374 ile İrlanda izlemektedir. Türkiye'de ise bu oran 144'dür. GLOBOCAN 2018 raporuna göre gelişmiş ülkelerde kanser görülme oranının, az gelişmiş ülkelere kıyasla fazla olması da dikkati çekicidir [61].

Türkiye kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansı'nın üzerinde seyrederken kadınlarda bir miktar daha düşüktür. Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere oranla kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir. Türkiye'de 2015 yılında yaşa standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde 247.6 kadınlarda ise 177.5'tir (100.000 kişide). Kadınlarda en sık görülen meme kanseri, her 4 kadın kanserinden birisi olmaya devam etmektedir. Bir yıl içinde toplam 17.183 kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur [62].

Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu birbirinden farklı vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumuna birçok gen karışır ancak kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olarak, özellikle genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten bazı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları gösterilmiştir. Bunun yanısıra birçok gendeki epigenetik değişikliklerin meme kanserinin patobiyolojisinde önemli bir rol oynaması muhtemeldir [63].

Meme kanserinin oluşumunda temel risk faktörleri; yaş, geçirilmiş meme hastalığı, menstrual öykü, radyasyona maruz alma, diyet ve alkol alımıdır. Yapılan pek çok çalışmada en önemli risk faktörünün ise ailevi öykü (genetik yatkınlık) olduğu gösterilmiştir [64, 65].

1.5.2. Meme kanserinde biyoreseptörler

Dünya genelinde hastalık kaynaklı yaşam kayıplarının başında kanser gelmektedir. Dolayısıyla kanserlerin çeşitli biçimlerinin erkenden saptanması, hekimler için olduğu kadar hastalar için de son derece önemli bir adımdır. Biyobelirteçler bu konuda merkezi bir rol oynar ve yeni hedefli, etkili terapötiklerin tanımlanması sürecinde katalizör görevi yapar. Biyobelirteçler kanser alanında sıklıkla tümör marker olarak da adlandırılırlar. Biyobelirteçler proteinler (enzim ve reseptörler), DNA, RNA, antikor veya peptid yapıda olabilirler. Bu moleküller tam kan, serum, plazma, dolaşım, dışkı, idrar, meme başı akıntısı veya tükürük gibi salgılardan analiz edilirler. Hastalık biyolojik belirteç çeşitleri, kanserin türüne göre değişiklik gösterir. Kansere karşı klinik uygulamada biyolojik belirteçlerin kullanılmasının esas amacı, hastalığın varlığı veya yokluğu veya tedavi sonucunun bir göstergesi olarak kullanılabilmesidir [66].

Biyolojik belirteçler farklı kategorilere ayrılabilir. Bunlardan ilki erken teşhis veya hastaların taranması için kullanılan biyobelirteçler, ikincisi kanser varlığını/yokluğunu saptamak için kullanılan teşhis biyobelirteçleri, üçüncüsü ise hastaların hayatta kalma olasılıklarını değerlendirmek için kullanılan biyobelirteçlerdir [67]. Meme kanserlerinin rutin tedavisinde ER, PgR ve HER2 markerları kullanılmaktadır. Metastatik meme tümörlerinin yaklaşık %70'i ER ve/veya PgR pozitifdir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü HER2 ise, meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda aşırı ifade edilir. Ayrıca tüm meme ve yumurtalık kanseri vakalarının %5 ile %10'unun kalıtsal olduğu ve bu vakaların %21 ile %40'ından sorumlu meme kanseri duyarlılık genleri BRCA1 ve BRCA2'nin olduğu tespit edilmiştir [68].

Meme kanser genleri olarak bilinen BRCA1 ve BRCA2 genlerini normal genetik yapının parçası olarak herkes taşır. BRCA genleri normal olarak meme

kanserine neden olmaz. BRCA1 ve BRCA2 genleri hücre döngüsü kontrolünde ve DNA hasarına karşı oluşan hücresel yanıtta rol oynayan proteinleri kodlarlar.

Meme kanseri açısından riskli kişiler ise bu genlerde mutasyona sahiptirler. BRCA mutasyonu, geni oluşturan DNA'nın herhangi bir şekilde hasar görmesi durumunda oluşur. BRCA geni mutasyona uğradığında, kırık DNA'nın onarımı ve meme kanserinin önlenmesinde artık etkili olamayabilir. Bundan dolayı, BRCA gen mutasyonu olan insanlarda meme kanseri gelişme riski daha yüksektir. Mutasyona uğramış genin taşıyıcısı, gen mutasyonunu da alt soya geçirebilir [63, 69].

1.5.2.1. BRCA-1

BRCA1 geninin 1994 yılında 17. kromozom üzerinde q12-21 lokusunda yerleştiği belirlenmiştir. 24 eksondan oluşur ve 1.863 aminoasid içeren bir protein kodlar. BRCA1 ailevi meme kanseri vakalarının %45'inden, meme ve yumurtalık kanserinin birlikte olduğu vakalarda ise %90'ından sorumludur [70,71].

BRCA1, genellikle memedeki hücrelerin büyümesini sınırlayan ancak memelilerde bir nedenden dolayı mutasyon gerçekleştiği zaman meme kanserine yatkınlık kazandıran bir genidir. BRCA1 geni tümör supresör genleri olarak bilinen bir gen sınıfına dahildir. Diğer tümör baskılayıcı genler gibi, BRCA1 de hücrelerin çoğalmasını ve çok hızlı ayrılmasını veya kontrolsüz kalmasını engelleyerek hücre bölünme döngüsünü düzenler. Özellikle memedeki süt kanallarını hizalayan hücrelerin büyümesini engeller.

BRCA1 geni tarafından üretilen protein, hasar görmüş DNA'nın tamirinde doğrudan etkindir. Birçok normal hücrenin çekirdeğinde, BRCA1 proteini, RAD51 geni tarafından üretilen protein ile etkileşerek DNA kopmalarını düzeltir. Bu kopmalar, radyasyon gibi çevresel ajanlardan kaynaklanabilir ancak, kromozomal kopmalar genetik materyal alışverişinde doğal olarak da gerçekleşebilirler. BRCA1 ile benzer bir işleve sahip BRCA2, aynı zamanda RAD51 ile etkileşime girer ve DNA'yı onarır. Bu üç protein insan genomunun istikrarını korumada önemli bir rol oynamaktadır [72].

BRCA1 geninde 600'den fazla mutasyon bilinmektedir. Birçoğu artmış kanser riski ile ilişkilidir. Bu mutasyonlar; bir DNA baz çiftinde değişim veya bazı

durumlarda genin büyük bir kısmında duplikasyon/delesyon olabilir. Mutasyona uğrayan bir BRCA1 geni, anormal derecede kısa olduğu için düzgün çalışmayan bir protein üretir. Kusurlu BRCA1 proteini, diğer genlerde oluşan mutasyonları düzeltmeye yardımcı olamaz. Bu kusurlar birikir ve hücrelerin büyümesine ve kontrolsüz olarak bölünmesine sebebiyet vererek bir tümör oluşturabilir [71].

1.5.2.2. BRCA-2

BRCA2 geni 13.kromozomun q12-13 lokusunda 1995 yılında tespit edilmiştir. BRCA2 geniş bir gen olup 27 eksondan oluşur ve 3.418 aminoasit ihtiva eder. Ailevi meme kanseri vakalarının %35'inden sorumludur [70, 71].

BRCA2 geni, BRCA1 ile benzer fonksiyonlara sahiptir. Tümör supresörü gibi davranan bir protein yapmak için talimatlar sağlar. BRCA2 proteini, hasar görmüş DNA'nın onarımı ile ilgilidir. Birçok normal hücrenin çekirdeğinde, BRCA2 proteini, DNA'daki kopmaları düzeltmek için birkaç başka proteinle etkileşime girer. Bu kopmalar doğal ve tıbbi radyasyon veya diğer çevresel etkenlerden kaynaklanabilir. DNA'nın onarılmasına yardımcı olarak, BRCA2 proteini, bir hücrenin genetik bilgisinin istikrarını korumada kritik rol oynamaktadır. Araştırmacılara göre, BRCA2 proteini hücrelerde ek fonksiyonlara sahiptir. Örneğin, protein çekirdeğini çevreleyen sitoplazma iki ayrı hücre oluşturmak üzere bölündüğünde hücre bölünmesindeki basamağı olan sitokinezi düzenlemeye yardımcı olur [72].

Halen ailesel meme kanseri için en şiddetli etkiye sahip mutasyonları taşıyan bu iki gen, meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınlar yaşamları boyunca %60 ile %80 meme kanseri riski taşırlar [73]. BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan bir kadın kanser olmadan 80 yaşına kadar yaşayabilir veya 20'li yaşlarda kanser gelişebilir. Daha öncede belirtildiği gibi birçok çevresel faktörler, beslenme tarzı, egzersiz, hormonal tedavi ve karsinojenlere maruz kalma gibi faktörler bu farklılıktan sorumlu olabilir.

Farklı mutasyon tiplerine rağmen BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonların büyük bir kısmı tek tiptir. Yapılan çalışmalarda bazı mutasyonların

topluma ve etnik gruba özel olduğu da belirlenmiştir. BRCA1 ve BRCA2'nin güçlü bir atasal mutasyon etkisine sahip toplumlarda, aynı tip mutant aleller daha yüksek sıklıkla olduğu bulunmuştur. Örneğin Ashkenazi yahudilerinde üç tane ortak BRCA1/BRCA2 atasal mutasyonları vardır. Bunlar BRCA1'deki 185delAG ve 5382insC mutasyonları, BRCA2'deki 6174delT mutasyonudur [74]. Türk toplumunda ise 2010 yılında 106 yüksek riskli meme ve ovaryum ile 50 yüksek riskli prostat kanserli hastalarda yapılan BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait mutasyon taramalarında, meme ve ovaryum kanserli hastalarda 3 tane BRCA1 geninde, 3 tanede BRCA2 geninde zararlı mutasyonlar ve farklı varyantlar gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda Türk toplumuna özgü sayılacak tekrarlayan bir mutasyon bildirilmemiş olup oldukça heterojen bir mutasyon spektrumu gözlenmiştir [75].

Meme kanseri ile ilişkili mutasyon genlerinin (BRCA-1,2) tanımlanmasından yaklaşık 20 yıl sonra bu genleri taşıyan ünlü sanatçı Angelina Jolie'nin BRCA1 taşıyıcısı olduğu belirlendikten sonra, BRCA 1,2 testlerini yaptıran kadın sayısı da iki katından daha fazla artırmıştır. Tanınmış bir yüzün farkındalığın oluşmasındaki rolü son derece belirgindir [76].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda görülen önemli bir sağlık problemidir. Çok sık görülen bir kanser olması ve son yıllarda görülme oranının artması nedeniyle meme kanserinin tedavisi büyük önem kazanmıştır. Meme kanserinin bilimsel tıbbi tedavisinde kemoterapi, cerrahi tedavi, radyoterapi ve hormon terapi yöntemleri kullanılmaktadır. Kullanılan bu tedavi yöntemlerinin başarı şansının görece düşük olması ya da tedaviye bağlı ağır yan etkileri olması nedeniyle hastalar alternatif tıbbi yöntemleri kullanmayı tercih edebilmektedir.

Alternatif tıp, başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak kanser tedavisinde bitkisel içerikli ürünler iki amaçla kullanılmaktadır. Biri hastalığın semptomlarını hafifleterek hastaların yaşam kalitesini arttırmak diğeri ise hastalığı önlemek içindir. Meme kanseri araştırmalarına konu olan ve son yıllarda üzerinde araştırmaların yoğunlaştığı bazı tıbbi bitkiler ve etkili bileşenleri bulunmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız amigdalin ilk kez 19. yüzyılda izole edilmiştir. Amigdalin'in yüzyıldan fazla bir süredir eşsiz antikanser özellikleri hakkında çeşitli raporlar bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğu in-vitro ortamda yapılmıştır. Fakat yeterince uygun çalışmaların olmamasından dolayı, bilim adamları amigdalin'in, pek çok hastalık üzerindeki olumlu etkisini incelemeye başlamıştır. Bunların başında mesane kanseri, prostat kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, serviks kanseri, kolon kanseri, lösemi, kronik böbrek hastalığı, sedef hastalığı, şeker hastalığı gelmektedir.

Syrigos vd. (1998) yapmış olduğu çalışmada, uygun sıcaklık ve pH koşullarında mesane kanseri üzerinde amigdalin'in spesifik bir MAb-b-glukozidaz konjugatı ile kombinasyonunun, amigdalin aktivitesini doza bağlı olarak 115 kata kadar arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada, amigdalin'in tümör bölgesinde spesifik olarak aktive edilebileceği ve malign hücrelerin ise genellikle kemoterapiyle ilişkili sistemik toksisite olmadan öldürülebileceği ifade edilmiştir. Ayrıca amigdalin'in mesane kanserinde tümör tedavisi için gereken ön ilaç olarak kullanılabilmesi önerilmektedir [77].

Kwon vd. (2003), amigdalin'in insan promiyelositik lösemi (HL-60) hücrelerinde apoptozu indükleyebildiğini doğrulamışlardır. Amigdalin, 250 nM beta-

glukosidaz varlığında IC50'si 6.4 mg/mL olan HL-60 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Apoptotik hücre ölümünün indüklenmesine bağlı olarak internükleozomal DNA fragmantasyonu ve nükleer morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir [78].

Park vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, amigdalin'in insan kolon kanseri SNU-C4 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve mekanizmanın hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonunun inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir. Başka bir ifadeyle amigdalin'in, kolon kanseri hücrelerinin, hücre döngüsünde rol alan DNA'ya zarar vererek anti-karsinojen etki gösterdiği ve bu nedenle kanser ilacı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [79].

Chang vd. (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada amigdalin'in insan prostat kanser hücrelerinde (DU145 ve LNCap) programlanmış hücre ölümünü teşvik ettiği saptanmıştır. Amigdalin uygulaması ile anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin aktivitesi azalırken, pro-apoptotik Bax proteininin ise DU145 ve LNCaP hücrelerinde aktivitesi artmıştır. Araştırmacılar amigdalin'in prostat kanserinde tedavi amaçlı kullanılabilceğini göstermişlerdir [80].

Hwang vd. (2008) amigdalin'in ağrı hafifletici etkisini gözlemek için öncelikle sıçanlarda formalinin lokal enjeksiyonu ile ağrı oluşturulmuştur. Amigdalin 0.1, 0.5, 1.0 ve 10.0 mg/kg dozlarında sıçanlara uygulanmıştır. Amigdalin'in intramüsküler enjeksiyonu, hem erken (formalin enjeksiyonundan sonraki ilk 10 dakika) hem de geç fazlardaki (başlangıçtaki formalin enjeksiyonundan 10-30 dakika sonra) formalin kaynaklı tonik ağrıları önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Geç faz sırasında, amigdalin, formalin kaynaklı ağrıyı, doza bağlı bir şekilde 1 mg/kg'dan daha az bir dozda azaltmıştır. Bu sonuçlar, amigdalin'in inflamatuvar ağrıyı hafifletmede etkili olduğunu ve anti-nosiseptif ve anti-inflamatuvar özelliğiyle analjezik olarak kullanılabilceğini gösterilmiştir [81].

Mirmiranpour vd. (2012) amigdalin'in diyabetik sıçanların endotel hücreleri üzerindeki anti-anjiyojenik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada toplam 20 diyabetik sıçan amigdalin uygulaması yapılan ve yapılmayan olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Diyabetin başlatılmasından sekiz hafta sonra, tedavi grubundaki sıçanların periton içine amigdalin (3 mg/kg) enjekte edilmiş ve bir gün sonra, sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Hücre kültürü çalışması sonucunda amigdalin uygulanan grupta, amigdalinin diyabetik sıçanların aort halkalarında anjiyogenez üzerinde inhibitör etki

uyguladığı belirlenmiştir. Araştırmacılar amigdalin'in olumsuz anjiyogenik koşulların tedavisi için yeni bir yol açabileceğini söylemişlerdir [82].

Chen vd. (2013) amigdalin'in serviks kanseri HeLa hücrelerinde belirgin bir şekilde apoptozu tetiklediğini gözlemlemişlerdir. Amigdalin uygulaması ile antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin aktivitesi azalırken, proapoptotik Bax proteininin ise HeLa hücrelerinde aktivitesi artmıştır. 24 saatlik zaman sürecinde amigdalin'in 1.25, 2.5, 5, 10 ve 20 mg/mL konsantrasyonları uygulanmıştır. Özellikle yüksek amigdalin konsantrasyonlarında HeLa hücrelerinin şekillerinin yuvarlaklaştığı gözlemlenmiştir. Amigdalin'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak aynı yönde kaspaz 3 aktiviteside artmıştır. Yapılan çalışmada amigdalin'in tümör büyümesini inhibe ettiği ve serviks kanserinin tedavisinde kullanılabileceği belirlenmiştir [83].

Makarevic vd. (2014) tarafından yapılan bir in-vitro çalışmada amigdalin'in (1.25-10 mg/mL) mesane kanseri hücreleri UMUC-3, RT112 ve TCCSUP üzerindeki etkisi incelenmiş olup, G₀/G₁ fazında hücre döngüsünü durdurarak bu hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır. Bu çalışmanın yapılacak in-vivo uygulamasıyla anti-tümör ilacı olarak kullanılabileceği önerilmektedir [7].

Moon vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada insan kanser hücrelerinde ve MRC-5 fibroblast hücrelerinde amigdalin'in hücre büyümesi ve telomeraz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Amigdalin'in β-glukozidaz aktivitesini artırarak insan kanser hücrelerinde hücre büyümesinin inhibisyonuna ve telomeraz aktivitesinin aşağı regülasyonuna neden olmuştur [84].

Qian vd. (2015), akciğer kanser hücrelerinde H1299/M ve PA/M, amigdalin uygulamasının metastazı inhibe ettiğini saptamışlardır. Amigdalin uygulaması ayrıca kanser hücrelerinde metastazı inhibe ettiği bilinen katedrin E'nin regülasyonunu da arttırmıştır. Çalışmada amigdalin'in metastaz oluşumdaki sinyal yolunu önleyerek akciğer kanserinde anti metastatik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [85].

Juengel vd. (2016) yaptıkları çalışmada böbrek kanser hücreleri A498, Caki-1 ve KTC-26'yı 24 saat veya 48 saat boyunca 10 mg/mL'lik bir dozda amigdalin'e maruz bırakmışlar. Amigdalin'in G₂/M fazındaki (Caki-1, A498) veya S fazındaki hücre sayısını (KTC-26) azalttığını, G₀/G₁ veya S'deki hücre sayısını arttırdığını bulmuşlardır. Böylelikle önemli ölçüde böbrek kanser hücrelerinin büyümesinin ve

çoğalmasının önleildiği rapor edilmiştir. Ayrıca belirgin bir şekilde hücre döngüsü aktivatörlerinin de azalttığı belirtilmiştir [86].

Lee ve Moon (2016) Hs578T, MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine amigdalin'in 0, 10, 20 ve 40 mg/mL konsantrasyonlarını 24 saatlik zaman diliminde uygulanmışlardır. Yapılan çalışmada amigdalin pro-apoptotik Bax proteininin aktivitesini artırırken, anti-apoptotik Bcl-2 proteinin aktivitesini azaltmıştır. Araştırma sonucunda amigdalin'in apoptozu indüklediğinden pro-apoptotik ajan olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir [87].

Makarević vd. (2016) yaptıkları çalışmada, prostat kanser hücreleri LNCaP, DU-145 ve PC3 24 saat veya 2 hafta boyunca amigdalin'in farklı konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Bu dozlara bağlı olarak 10 mg/ml'de maksimum etki ile tümör hücresi büyümesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Amigdalin'in prostat kanser hücreleri üzerinde önemli düzeyde anti-tümör aktivite gösterdiği ve bu nedenle de tedavi amacıyla kullanımı üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir [88].

Juengel vd. (2016) yaptıkları çalışmada böbrek kanser hücreleri üzerinde amigdalin'in antitümör ve metastatik etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda böbrek kanser hücrelerinin amigdaline maruz bırakılmasının metastatik yayılmayı inhibe ettiğini ve bunun a5, a6 integrinlerinin aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle, amigdalin'in *in-vitro* antitümör aktivitesi uyguladığını ve bunun integrin düzenlemesiyle bağlantılı olabileceğini ifade etmişlerdir [89].

Zhang vd. (2017) tarafından akut akciğer hasarı üzerinde amigdalin'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda amigdalin'in inflamasyona neden olan hücresel faktörlerin sayısını azalttığı ve lipopolisakkaritlerin üretimini indükleyerek akut karaciğer hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [90].

Kolesar vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada 28 günlük bir süre zarfında saf amigdalin ve kayısı çekirdeklerinin tavşan sperm hareketleri üzerindeki etkileri çeşitli parametrelerle değerlendirilmiştir. Tavşanlar, her grupta 4 erkek olmak üzere beş gruba (Kontrol, P1, P2, P3, P4) rastgele bölünmüş. Kontrol grubu, hiçbir amigdalin yada kayısı çekirdeği almazken, deney grupları P1 ve P2, günlük 0.6 ve 3.0mg/kg'lık bir dozda günlük kas içi amigdalin enjeksiyonu, P3 ve P4 ise günlük 60 ve 300mg/kg ezilmiş kayısı çekirdeğiyle karıştırılmış olarak 28 gün boyunca

almışlardır. CASA sistemi kullanılarak spermelerin hareketliliği, hızı vb. parametreler değerlendirilmiştir. Saf amigdalin'in intramusküler uygulanması, sperm hareketlerinde zaman ve doza bağlı olarak önemli bir düşüşle sonuçlanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda kayısı çekirdeklerinin oral kullanımının tavşan sperm hareketliliği üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir [91].

Jumaa vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada serviks kanserinde amigdalin'i ve proton pompası inhibitörü olarak bilinen aynı zamanda antikanser özelliğinden dolayı esomeprazol'ı birlikte kullanmışlardır. HeLa kanser hücrelerinde amigdalin'in ve esomeprazol'un tek başına ve birlikte uygulanmaları durumunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, kanser hücreleri üzerinde birlikte uygulama yapılanlarda sitotoksitenin daha fazla olduğunu belirlemişlerdir [92].

Zhang vd. (2018) tarafından kronik pankreas hasarı olan sıçanlarda amigdalin'in pankreas fibrozisi üzerindeki terapötik etkileri araştırılmıştır. Amigdalin 10 mg/kg 3 gün boyunca günde bir kez ve daha sonra her 2 günde bir verilmiştir. Vücut ağırlığı her 7 günde bir gözlenmiştir. Pankreas kan akımı ve histopatolojik değişiklikler 28. günde değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada sıçanlara amigdalin uygulanması, vücut ağırlığını ve pankreas kan akışını iyileştirmiş, ayrıca a-SMA, PDGF-BB, TGF3 ifadelerinin aşağı regülasyonu ile birlikte pankreas fibrozisi ve tahribatını iyileştirdiği ifade edilmiştir [93].

Sireesha vd. (2019) şimdiye kadar ağız kanser hücrelerinde anti karsinojen etkisi çalışılmamış olan kayısı ve bademden elde ettikleri amigdalin'i kullanmışlardır. Bu çalışmada her iki bitkiden elde edilen amigdalin'in 10, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Bademden elde edilen amigdalin 50 µg/mL'de maksimum etkinlik ile hücrelerin %78'ini öldürürken, kayısıdan elde edilen amigdalin ise 100 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %82'sini öldürerek anti tümör etkisini göstermiştir. Ayrıca ağız kanserinde amigdalin'in sitotoksik etkileri incelendiğinde kayısının bademden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Sireesha vd. yapmış oldukları bu çalışmada amigdalin'in ağız kanserinde anti kanser özelliğinin ortaya çıkarılması için kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu ifade etmişlerdir [94].

Abboud vd. (2019) amigdalin uygulaması MCF-7 ve T47D insan meme kanseri hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak her iki hücrenin büyümesini azaltabilmiştir. Araştırmacılar bu inhibisyonun oksidatif stres ile

korelasyonunu araştırmak için, amigdalin uygulaması yapılan her iki hücrende, malondialdehit (MDA) ve okside olmuş glutatyon seviyelerini indüklediğini belirlemişlerdir. Ayrıca, bu işlem toplam glutatyon ve glutatyonredüktaz aktivitesinin de azalmasına neden olmuştur. Tümör hücrelerinin bu inhibisyondan orantılı olarak hayatta kalması, toplam glutatyon ile pozitif olarak ilişkiliydi, ancak amigdalin veya MDA seviyeleri ile ters orantılıydı ($P < 0.001$). MCF-7 hücrelerinde toplam glutatyon üretimi amigdalin ile muamele edilmemişlerde, amigdalin uygulaması yapılan hücrelere göre altı kat daha yüksekti, ancak bu fark, T47D hücrelerinde 2.1'e düşmüştür. Bu verilerin, oksidatif stresin indüklenmesine dayalı olarak meme kanseri hücrelerinde amigdalin'in anti tümör etki mekanizmasını desteklediğini belirlemişlerdir [95].

Tang vd. (2019) karaciğerde amigdalin uygulamasının malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), alanin transaminaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyelerini azaltarak histopatolojik değişikliklere neden olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada ayrıca amigdalin, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-1 β ve IL-6 salgılanmasını azaltarak, karaciğer inflamasyonunu önlemiştir [96].

Mani vd. (2019) amigdalin'in prostat kanseri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. DU-145 ve PC3 prostat kanser hücreleri, amigdalin'e maruz bırakılarak, amigdalin'in kemotaksis ve göç üzerindeki etkileri araştırılmış ve hücrelerdeki α , β integrin seviyelerinde değişikliğe neden olduğu gözlemlenmiştir. Amigdalin uygulanması DU-145 hücrelerinde kemotaksis aktiviteyi ve göçü önemli derecede azaltırken, PC3 hücrelerinde ise değişiklik gözlemlenmemiştir. İntegrin $\alpha 6$ sadece DU-145 hücrelerinde amigdalin ile azalırken, $\beta 1$ sadece PC3 hücrelerinde artmıştır. Yapılan çalışmada amigdalin'in prostat kanseri hücrelerinde integrinler tarafından teşvik edilen metastatik yayılmayı inhibe edebileceği belirlenmiştir [97].

Moradipoodeh vd. (2019) SK-BR-3 insan meme kanseri hücrelerinde, apoptozda görev alan pro-apoptotik Bax proteini ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin düzeylerini araştırmıştır. SK-BR-3 hücrelerinde Bax ve Bcl-2 seviyesi western blot analizi ile ölçülmüştür. Amigdalin, doza bağlı bir şekilde 24 saatlik uygulanmasından sonra SK-BR-3'te hücre canlılığının önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Amigdalin, pro-apoptotik Bax proteinini artırarak ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ifadesini azaltarak SK-BR-3 hücrelerinde apoptotik ölüme neden

olmuştur. Sonuçlar, amigdalin'in, özellikle SK-BR-3 hücrelerinde, meme kanseri tedavisi için değerli bir aday olabileceğini göstermektedir [98].

Arshi vd. (2019) tarafından yapılan bu çalışmada, amigdalin'in insan kanser hücrelerinde (A549, MCF7, AGS), iki anti-apoptotik gen (Survivin, XIAP) ve iki lncRNA (GAS5, MALAT1) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. RT-qPCR analizini kullanarak, amigdalin uygulaması yapılan (24, 48 ve 72 saat) ve işlem görmemiş gruplar arasında A549, MCF7 ve AGS kanser hücrelerinde apoptoz ile ilgili genlerin mRNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Her iki hücre grubundan RNA ekstre edilip ve sonra cDNA'lar sentezlenmiştir. RT-qPCR analizi, Survivin, XIAP, GAS5 ve MALAT1'in amigdalin ile tedavi edilmiş kanser hücrelerinde gen ifadesinin, işlenmemiş hücrelere kıyasla önemli ölçüde farklı olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, bu ifadeler tedavi süresine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Amigdalin, uygulaması yapılmamış gruplara kıyasla uygulama yapılan Survivin ve XIAP genlerinin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Araştırmacılar, Amigdalin'in A549, MCF7 ve AGS insan kanser hücrelerinde çeşitli gen ifadeleri nedeniyle doğal bir terapötik anti kanser ilacı olarak kullanılabilirliğini belirtmişlerdir [99].

Kovacova vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada intramüsküler olarak tavşanlara enjekte edilen saf amigdalin ile ezilmiş kayısı çekirdeğini ağız yoluyla alan tavşanların kemik mikro yapısında amigdalin'in değişikliklere neden olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada, 20 tane klinik açıdan sağlıklı 5 aylık erkek tavşanlar beş gruba ayrıldı. A1 ve A2 gruplarından gelen hayvanlara 28 gün boyunca günlük intramüsküler olarak 0.6 ve 3 mg/kg dozlarında amigdalin enjekte edilmiştir. S1 ve S2 gruplarına ise, 28 gün boyunca 60 ve 300 mg/kg dozlarında ezilmiş acı kayısı çekirdeği ile karıştırılmış ticari yem verilmiştir. Kontrol (C) grubuna herhangi bir amigdalin verilmemiş. İntramüsküler ve ağız yoluyla amigdalin uygulaması, tavşanların toplam vücut ağırlığını, femur uzunluğunu, kemik mineral yoğunluğunu etkilememiştir. Bununla birlikte, histolojik analiz (2D analiz) ile amigdalin'e maruz kalan tavşanların kompakt kemik mikro yapılarında belirgin değişiklikler olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmada kullanılan dozlarda subakut amigdalin'e (hem intramüsküler hem de peritonal) maruz kalmanın kompakt kemik yeniden şekillenmesini etkilediğini ifade etmişlerdir [100].

Wang vd. (2019) kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) üzerine amigdalin'in etkisini araştırmışlardır. Fareler sigara dumanına maruz bırakılmış ve farklı amigdalin konsantrasyonları ile muameleden sonra bronş epitel hücreleri incelenmiştir. Sonuçlar, E-katerin ifadesinin anlamlı şekilde arttığını gösterirken, vimentin, TGF-P1 ifadesinin, amigdalin ile tedavi edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığını göstermiştir. Bundan dolayı yapılan bu çalışma KOAH sonrası amigdalin'in koruyucu bir rolü olduğunu göstermiştir [101].

Kovacıkova vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada saf amigdalin'in intramüsküler enjeksiyonu ve ezilmiş acı kayısı çekirdeğinin ağızdan verilmesinin tavşanların genel sağlık durumu üzerinde değişikliklere neden olup olmadığını incelemiştir. Bu çalışmada toplam 60 yetişkin tavşan rastgele beş gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu, hiçbir amigdalin almazken, iki deney grubu E1 ve E2, 0.6 ve 3.0 mg/kg dozlarında günlük bir kez kas içi amigdalin enjeksiyonu almıştır. E3 ve E4 grupları ise, ezilmiş acı kayısı çekirdeği (*Prunus armeniaca L.*), 60 ve 300 mg/kg dozlarında, yemle karıştırılarak verilmiş. Hayvanların 14 gün sonra kan örnekleri alınarak biyokimyasal, hematolojik ve antioksidan enzim aktiviteleri analiz etmiş ve istatistiksel olarak değerlendirmişlerdir. Kısa süreli amigdalin uygulamasının biyokimyasal parametreler üzerinde, özellikle üre, bilirubin, kolesterol seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Tavşanların SOD aktivitesi, kayısı çekirdeği tüketiminden (102.3 U/ml) sonra kontrolle (117.4 U/ml) karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, kısa süreli amigdalin tüketiminin tavşanların sağlık durumu üzerinde sadece hafif bir etki göstermiş olduğunu ve önerilen dozlarda kullanımının sağlık için bir risk teşkil etmediğini ifade etmişlerdir [102].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada kullanılan amigdalinler

Çalışmamızda, Amigdalin (Sigma-Aldrich, %98), kontrol numunesi (CRM) olarak, Amigdalin A, laboratuvarlarımızda yerel pazardan satın alınan acı kayısı çekirdeğinden elde edilen amigdalin. Amigdalin B (Novodalın) yurt dışında gıda takviyesi olarak satın alınan amigdalin kullanılmıştır.

3.1.1. Çalışmada kullanılan ajanlar

Amigdalin standart saflığı $\geq\%$ 97, (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya), n-hekzan (Sigma-Aldrich %97 Münih, Almanya), dietil eter $\geq\%$ 98 (Sigma-Aldrich, Münih, Almanya), potasyum bromür (spektroskopik saflıkta), metanol $\geq\%$ 98 (Merck, Darmstadt, Almanya), ultra saf su (18.2M Ω , Millipore Milli-Q).

3.1.2. Çalışmada kullanılan siyanoglukozit bitki

Çalışmada saflaştırılacak amigdalin kaynağı olarak, yerel kayısı pazarından satın alınan acı kayısı çekirdeği kullanıldı. Acı kayısı çekirdeklerinin sert dış kabukları kırılarak çıkartıldı ve ince kabuklu çekirdek içleri deney zamanına kadar -20 °C'de bir buzdolabında bekletildi.

3.1.3. Ekstraksiyon ve izolasyon prosedürü

Acı kayısı çekirdek içleri (5 g), ılık saf suda 1 saat süreyle ıslatıldı, dış ince kabukları elle ovularak soyuldu. Acı kayısı çekirdek içleri bir filtre kağıdı üzerine yerleştirilerek pastör fırınında 37⁰C'de 2 saat kurutulduktan sonra bir blendırda(Moulinex ODACIO DFCx) 20 sn çekilerek elde edilen çekirdek parçacıklarına (2 g) 100 ml'lik erlen içine alınarak 50 ml ultra saf su (18.2M Ω) eklendi. Erlendeki amigdalin ekstraktları 37⁰C (yapılan çalışmalara göre enzimsel

denatürasyonla neoamigdaline dönüşmesini önlemek için optimum çalışma sıcaklığı)'de çalkalamalı su banyosunda 100 dk inkübe edildi. Ekstraktlar bir vakum pompası yardımıyla filtrelenerek (Whatman No.1) 50 ml'lik plastik falkon tüplere transfer edildi. 50 ml'lik poliüretan falkon tüplere n-hekzan (10ml) eklenerek 3 kez, 1'er dk vorteksleme ve 10 dk santrifüj sonrasında (3.250*g Hettich Zentrifugen Universal 320 R) başka bir falkon tüpüne aktarılarak süpernatantlar uzaklaştırıldı. 12 saat bir ayırma hunisinde 4⁰C'de bekletildi, geriye kalan hekzan kalıntıları dönerli bir evaporator (İka low BP, 35⁰C, 7 mbar) ile uzaklaştırılarak son ürün çekerocakta 10 ml dietiler içerisinde amigdalin'in çökmesi için oda sıcaklığında (20±2°C) 24 saat inkübe edildikten sonra amigdalin elde edildi [103, 104, 105].

3.1.4. İzole amigdalin FT-IR analizi

Bütün örneklerin hazırlanması için bir potasyum bromür disk tekniği kullanıldı. 1 mg'lık örnekler ayrı ayrı 150mg KBr ile homojenleştirildi. Katı karışım vakumlandı ve preslenerek pelet halinde getirildi. IR spektrumları, standart DTGS/KBr dedektörü FT-IR (Tensor 37, BRUKER) spektrometresine kaydedildi ve 2 cm x1 çözünürlükte 4000-400cm⁻¹ dalga boyu aralığında tarama yapıldı [103, 106].

3.2. Amigdalin'in meme kanseri üzerine etkisine yönelik deneyler

3.2.1. Çalışmada kullanılan ajanlar

DMBA, Tamoksifen, Amigdalin A, Amigdalin B, Ksilazin, Ketamin

3.2.2. Çalışmada kullanılan karsinojenik ajan

DMBA (7-12 dimethylbenz[a]anthracene) (%98.5, J&K Scientific GmbH, Freburgerstrasse, Almanya), dişi sıçanlara 5 mg DMBA'da %25 etanol içeren susam yağında 0.5 ml taze hazırlandıktan sonra, birer hafta ara ile intraperitoneal olarak 3 kez enjekte edildi.

3.2.3. Çalışmada kullanılan olası anti-karsinojenik ajanlar

Amigdalın A: Üniversitemiz laboratuvarlarında farklı yöntemle sentezlenen amigdalın,

Amigdalın B: Dünya piyasasında destek amaçlı satılan amigdalın,

Amigdalın A ve B, 10 mg, koruma grubuna izotonik su içerisinde çözdürülerek deney başlangıcından itibaren 3 gün ara ile gavaj yoluyla deneklere verildi.

Amigdalın A ve B, 50 mg, kanser tedavi grubuna izotonik su içerisinde çözdürülerek deney başlangıcından itibaren 3 gün ara ile gavaj yoluyla deneklere verildi.

3.2.4. Çalışmada kullanılan anti-karsinojenik ajan

Tamoksifen, 0.05 mg kanser tedavi grubuna, 0.15 ml izotonik su içerisinde çözdürülerek deney başlangıcından itibaren 3 gün ara ile gavaj yoluyla tedavi grubu deneklere verildi.

3.2.5. Çalışmada kullanılan deney hayvanı

Çalışmamızda, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden (İNÜ-DEHÜM) temin edilen 220-230 gram ağırlığında 80 adet *Wistar albino* dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar önceden belirlenen deney protokolüne göre standart kafesler içerisinde oda sıcaklığı $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ arasında olan ortamda barındırıldı. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsüne uyularak özel bir diyeteye tabi tutulmadı.

3.2.6. Çalışmada uygulanan deney protokolü

Çalışmamız İnönü Üniversitesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu 2017/A-2 nolu kararına göre yürütüldü. Kontrol grubu dahil iki aşamalı toplam 8 grup oluşturuldu. Her grupta istatistiksel anlamlılığın sağlanması amacıyla 10 rat olacak

şekilde tasarlandı. Koruma grubu ve kanser gruplarında ayrı ayrı ölümler başladığında gruplar sakrifiye edilerek gerekli analizler yapıldı.

Deney Protokolü

1- Aşama Koruma Grubu;

- I- Sağlıklı kontrol grubu(n:10)
- II- DMBA injeksiyonu ile beraber Amigdalın A (10 mg) gavaj yoluyla uygulama(n:10)
- III- DMBA injeksiyonu ile beraber Amigdalın B (10 mg) gavaj yoluyla uygulama(n:10)

2- Aşama Tedavi Grubu;

- I- Sağlıklı kontrol grubu(n:10)
- II- DMBA injeksiyonu sonrası kanserleştirilmiş kontrol grubu(n:10)
- III- DMBA injeksiyonu ile kanser oluşum sonrası Amigdalın A (50 mg) gavaj yollu uygulanması(n:10)
- IV- DMBA injeksiyonu ile kanser oluşum sonrası Amigdalın B (50 mg) gavaj yollu uygulanması(n:10)
- V- DMBA injeksiyonu ile kanser oluşum sonrası Tamoksifen ilaç tedavisi (0.05 mg) gavaj yollu uygulaması(n:10)

3.2.7. Deney periyodunun sonlanması

Çalışmada kullanılan tüm hayvanlarda 50 mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis. Eczacıbaşı, İstanbul) ve 8 mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer. İstanbul) ile anestezi sağlandı. İhtiyaç halinde başlangıç dozunun %20'si aralıklı olarak tekrarlandı.

DMBA enjeksiyonu yapıp hiçbir antikanser uygulaması yapılmayan kanserli kontrol denekleri vegruplardaki deney hayvanlarının genel anestezi altında kalpten

kanları,sakrifiye edilerek meme dokuları alınarak, numuneler analizleri yapılmaya kadar -80°C’de derin dondurucuda saklandı.

3.2.8. Koruma grubu kan örnekleri Cu ve Zn, ICP OES element analizleri

3.2.8.1. Çözünürleştirme işlemleri

Koruma grubu deneklerinden alınan plazma örnekleri 1.0 gr (± 0.02) 50 mL lik kapaklı teflon tüplerde hassas terazide tartıldı. Üzerine 10 mL nitrik asit(HNO_3 65%, Merck) eklendi.

Çözünürleştirme işlemleri, mikrodalga (Mars Xpress, CEM, USA) cihazında Çizelge 3.1 ’de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1 kan örnekleri için uygulanan mikrodalga çözünürleştirme programı

Maksimum güç	Güç (%)	Isıtma süresi (dk)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Soğutma (dk)
800W	100	20	210	5

Seyreltme için, 50 ml kapasiteli kapaklı poliüretan falkon tüpler kullanıldı.10 kat ultra saf su (18.2 M Ω , Milli-Q, Millipore) ile seyreltildi.

3.2.8.2. İndüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) analiz işlemleri

ICP-OES cihazında bakır(Cu) ve çinko (Zn) elementleri için 1. kalibrasyon 20, 40, 80, 100, 200 ppb ve 2. kalibrasyon 200, 400, 800 ve 1000ppb olmak üzere ikiyırı kalibrasyon grafiği 1000ppm lik multi-element kalibrasyon çözeltisi ile çizildi ve numuneler 5 tekrarlı okutulularak RSD%10 sonuçlar kabul edilerek analiz sonuçlarının ortalaması alındı.

3.2.9. Meme dokusunun ELISA testi için hazırlanması

Tüm deney gruplarından alınan meme dokuları neşterle küçük parçalara ayrıldı. Ardından hassas terazide darası alınmış bir ependolf tüpünde 0.1 gr (± 0.02) tartıldıktan sonra içinde 1 ml (pH 7.2 PBS) fosfat tamponu enjekte edilerek bir sonifikatörde 1.5 dk parçalandı (tartım sonrası tüm işlemler enzimsel bozulmaları önlemek için buz havuzunda gerçekleştirildi) numuneler analiz gününe kadar -20°C bir soğutucuda saklandı.

3.2.10. Çalışmada kullanılan BRCA 1/ BRCA 2 biyobelirteç protokolü

BRCA1 ve BRCA2 düzeylerinin ölçülmesinde Rat meme kanseri duyarlılık proteininin monoklonal antikor seviyesini test etmek için çift antikorlu sandviç enzime bağlı immünosorbant test (ELISA) kiti (Sun Red) kullanıldı ve ölçümlerde üretici firmanın özeti;

-Reaktifler, numuneler ve standartlar Sun Red elisa kit prosedürüne göre hazırlandı,

-Hazırlanan örnekler ve standartlar, enzim ile etiketlenmiş (BRCA) antikorları, 37°C 'de 60 dakika reaksiyona sokuldu,

-Plaka beş kez yıkandı, Kromojen çözeltisi A, B ilave edildi, 37°C ' de 10 dakika reaksiyona sokuldu ve kuyucuklarda mavi renk oluştu,

-Durdurma çözeltisi eklendi ve renk sarıya dönüdü,

-OD değeri 10 dakika içinde ölçüldü.

3.2.11. İstatistiksel analiz

Koruma ve tedavi gruplarının ayrı ayrı karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Tümel test sonrası Conover ikili karşılaştırma yöntemi ile gruplara arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Tüm analizlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Meme kanseri sistemik bir hastalıktır ve birçok etken bunu tetikleyebilmektedir. Bunlar içerisinde karsinojen maddeler, hormonal düzensizlikler, inflamasyon, genetik faktörler başta gelmektedir. Bir kişide var olan kronik bir inflamasyon, meme kanseri nedeni olabilir.

Amigdalin 1970'lerde batı ülkelerinde alternatif tıbbi amaçlı kullanılan pek çok antikanser ilaçlarından biridir [85]. O tarihten beri amigdalin'in anti-tümör etkinliği ve buna bağlı mekanizmaları tartışmalıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise bu konuya az da olsa bir ışık tutmaya başlamıştır. Çalışmalar göstermiştir ki amigdalin içinde mevcut olan hidrosiyanik asitin antikarsinojen ajan olarak kanserli hücrelerin öldürülmesi, tümör hücrelerinin besin kaynaklarının bloke edilmesi ve bu hücrelerin büyümesinin inhibisyonunda etkili olabileceğini göstermektedir [14].

Son yıllarda, anti-tümör ilaçlarının gelişimi, ilaç seçiciliğini arttırmaya, yeni hedefli ilaçların geliştirilmesini ve yüksek özgüllüklü ilaçlarla düşük toksisiteyi arttırmaya sitotoksik ilaçlardan aşamalı olarak dönüşmüştür. Amigdalin, anti-tümör aktivitesi, daha az yan etkisi, yaygın kaynaklı ve nispeten düşük fiyatlı doğal bir üründür. Tüm bu özellikler, amigdalin'i, sinerjik etki yaratabilen koşullu kemoterapi ilaçlarıyla birleştirildiğinde umut verici bir antitümör ilaç haline getirebilir.

Kanser hücrelerinde daha fazla β -glukozidaz ve siyanürü nispeten zararsız bileşik tiyosiyanata dönüştüren karaciğer enzimi olan rodenaz'dan daha az olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle kanser hücreleri, amigdalin'in etkisine, sağlıklı hücrelerden daha duyarlıdır [107].

Çalışmamız iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşama yerel pazardan alınan acı kayısı çekirdeğinden amigdalin eldesi çalışmasıdır. İkinci aşama ise yapay yöntemle kanser yapılan ratlarda amigdalin'in hastalığa karşı olası faydalarının araştırılmasıdır.

4.1. Amigdalin eldesi

Yerel pazardan alınan acı kayısı çekirdeğinden amigdalin eldesi çalışmasında çözügen olarak eter ve etanol yerine saflaştırma çalışmalarında kullanılan canlı organizma sindirim sistemine en yakın çözügen saf su kullanıldı. Bu saflaştırma işleminde I.F. Bolorinwa ve arkadaşları'nın [103] farklı sıcaklıklarda, çözügenler ve inkübasyon zamanlarında yaptıkları karşılaştırmalı amigdalin eldesi çalışması baz alınarak yukarıda bahsettiğimiz gibi çözügen olarak seçilen suyun maksimum verim sağlanan inkübasyon süresi 100 dk ve enzimsel toleras sınırı (20-40⁰C) içinde olan aksi taktirde enzimsel denatürasyon sonucu amigdalin yerine neoamigdalin oluşumunu önlemek için 37 ⁰C çalışma sıcaklığı seçildi.

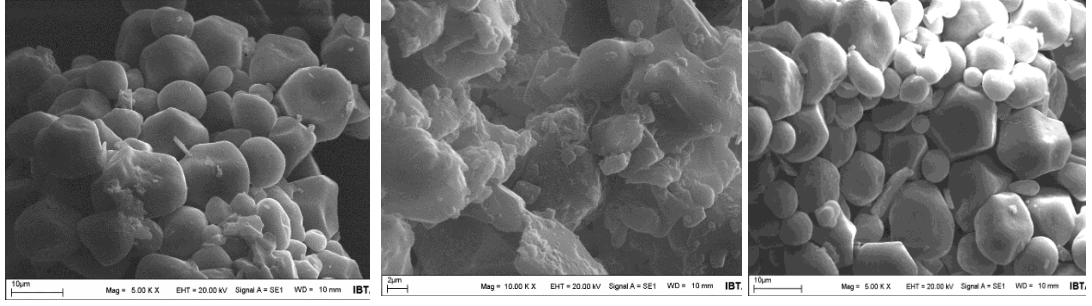
Saflaştırma işlemi sonucu 2 gr numuneden 0.773 mg amigdalin elde edildi. Saflaştırma sürecinde depolama esnasında oluşabilecek muhtemel küf ve oksidasyon gibi kontaminasyonları önlemek için, sentez süresince her defasında işlem baştan alınıp taze hazırlanarak son ürün elde edilmiştir.

Bolarinwa vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise 2 gr şeftali çekirdeğinden 37⁰C sulu ekstraksiyonda 1.4 mg amigdalin, 100⁰C 6.8 mg neoamigdalin, su yerine etanol kullanılan saflaştırma işleminde ise 37⁰C'de 2.2. mg ve 78.5⁰C'de 11.9 mg saf amigdalin elde edilmiştir [103].

Yıldırım ve Aşkın (2010) yapmış oldukları çalışmada acı kayısı tohumlarının amigdalin içeriği ortalama 5.6 g/100 g, tatlı kayısı tohumlarının amigdalin içeriği ise ortalama 0.86 g/100 g olarak belirlenmiştir [109].

Yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi 20-40⁰C arasındaki inkübasyon sıcaklıklarında amigdalin elde edilirken, 20⁰C ve üzeri inkübasyon sıcaklıklarında ise amigdalin izomeri olan ve doğada doğal olarak bulunmayan neoamigdalin elde edildiği görülmektedir.

Şekil 4.1' de çekilen SEM elektron mikroskobu görüntülerinde gözlendiği gibi CRM olarak kullanılan Amigdalin (%98.5 Sigma-Adrich) uluslararası piyasada internet üzerinden satılan amigdalin B ve laboratuvarımızda saflaştırma işlemi sonucu elde ettiğimiz amigdalin A görüntüleri elde edildi. Saflaştırma işlemleriyle alakalı bilimsel yayınlara paralel olarak safsızlık oranı yüksek amigdalin elde edildi. Bu safsızlığa neden suyun kayısı çekirdeği içeriğinde var olan amigdalin hariç diğer bileşenleri uzaklaştırmadaki başarısızlığıydı.



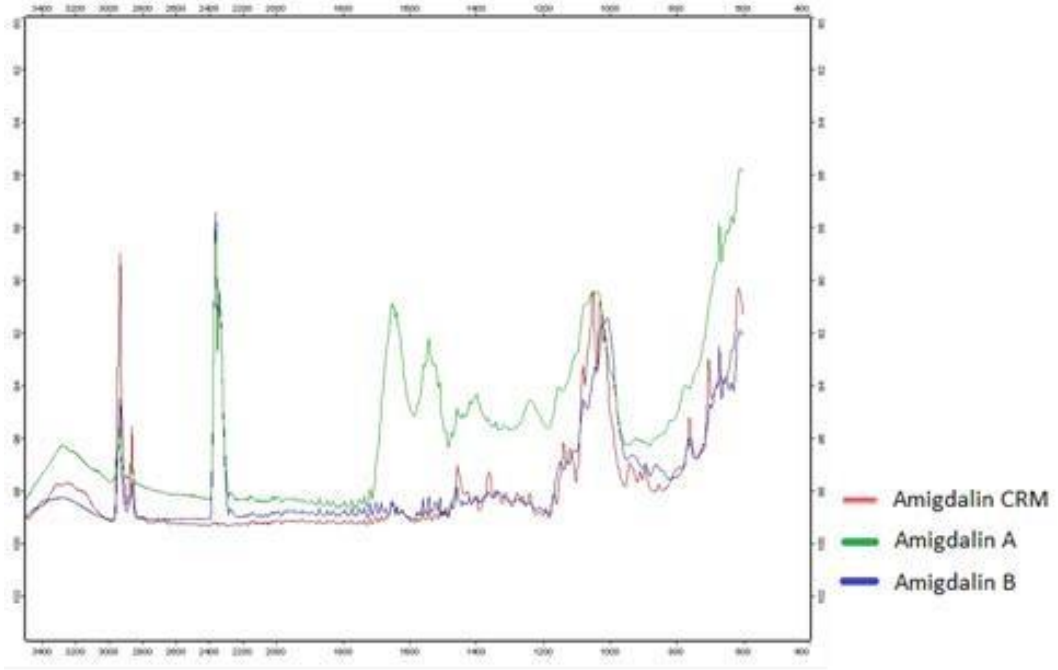
Amigdalın CRM

Amigdalın A

Amigdalın B

Şekil 4.1. CRM olarak kullanılan %98.5 saflıktaki Sigma-Aldrich Amigdalın, laboratuvarında saflaştırdığımız Amigdalın A, yurt dışı internet üzerinden satın alınan Amigdalın B nin SEM elektron mikroskobu görüntüleri

Şekil 4.1’ de gözlenildiği gibi CRM olarak kullanılan amigdalın ve piyasada satılan Amigdalın B ürünlerinin eldesinde üreticiler çözgen olarak su yerine eter ve etanol kullanmasından dolayı, oluşan ürün görüntülerinde neredeyse bütün çekirdek kimyasında bulunan tüm polifenol bileşikler uzaklaştırılmış ve amigdalın kümeleri gözlenmekte iken bizim su ile laboratuvarında saflaştırma işlemi sonucu elde ettiğimiz amigdalın A’da ise az sayıdaki amigdalın molekülleri polifenol bileşikler içerisinde gömülü halde olduğu gözlenmiştir.



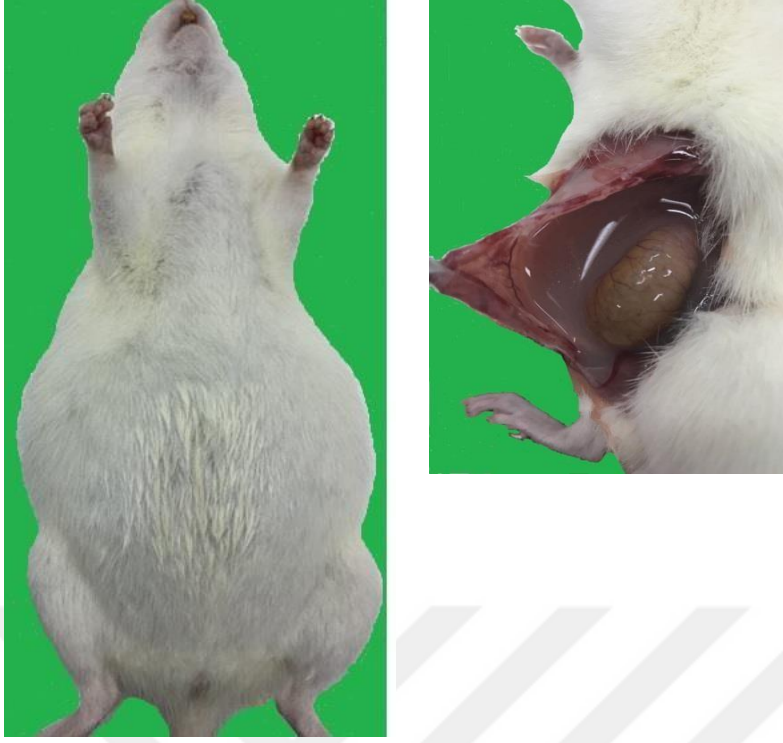
Şekil 4.2. Amigdalın A, B, FT-IR analizi

Ayrıca geliştirilmiş FT-IR analiz metoduyla yapılan analiz sonucunda Şekil 4.2' de görüldüğü gibi IR spektroskopik yöntemle dayanarak, amigdalin fonksiyonel gruplarının varlığı izolatta doğrulanmıştır. İzole amigdalin ve standartlarının IR spektrumları yukarıdaki karşılaştırmalı spektrum grafiğinde belirlenmiştir. Amigdalin yapısında, glukoz kısmından gelen birincil ve ikincil hidroksil grupları, 3640–3100 cm^{-1} dalga boyunda yoğun ve geniş bantlar verir. Daha yüksek dalga boyundaki bantlar birincil hidroksil grubuna karşılık gelirken, düşük dalga boyundakiler ikincil hidroksil gruplarına karşılık gelir. 3000 cm^{-1} den yüksek bantlar, aromatik halkanın C-H gerilme titreşimlerini gösterirken, 2900 cm^{-1} deki sinyal alifatik C-H gerilme titreşimlerini gösterir. C-O bağının esneme titreşimi, 1100 cm^{-1} de bantların ortaya çıkmasına neden oldu. Ayrıca, amigdalin yapısında CN grubunun varlığı nedeniyle 2200 cm^{-1} deki bant fark edilebilir. Amigdalin A diğer amigdalin çeşitlerine göre çözgen olarak kullanılan sudan dolayı yüksek safsızlık kolaylıkla gözlemlenmektedir.

Bizim çalışmamızda asıl amacımız, amigdalin'in meme kanserine olan etkisini araştırmak olduğundan dolayı bu safsızlık deneyin asıl ruhuna aykırı değildir.

4.2. Hayvan Deneyleri

Çalışmamızın ikinci aşaması belirlenen deney protokolü doğrultusunda piyasa ve kendi elde ettiğimiz amigdalin'in *Wistar albino* dişi ratlara uygulama çalışması ile gerçekleştirildi. DMBA (7, 12 dimethylbenz[a]anthracene) karsinogenik ajan enjeksiyonu ile kanser yapılan ratlara Şekil 4.3' de enjeksiyonla beraber koruma ilk çalışma grubuna 10 mg amigdalin A ve B gavaj yoluyla verildi. Kanser kontrol grubunda hastalık belirtileri gözlemlendiği süreçte ise ikinci denek grubuna 50 mg Amigdalin A, B ve 0.05 mg Tamoksifen gavaj yoluyla verildi. Deney 50 mg amigdalin A tedavi grubunda ölümler başlaması ile deney protokolüne uygun olarak sonlandırıldı. Çalışma sonucunda pH 7.2 fosfat tamponunda homojenize edilen rat meme dokuları hazır BRCA1(protein 1) ve BRCA2 (protein 2) eliza kitleleriyle analiz edilmiştir.

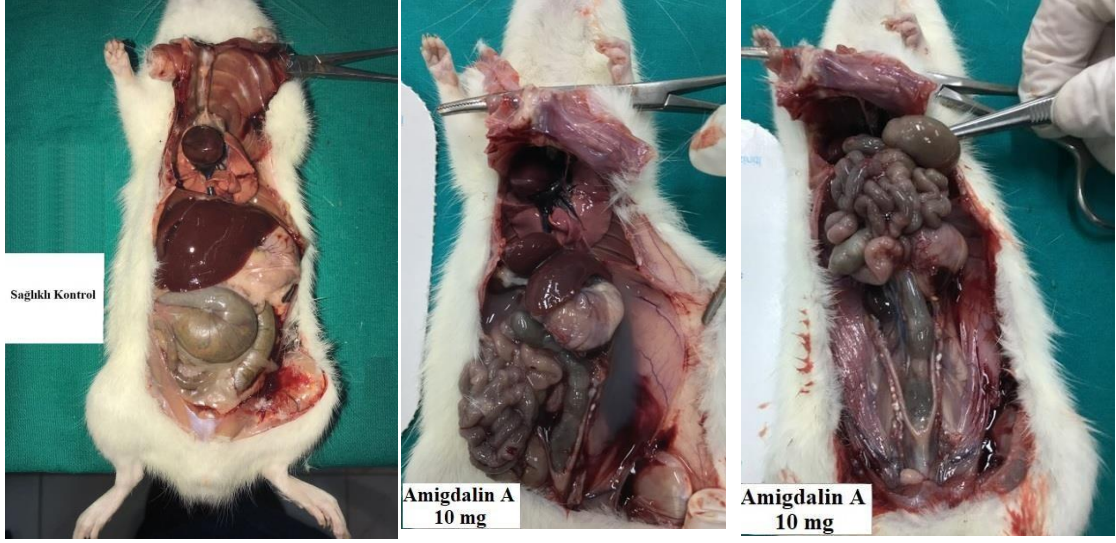


Şekil 4.3. Ratlarda kanser oluşum başlangıcı

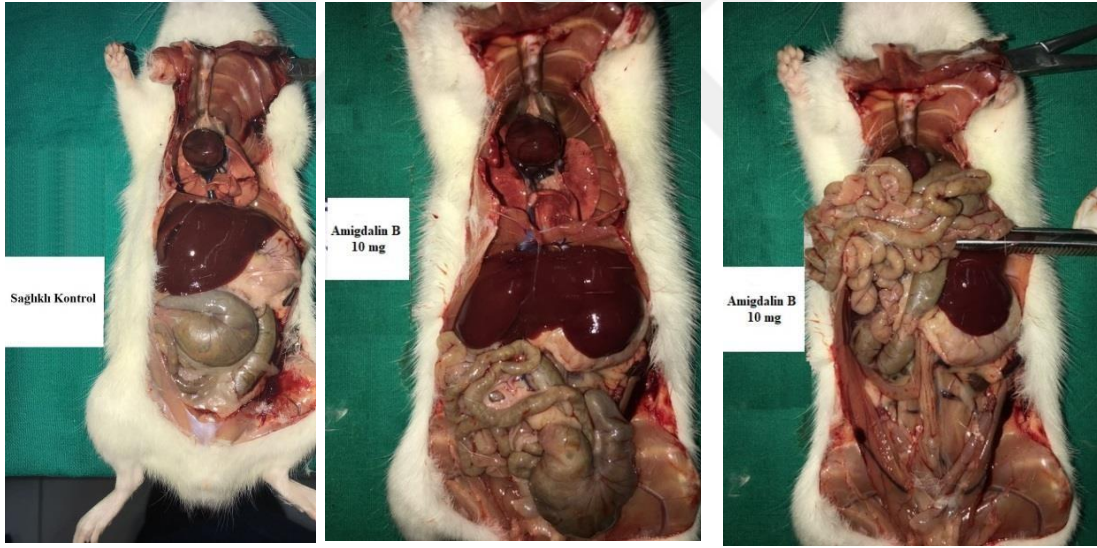
4.2.1. Kanser koruma grubu

4.2.1.1. Kanser koruma grubunda organların morfolojik görünümü

Kanser koruma grubu deney hayvanlarına gavaj yolu ile 3 günde bir 10 mg amigdalin uygulanması 5. hafta sonunda deneyin birinci aşaması sonlandırılarak deney protoküle uygun olarak sakrifiye edilen amigdalin A ve B grubu ratlarda Şekil 4.4. ve Şekil 4.5. de görüldüğü gibi kanserli deneklerde sağlıklı kontrol deneklere göre karın boşluğunda ödem, akciğerde kızarıklık, karaciğerde yağlanma, mide ve bağırsakta bozukluk ve belirgin olarak uterusda kistik oluşumlar gözlenmiştir.



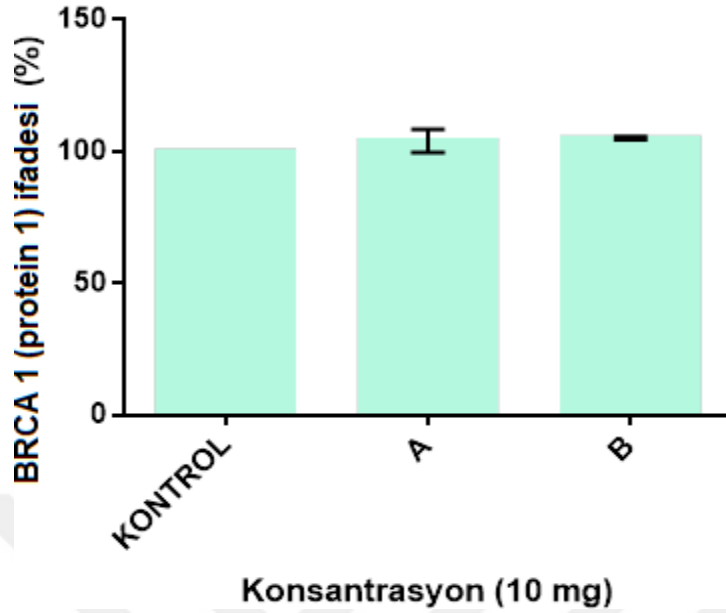
Şekil 4.4. DMBA enjeksiyonu ile beraber, 10 mg Amigdalın A uygulanan ratlarda sağlıklı kontrole göre organlarda oluşan morfolojik farklar.



Şekil 4.5. DMBA enjeksiyonu ile beraber, 10 mg Amigdalın B uygulanan ratlarda sağlıklı kontrole göre organlarda oluşan morfolojik farklar.

Gavaj yolu ile Amigdalın A (10 mg) ve Şekil 4.4 Amigdalın B (10 mg) Şekil 4.5’ de uygulanan deneklerde görüldüğü gibi, amigdalın B uygulanan deneklerde deney sonlanmasında sağ kalım oranı daha düşük olmasına rağmen sağ kalan deneklerde Amigdalın A uygulanan deneklere göre organlardaki kanserleşme daha yavaş olduğu gözlenmiştir.

4.2.1.2. Kanser koruma grubunda BRCA1 ve BRCA2 protein aktiviteleri



Şekil 4.6. BRCA 1'in kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalın A ve Amigdalın B düzeylerinin karşılaştırılması(%)

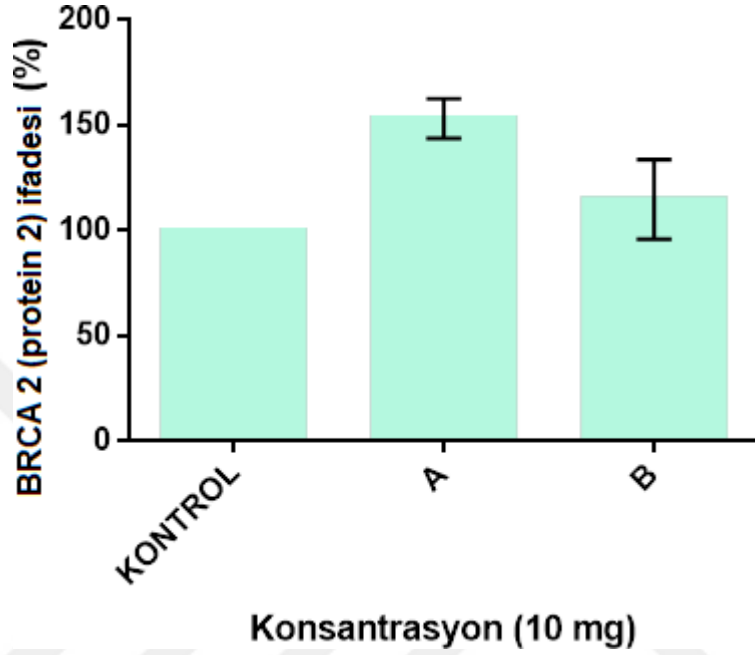
Şekil 4.6' de, laboratuvarımızda saflaştırdığımız amigdalın A, satın alınan ticari amigdalın B ve kontrol grubunun meme dokusunda koruma grubunda BRCA1 düzeyi (%) verilmektedir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, BRCA1 düzeyi Amigdalın A ve B uygulanan gruplarda kontrol grubuyla kıyaslandığında hafif bir artış gözlenmektedir. Dolayısıyla amigdalın uygulaması BRCA1 düzeyini arttırdığı gözlenmiştir. Buda organizmanın tümör oluşumuna karşı mücadele ettiğini gösterebilir.

BRCA proteinleri normal meme epitel hücrelerinin nükleuslarında ifade edilirler. Hücre döngüsünde negatif regülatör etkileri vardır. Yapılan çalışmalarda BRCA ifadesinin meme kanserlerinde kaybolduğu bildirilmektedir [110, 111]. Sun vd. (2002) 26 hastalık serilerinde tüm karsinomalarda, normal meme epiteli ile kıyaslandığında BRCA ifadesinde azalma tespit etmişlerdir [110].

Çandır vd. (2005) BRCA ifadesini düşük dereceli meme kanser hücrelerinde hücre epiteli ile aynı seviyede bulurken, yüksek dereceli tümörlerde ise BRCA ifadesinin şiddeti azalmakta ve çoğunda ise tam kayıp görülmektedir. Yüksek

dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre BRCA ifadesinde belirgin kayıp vardır [111].

Yapmış olduğumuz çalışma literatür verileriyle de uyumlu olup amigdalin uygulaması BRCA1 düzeyini arttırmıştır.



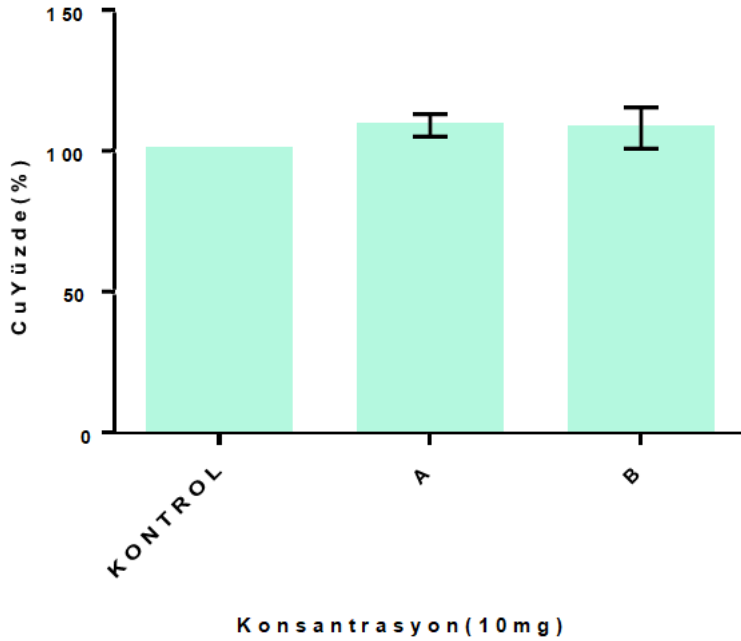
Şekil 4.7. BRCA2'nin kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B düzeylerinin karşılaştırılması(%)

Şekil 4.7.' de laboratuvarımızda saflaştırdığımız amigdalin A, satın alınan ticari amigdalin B ve kontrol grubunun meme dokusunda koruma grubunda BRCA2 düzeyi (%) verilmektedir. BRCA2 (protein 2) ifadesi, Amigdalin A ve B uygulanan grupların kontrol grubuyla kıyaslandığında, amigdalin A uygulanan grupta BRCA2 düzeyinin amigdalin B'ye göre daha fazla arttığı gözlenmektedir.

BRCA2 ifade yüzdesi baz alındığında saflaştırdığımız amigdalin'in ratların kansere direncini ticari amigdaline göre arttırdığı gözlemlenmiştir.

Çandır vd. (2005) yapmış oldukları çalışmada kanser hücrelerinde BRCA1 gen ifadesi %47.57 bulurken BRCA2 gen ifadesini %50.12 bulmuşlardır [111].

4.2.1.3. Kanser koruma grubunda, kanda bakır ve çinko element değerleri



Şekil 4.8. Kandaki Bakır (Cu) yüzdesi, kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B'nin miktarı(%)

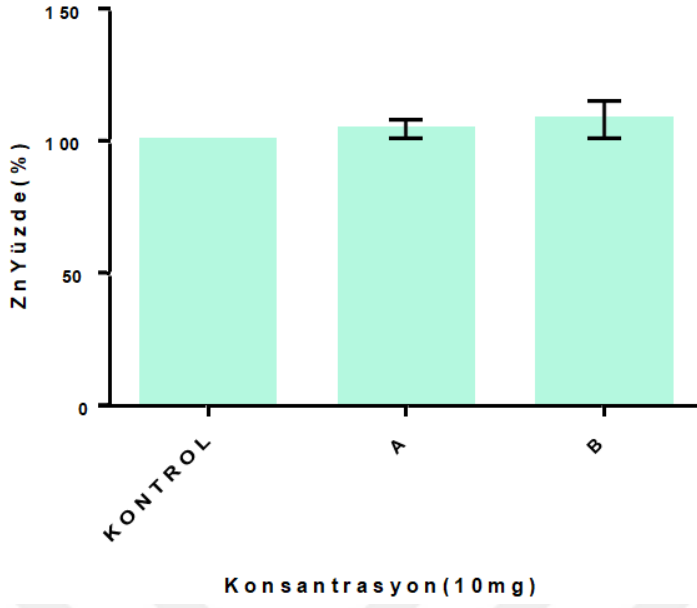
Şekil 4.8' de kontrol grubu ve amigdalin A, B uygulanan grupların kandaki bakır seviyeleri verilmiştir.

Siyanojenik glikozitlerden amigdalinin ikincil metaboliti olan hidrojen siyanürün neden olduğu olası zehirlenmenin elementel belirteçlerinden kabul edilen bakır (Cu) kandaki yüzdeleri göz önüne alındığında, ticari olarak satın alınan saflık derecesi yüksek amigdalin B ve saflaştırdığımız amigdalin A uyguladığımız gruplarda kontrol grubuna oranla seviyesi daha yüksektir.

Pirinççi vd. (1996) yaptıkları çalışmada amigdalin verilen deneklerde zehirlenme sonucu kandaki Ca, Na, K düzeylerinin arttığı Mg, Cu, seviyelerinin ise azaldığını ifade etmişlerdir [112].

Tanboğa vd. (2014) kolorektal kanserli hücrelerde kandaki Cu seviyelerinin kontrol grubuna göre hafif arttığını gözlemlemişlerdir [113]. Meme kanseri üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise kandaki Cu seviyelerinin arttığı belirlenmiştir [114].

Yapmış olduğumuz çalışmada ise hayvanlara amigdalin uygulanmasının Cu seviyelerinin artmasına neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Kandaki Çinko (Zn) yüzdesi, kanser koruma grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A ve Amigdalin B'nin miktarı(%)

Şekil 4.9' da kontrol grubu ve amigdalin A, B uygulanan grupların kandaki çinko seviyeleri verilmiştir. Kandaki Zn yüzdeleri göz önüne alındığında, ticari olarak satın alınan saflık derecesi yüksek amigdalin B ve saflaştırdığımız amigdalin A uyguladığımız guplarda kontrol grubuna oranla seviyesi hafif yüksektir.

Çinko'nun kandaki seviyeleri incelendiğinde, ticari olarak satın alınan amigdalin B uygulanan grupta çinko seviyesi biraz yüksek, laboratuvarımızda saflaştırdığımız amigdalin A uygulanan grupta ise daha az seviyede gözlenmiştir.

Tanboğa vd. (2014) kolorektal kanserli hücrelerde kandaki Zn seviyelerinin kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir [113].

Çinko eksikliği, bir kişinin kanser riskini artırabilecek DNA'daki hasar ve oksidatif değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, kanser hastalarında çinko metabolizması etkilenebilir ve dağılımında karsinogenezi destekleyebilecek değişikliklere neden olabilir. Tinoco-Veras vd. (2011) meme kanseri üzerinde yapmış oldukları çalışmada çinko seviyelerinin düşük olduğunu belirlemişlerdir [115].

Gastrointestinal sistem ve meme kanserli bir grup olgu üzerinde, yapılan çalışmalarda çinko eksikliği ile kanser arasında kuvvetli bir ilişki olduğu

saptanmıştır. Bazı yayınlar, meme kanserlerinde serum bakır artış ve çinko seviyesindeki düşüş oranlarının, prognostik ve diagnostik olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çinko seviyesi, benign hastalıklarda daha az düşüş gösterirken, malign hastalıklarda daha belirgin bir düşüş olduğu görülmüştür [113, 114].

Adeoti vd. (2015) meme kanser hücrelerinde bakır, çinko iz elementlerinin kandaki seviyelerini incelemişler ve kandaki bakır seviyelerinin artarken buna zıt olarak çinko seviyelerinin ise azaldığını gözlemlemişlerdir [116].

4.2.1.4. Kanser koruma grubu istatistiksel analiz değerleri

Koruma grubunda yapılan Kruskal-Wallis varyans analizine göre Çizelge 4.1’de, DMBA enjeksiyonu (15 mg) ile Amigdalin A (10 mg) ve Amigdalin B (10mg) uygulanan deney grupları arasında kontrole göre BRCA1 proteini için herhangi bir istatistiksel farklılık gözlenmezken, BRCA2 proteini için istatistiksel olarak kontrole göre ayrı ayrı Amigdalin A ve Amigdalin B için istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir. BRCA2 açısından Amigdalin A ve Amigdalin B arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.1 Koruma grubu deneklerin istatistiksel analizi

			Orta	En	En		Standart	
	Koruma grubu	N	Değer	düşük	yüksek	Ortalama	sapma	P
BRCA1	Amigdalin A ^a	8	0,831	0,584	0,903	0,801	0,109	0,158
	Amigdalin B ^a	5	0,845	0,659	0,894	0,811	0,107	
	Kontrol ^a	9	0,743	0,734	0,753	0,743	0,006	
BRCA2	Amigdalin A ^a	8	0,167	0,154	0,187	0,167	0,010	0,003
	Amigdalin B ^a	5	0,145	0,115	0,215	0,155	0,043	
	Kontrol ^b	9	0,129	0,126	0,132	0,129	0,002	

*farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.
N: Canlı denek sayısı

4.2.2. Kanser tedavi grubu

4.2.2.1. Kanser tedavi grubunda organların morfolojik görünümü

Kanser tedavi grubu deney hayvanlarına gavaj yolu ile 3 günde bir 50 mg amigdalin A, B ve 0.05 gr Tamoksifen uygulanması 7. hafta sonunda deneyin ikinci aşaması sonlandırılarak deney protoküle uygun olarak sakrifiye edilen amigdalin A, grubu ratlarda Şekil 4.10' da görüldüğü gibi kanserli deneklerde sağlıklı kontrol deneklere göre karın boşluğunda ödem, akciğerde kızarıklık, karaciğerde yağlanma, mide ve bağırsakta bozukluk ve belirgin olarak uterusda kistik oluşumlar, amigdalin B grubu deneklerde Şekil 4.11' de görüldüğü gibi akciğer ve diğer organlarda morfolojik olarak kızarma ve büyüme baskılaması, yoğun lezyon, mide ve bağırsaklarda ağır harabiyet ve abdominal bölgede yoğun kistik beyazımsı yapılar gözlenmiştir. 0.05 mg Tamoksifen uygulananda tedavi grubu deneklerde Şekil 4.12' de görüldüğü gibi kontrole göre abdominal bölgede yer yer ve uterusda kistik oluşumlar ve lezyon gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. Tedavi grubu ratlara gavaj yolu ile 50 mg Amigdalın A uygulaması

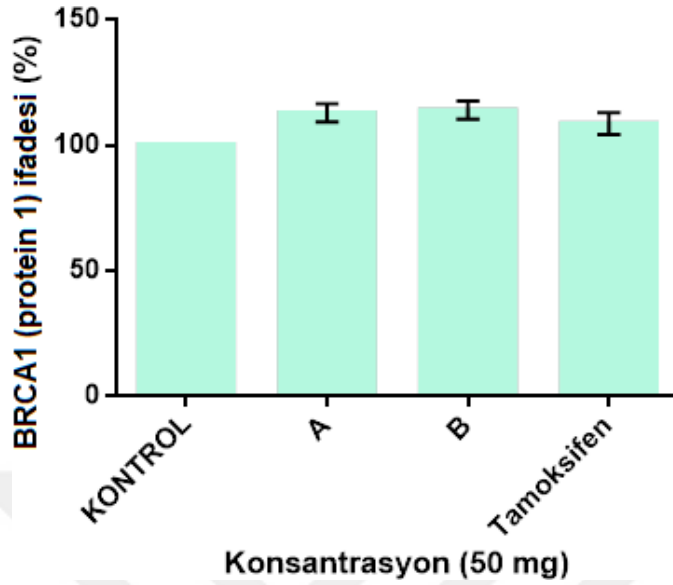


Şekil 4.11. Tedavi grubu ratlara gavaj yolu ile 50 mg Amigdalın B uygulaması



Şekil 4.12. Tedavi grubu ratlara gavaj yolu ile 0,05 mg Tamoksifen uygulaması

4.2.2.2. Kanser tedavi grubunda BRCA1 ve BRCA2 protein aktiviteleri



Şekil 4.13. BRCA 1'in kanser tedavi grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalın A, Amigdalın B ve Tamoksifen uygulamasının karşılaştırılması (%)

Şekil 4.13'de laboratuvarımızda saflaştırdığımız amigdalın A, satın alınan ticari amigdalın B, kontrol grubu ve tamoksifenin meme dokusunda tedavi grubunda BRCA1 (protein 1) ifadesi verilmektedir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında ticari amigdalın B'nin ifade artışıdaki yüzde, saflaştırdığımız amigdalın A'ya yakın yüzdede, 0.05 mg uygulanan Tamoksifen den ise daha az olduğu bulunmuştur.

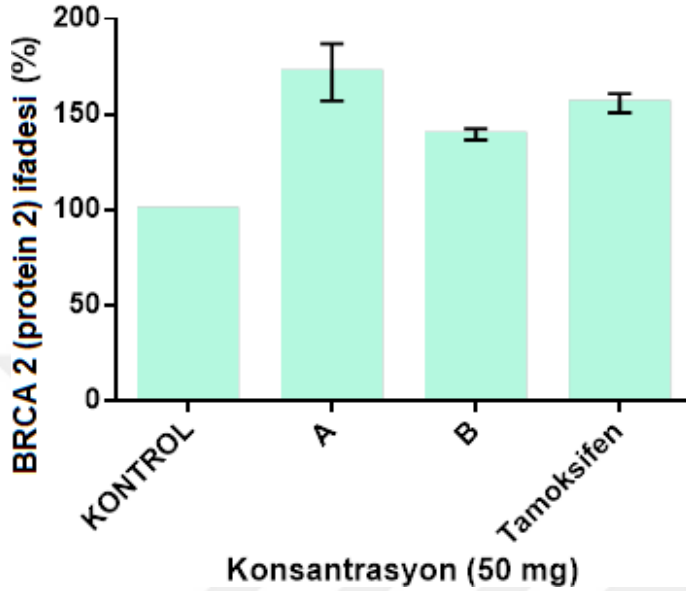
Tamoksifen, yaklaşık 40 yıldır meme kanseri teşhisi konan kadınlar için bir tedavi olarak kullanılmış ve on yıldan fazla bir süredir kemoprevans (kanseri gelişimini durduran madde) olarak onaylanmıştır. Tamoksifenin yüksek riskli kadınlarda meme kanserini önlemede faydalı olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, kullanımını yaygın olarak benimsememiştir.

Tamoksifenin meme kanseri geliştirme riski yüksek olan kadınlar için etkili bir kemopreventif ajan olduğu gösterilmiştir. Ancak, risk / fayda oranı her kadın için değerlendirilmelidir [117].

BRCA1 veya BRCA2'de mutasyonu olan kadınlar, yaşam boyu yaklaşık %80 oranında meme kanseri riskiyle karşı karşıya kalır. Gronwald vd. (2006) yapmış

oldukları çalışmada tamoksifenin koruyucu etkisinin hem BRCA1 hem de BRCA2 taşıyıcılarında benzer etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir [118].

Yapmış olduğumuz çalışmada da hem amigdalin A hemde amigdalin B'nin meme kanseri üzerinde tamoksifen gibi tedavi edici etkisi olabileceği belirlenmiştir.



Şekil 4.14. BRCA 2'nin kanser tedavi grubundaki sağlıklı kontrole göre Amigdalin A, Amigdalin B ve Tamoksifen uygulamasının karşılaştırılması (%)

Şekil 4.14.'de laboratuvarımızda saflaştırdığımız amigdalin A, satın alınan ticari amigdalin B, kontrol grubu ve tamoksifenin meme dokusunda tedavi grubunda BRCA2 ifadesi (%) verilmektedir.

Tedavi grubunda, BRCA2 düzeyinin BRCA1 düzeyine göre hem amigdalin A, B hemde tamoksifen uygulama gruplarında belirgin derecede artış gözlenmiştir.

BRCA1 düzeyi, yüzde (%) olarak baz alındığında saflaştırdığımız amigdalin'in ratların kansere direncini ticari amigdaline göre arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak tedavi amaçlı kullanılan Tamoksifenin seçilen dozuna (0.05 mg) göre daha az bir etki gösterdiği sonucu çıkmıştır. BRCA2 düzeyi ise yüzde (%) olarak ticari amigdalin'in ratların kanser direncini, saflaştırdığımız amigdaline ve Tamoksifen (0.05 mg) uygulamasına göre arttırdığı belirlenmiştir.

Ayrıca koruma ve tedavi gruplarının BRCA1 ve BRCA2 protein ifade yüzdeleri karşılaştırıldığında, tedavi gruplarında uygulanan yüksek amigdalin (50 mg) dozlarından dolayı kontrol gruplarına göre daha yüksek BRCA1 ve BRCA2 yüzdeleri gözlenmiştir.

4.2.2.3. Kanser koruma grubunda, kanda bakır ve çinko element değerleri

Tedavi grubu deneklerde, deney sonunda analiz için yeterli kan alınmadığı için bakır (Cu) ve çinko (Zn) elementleri test edilememiştir.

4.2.2.4. Kanser tedavi grubu istatistiksel analiz değerleri

Kanser tedavi grubunda yapılan Kruskal-Wallis varyans analizine göre Çizelge 4.2' de DMBA enjeksiyonu (15 mg) ile Amigdalın A (50 mg), Amigdalın B (50 mg) ve Tamoksifen (0.05 mg) uygulanan deney grupları arasında kontrole göre BRCA1 proteini için Amigdalın A ve Amigdalın B istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gösterirken, 0.05 mg Tamoksifen uygulanan deneklerin sağlıklı kontrol grubu ve Amigdalın uygulanan deneklere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı gözlenmiştir.

Kruskal-Wallis varyans analizine göre BRCA2 proteini için Amigdalın A(50 mg), Amigdalın B (50 mg) ve Tamoksifen (0.05 mg) grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir.

Çizelge 4.2 Tedavi grubu deneklerin istatistiksel analizi

	Tedavi grubu	N	Orta Değer	En düşük	En yüksek	Ortalama	Standart sapma	P
BRCA1	Amigdalın A ^a	4	0,866	0,804	0,881	0,854	0,035	0,005
	Amigdalın B ^a	5	0,866	0,811	0,905	0,866	0,035	
	Tamoksifen ^{a,b}	3	0,820	0,731	0,844	0,798	0,060	
	Kontrol ^b	8	0,686	0,618	0,836	0,701	0,066	
BRCA2	Amigdalın A ^a	4	0,166	0,159	0,182	0,168	0,010	0,001
	Amigdalın B ^b	5	0,149	0,145	0,151	0,148	0,002	
	Tamoksifen ^c	3	0,156	0,152	0,159	0,156	0,004	
	Kontrol ^d	8	0,134	0,129	0,144	0,135	0,005	

*farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır.
N: Canlı denek sayısı

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda kanser görülme sıklığı artmaktadır. Özellikle meme kanseri akciğer kanserinden sonra insidansı en yüksek olan kanser türüdür. Geniş kapsamlı tedavilere rağmen ilerlemiş malign tümörlerin mortalitesi yüksek düzeyde kalmaktadır. Hastalığın tedavi sürecinde ise bitkiler yüzyıllardır gıda ve ilaç amacıyla kullanılmaktadır. Bu geleneksel kullanımlar yıllar boyunca denenmiş, test edilmiş ve nesilden nesile aktarılmıştır. Dünya nüfusunun büyük bir kısmı, özellikle gelişmekte olan ülkelerde çeşitli hastalıklara karşı geleneksel tıbbi yöntemler kullanılmaktadır.

Bitkilerde çok yaygın olarak bulunan parazit ve otoburlara karşı savunmada kullanılan siyanojenik glikozitlerden amigdalin önemli bir kimyasal silah konumundadır. Acı kayısı çekirdeğinden elde edilen amigdalin'in pek çok kanser türlerinde anti tümör etkinliği belirlenmiştir. Günümüzde pek çok internet sitesi amigdalin satışı yapmakta ve birçok hasta insan da tedavi amacıyla amigdalin kullanmaktadır. *İn-vitro* koşullarda yapılan bazı çalışmalarda tümör gelişiminin engellenmesine dair olumlu sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen özellikle hastalığı ilerlemiş kişilerde amigdalin'in meme kanserinde tümör gelişimini önlediğine dair belirgin veriler bulunmamaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada deney sürecini iki aşamada planladı. İlk aşama laboratuvar koşullarında acı kayısı çekirdeğinden amigdalin eldildi daha sonra elde etdilen amigdalin'in FTIR metotla kalitatif analiz yapılarak ve SEM elektron mikroskobunda görüntülenerek varlığı tespit edildi. Daha önce eşdeğer çalışmalarda rapor edildiği gibi su ile yapılan saflaştırma çalışmalarında düşük amigdalin miktarı ve buna karşın yüksek bitkisel polifenol miktarı olduğu yaptığımız analizler ile teyit edildi. İnternette hap formunda satın alınan amigdalin ve CRM olarak kullanılan Sigma-Aldrich marka Amigdalin kıyaslaması yapıldı, standarda göre %20-30 civarında saflaştırma gerçekleştiği gözlemlendi.

Çalışmamızın ikinci kısmında ise deney hayvanları koruma ve tedavi olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu gruplar aynı zamanda kendi aralarında dozaja bağlı farklı gruplara ayrıldı. Sağlıklı kontrol dışında tüm deneklere DMBA (7,12 dimethylbenz[a]anthracene), dişi sıçanlara 5 mg DMBA'da %25 etanol içeren susam

yağında 0.5ml taze hazırlandıktan sonra, birer hafta ara ile intraperitoneal olarak 3 kez enjekte edildi. Bu çalışma aşamasında üç günde bir, oluşturulan koruma grubu dışı ratlara bizim saflaştırdığımız Amigdalın A ve piyasadan satın alınan Amigdalın B gruplarına kendi grubuna ait amigdalınler izotonik su içerisinde kanser kontrol grubu hariç 10 mg gavaj yoluyla verildi. 3. haftanın sonunda amigdalın verilmeyen DMBA enjeksiyonu alan kanser kontrol grubundaki hayvanların vücudunda gözle fark edilebilir emboli ve hareket yavaşlaması tespit edildi. Bu aşamadan sonra deneyin diğer aşaması olan tedavi grupları çalışmasında başlatıldı.

Koruma gruplarında hem BRCA1, BRCA2 protein ifadeleri hemde kandaki bakır ve çinko seviyeleri analiz edilmiştir. Bilindiği üzere yapılan çalışmalarda düşük kanserli hücrelerde BRCA seviyeleri düşük gözlenirken, yüksek kanserli hücrelerde ise BRCA seviyeleri ya çok düşük seviyelerde ya da hiç gözlenmemektedir. Amigdalın uygulamasıyla BRCA proteinleri aktivitesini korumuş olup kontrole görede hafif artış olduğu analiz edilmiştir. Ayrıca koruma grubunda kontrole göre kandaki bakır seviyelerine bakıldığında artış gözlenirken, çinko seviyelerinde ise kanserli hücrelerde beklenen belirgin bir düşüş gözlenmemiştir.

Tedavi grubu ise kendi içinde sağlıklı kontrol hariç üç gruptan oluşturulmuştur, iki grubun birine 50 mg amigdalın B ve diğerine 50 mg amigdalın A ve meme kanserinde bir hormon tedavisi olarak kullanılan Tamoksifen ilacı 0.05mg 3 günde bir gavaj yoluyla denek gruplarına ayrı ayrı verildi. Tüm bu süreç boyunca deneklerin ağırlıkları tartıldı fakat deneklerde oluşan emboli nedeniyle elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak bir anlam ifade etmedi çünkü emboli miktarı azalış artış periyodu izledi. Bu süreçde 50 mg amigdalın A alan deneklerin bazılarının gözlerinde kanamalar tespit edildi. 4. haftada koruma grubu 10 mg amigdalın B verilen deneklerde ölümler baş gösterdi. Bunun üzerine canlı kalan tüm amigdalın A(n=8) ve B(n=5) grupları deney protokolüne bağlı kalarak sakrifiye edildi. 5. hafta tedavi grubundaki tamoksifen alt grubu ölmeye başlayınca sakrifiye edildi. 6. Haftada 50 mg'lık bizim saflaştırdığımız amigdalın A grubunda ölümler başladı 7. Hafta bitiminde kanserli kontrol deneklerinin tamamı öldü ve tedavi grubunda sağ kalan amigdalın A(n=4) denekleri, ticari amigdalın B(n=5) grubu denekler ve 0,05 mg Tamoksifen(n=3) denekler protokele uygun sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı.

Deney sonlanma aşamasında kanserli kontrol deneklerinin tamamının ölmesine rağmen 50 mg amigdalin uygulanan gruplarının diğer gruplara göre sağ kalım sayısı daha yüksekti. Buda bu konudaki geçmiş araştırmaları doğrular niteliktedir. Amigdalin'in hastalığı iyileştirmemesine rağmen yaşam süresini uzattığı sonucu tarafımızdan teyit edilmiştir. Deney süresince DMBA enjeksiyonu yapılan ratlar arasında kanser kontrol ve 0.05 mg uygulanan Tamoksifen grubuna kıyasla 50 mg gavajla amigdalin verilen deneklerin özellikle ticari amigdalin B grubunda deneklerin yaşam faaliyet aktiviteleri, görünüşleri hasta kontrol grubuna göre hastalık belirtisi daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu da amigdalinin ikincil metaboliti HCN yanında açığa çıkan benzaldehit'in etkisini göstermektedir. Daha önce belirtildiği gibi benzaldehit semianestezik özelliğe sahiptir.

Tedavi gruplarında kontrol gruplarına göre BRCA1 ve BRCA2 protein ifadelerinin meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifendeğerlerinde olduğu gibi yükselme göstermiştir. Hem amigdalin A, B hemde tamoksifen uygulanan gruplarda BRCA2 ifadeleri BRCA1'e göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışma sonucu ve ilgili literatürler ışığında amigdalin'in meme kanseri üzerine makro etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bununla beraber sakrifiye edilen hayvanlarda organ dejenerasyonu açısından yüksek dozlu tedaviye tabi tutulan deneklerde görünüm ve büyüklük açısından kanserli kontrole göre bariz farklar olduğu gözlemlenmiştir.

Gerek organlardaki morfolojik gerçekler ve gerekse bu konuda yapılan güncel in vitro çalışmalar ışığında yüksek yapılı canlılarda kendi detoksifikasyon sistemi olan amigdalinin hedef organ bazlı nano-akıllı ilaç çalışmalarında kanserli hücrenin mitokondrisini kitleme yeteneğiyle iyi bir silah olacağı öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] J. Makarevic, J. Rutz, E. Juengel, S. Kaulfuss, I. Tsauro, K. Nelson, J. Pfitzenmaier, A. Haferkamp, R. A. Blaheta, *Amygdalin influences bladder cancer cell adhesion and invasion in vitro*, **Plos One**, 9:10 (2014) 1-11.
- [2] S. Gottschling, S. Meyer, A. Langler, G. Scharifi, F. Ebinger, B. Gronwald, *Differences in use of complementary and alternative medicine between children and adolescents with cancer in Germany: A Population Based Survey*, **Pediatr Blood Cancer**, 61 (2014) 488-492.
- [3] C. C. Xue, L. Zhang, V. Lin, F. David, *The use of complementary and alternative medicine in Australia*, **Health Issues**, 88 (2006) 12-16.
- [4] A. Özdemir, Y. A. Aba, *Cancer and Cam (Complementary and Alternative Medicine) Paradox*, **International Journal of Health Science Research and Policy**, 1:2 (2016) 28-35.
- [5] [\(https://cam.cancer.gov/cam_at_nci/annual_report.htm#fy10\)](https://cam.cancer.gov/cam_at_nci/annual_report.htm#fy10) (23/11/2019)
- [6] R. Parikh, N. Jeganathan, *A short review: Complementary and alternative medicine in lung cancer*, **J. Anc. Dis. Prev. Rem.**, 2:2 (2014) 1-3.
- [7] J. Makarevic, J. Rutz, E. Juengel, S. Kaulfuss, M. Reiter, I. Tsauro, G. Bartsch, A. Haferkamp, R. A. Blaheta, *Amygdalin blocks bladder cancer cell growth in vitro by diminishing cyclin A and cdk2*, **Plos One**, 9:8 (2014) 1-9.
- [8] G. G. Dogu, A. Kargı, O. Tanrıverdi, A. Yaren, G. Demiray, B. Y. Taskoylu, A. Ergin, *Complementary/alternative medicine experience in cancer patients: A Questionnaire-Based Survey*, **International Journal of Hematology and Oncology**, 1:24 (2014) 45-53.
- [9] J. Hübner, B. Senf, K. Münstedt, R. Mücke, O. Micke, *Wenn Tumor patienten über 'Andere Methoden' chatten*, **Onkologe**, 20 (2014) 364-370.
- [10] S. I. Baskin, T. G. Brewer, *Cyanide Poisoning*, *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, Chapter 10, 1997 271-286.
- [11] D. A. Jose, M. Elstner, A. Schiller, *Allosteric indicator displacement enzyme assay for a cyanogenic glycoside*, **Chem. Eur. J.**, 19 (2013) 14451-14457.
- [12] S. Kapoor, *Safety of studies analysing clinical benefit of amygdalin*, **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 36:1 (2014) 87.
- [13] R. T. Dorr, J. Paxinos, *The current status of laetrile*, **Annals of Internal Medicine**, 89 (1978) 389-397.
- [14] Z. Song, X. Xu, *Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin*, **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, 10:5 (2014) 3-7.

- [15] S. Milazzo, S. Lejeune, E. Ernst, *Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence*, **Support Care Cancer**, 15 (2007) 583-595.
- [16] B. M. Asma, A. Mısırlı, N. A. Bilgin, M. Yanar, 2016. *Apricot Culture and Breeding Studies in Turkey*, **Chronica Hort.**, 56:3 (2016) 15-21.
- [17] J. Taylor, N. Roney, C. Harper, M. E. Fransen, S. Swarts, *Toxicological profile for cyanide*, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2006.
- [18] T. Renklidağ, A. Gökmen Karaman, *Siyaniür zehirlenmesi*, **Sted**, 12:9 (2003) 350-353.
- [19] J. D. Pritchard, *Hydrogen cyanide, Toxicological overview*, **HPA**, 2 (2007) 2-11.
- [20] RTI International, *Cyanide: Understanding the risk, enhancing preparedness*, **Clinical Toxicology**, 44 (2006) 47-63.
- [21] E. Jaszczak, Ż. Polkowska, S. Narkowicz, J. Namieśnik, *Cyanides in the environment- analysis-problems and challenges*, **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 24 (2017) 15929-15948.
- [22] *Toxicological review of hydrogen cyanide and cyanide salts*, EPA, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC, 2010.
- [23] K. Koyama, A. Yoshida, A. Takeda, K. Morozumi, T. Fujinami, N. Tanaka, *Abnormal cyanide metabolism in uraemic patients*, **Nephrol Dial Transplant**, 12 (1997) 1622-1628.
- [24] A. Çabuk, N. Kolankaya, *Toxicity and biological treatment of cyanide*, **Journal of Engineering and Natural Sciences**, Sigma 30 (2012) 20-38.
- [25] J. Hamel, *A review of acute cyanide poisoning with a treatment update*, **Critical Care Nurse**, 31:1 (2011) 72-81.
- [26] C. A. Johnson, *The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective*, **Applied Geochemistry**, 57 (2015) 194-205.
- [27] D. B. Donato, O. Nichols, H. Possingham, M. Moore, P. F. Ricci, B. N. Noller, *A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife*, **Environ. Int.**, 33:7 (2007) 974-984.
- [28] P. Sun, J. L. Borowitz, A. G. Kanthasamy, M. D. Kane, P. G. Gunasekar, G. E. Isom, *Antagonism of cyanide toxicity by isosorbide dinitrate: possible role of nitric oxide*, **Toxicology**, 104 (1995) 105-111.
- [29] O. S. A. Oluwole, A. O. Onabolu, I. A. Cotgreave, H. Rosling, A. Persson, H. Link, *Incidence of endemic ataxic polyneuropathy and its relation to*

- exposure to cyanide in a Nigerian community*, **J. Neurol Neurosurg Psychiatry**, 74 (2003) 1417-1422.
- [30] J. Vetter, *Plant Cyanogenic Glycosides*, **Toxicon**, 38:1 (2000) 11-36.
- [31] M. Zagrobelny, S. BAK, A. N. Rasmussen, B. Jorgensen, C. M. Naumann, B. Lindberg Moller, *Cyanogenic Glycosides and Plant-Insect Interactions*, **Phytochemistry**, 65:3 (2004) 293-306.
- [32] L. Brimer, A. R. Cicalini, F. Federici, M. Petruccioli, *Amygdalin Degradation by *Mucor Circinelloides* and *Penicillium Aurantiogriseum*: Mechanisms of Hydrolysis*, **Arch. Microbiol.**, 169:2 (1998) 106-112.
- [33] M. R. Haque, J. H. Bradbury, *Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods*, **Food Chemistry**, 77 (2002) 107-114.
- [34] <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je18.htm> (26/11/2019)
- [35] D. Ganjewala, S. Kumar, D. S. Asha, K. Ambika, *Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review*, **Acta Biologica Szegediensis**, 54:1 (2010) 1-14.
- [36] D. G. Barceloux, *Cyanogenic Foods (Cassava, Fruit Kernels and Cycad Seeds)*, *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*, Wiley, 55 (2009) 336-352.
- [37] C. Gruhnert, B. Biehl, D. Selmar, *Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes*, **Planta**, 195:1 (1994) 36-42.
- [38] İ. Pirinççi, S. Tanyıldızı, S. Özaydın, H. Kara, A. Ateşşahin, *Koyunlarda Siyanojenik Glikozitlerle Zehirlenmeler Üzerine Deneysel Çalışmalar*, **Vet. Bil. Derg.**, 13:1 (1997) 85-95.
- [39] M. Özcan, F. B. Tokatlıoğlu Özcan, Y. Yaşartekin, H. Yavuz, S. Ü. Sarıcı, *Kayıtsız çekirdeğine bağlı akut siyaniür zehirlenmesi*, **Cukurova Med. J.**, 42:3 (2017) 600-601.
- [40] *Cyanogenic Glycosides—information sheet*. Wellington, New Zealand, New Zealand Food Safety Authority NZFSA 2008.
- [41] I. F. Bolarinwa, M. O. Oke, S. A. Olaniyan, A. S. Ajala, *A Review of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants*, Chapter 8 in *Toxicology-New Aspects to This Scientific Conundrum*, 2016, 179-191.
- [42] https://s10.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/e01/geschichte.htm (25/11/2019)

- [43] T. Dang, C. Nguyen, P. N. Tran, *Physician beware: Severe cyanide toxicity from amygdalin tablets ingestion*, **Hindawi Case Reports in Emergency Medicine**, (2017).
- [44] H. Sauer, C. Wollny, I. Oster, E. Tutdibi, L. Gortner, S. Gottschling, S. Meyer, *Severe cyanide poisoning from an alternative medicine treatment with amygdalin and apricot kernels in a 4-year-old child*, **Wien Med Wochenschr**, 165:9-10 (2015) 185-188.
- [45] M. H. Tanrıverdi, C. Uysal, P. G. Erten Bucaktepe, E. Arıca, V. Şen, *Kayıt Çekirdeğine Bağlı Siyanid Zehirlenmesi: Bir Olgu Sunumu*, **Euras J. Fam. Med.**, 3:2 (2014) 119-122.
- [46] B. O'Brien, C. Quigg, T. Leong, *Severe cyanide toxicity from 'vitamin supplements'*, **European Journal of Emergency Medicine**, 12:5 (2005) 257-258.
- [47] M. F. Wahab, Z. S. Breitbach, D. W. Armstrong, R. Strattan, A. Berthod, *Problems and pitfalls in the analysis of amygdalin and its epimer*, **J. Agric. Food Chem.**, 63 (2015) 8966–8973.
- [48] M. Çelik, M. Yıldırım, *Amigdalın ve özellikleri*, **Omer Halisdemir University Journal of Engineering Sciences**, 6:1 (2017) 28-37.
- [49] H. J. Kwon, J. H. Lee, S. P. Hong, *Improvement of the Extraction Efficiency of D-Amygdalin from Armeniacae Semen Powder through Inactivating Emulsin and Suppressing the Epimerization of D-Amygdalin*, **Arch. Pharm. Res.**, 33:1 (2010) 81-86.
- [50] S. Milazzo, M. Horneber, E. Ernst, *Laetrile treatment for cancer*, **Cochrane Database Syst. Rev.**, 28:4 (2015) 1-15.
- [51] R. W. Moss, *Patient perspectives: Tijuana cancer clinics in the post-NAFTA era*, **Integr. Cancer Ther.**, 4:1 (2005) 65-86.
- [52] H. E. Sigerist, *The historical development of the pathology and therapy of cancer*, **The Bulletin of the New York Academy of Medicine**, 8 (1932) 642-653.
- [53] https://www.learner.org/courses/biology/support/8_cancer.pdf (20/11/2019)
- [54] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- [55] C. B. Blackadar, *Historical review of the causes of cancer*, **World J. Clin. Oncol.**, 7:1 (2016) 54-86.
- [56] R. B. Dickson, M.E. Lipman, *Oncogenes and Suppressor Genes In: Disease of the Breast Ed. Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S.*, **Lippincott-Raven Publishers**, Philadelphia-New York (1996) 221-235.

- [57] E. P. Gelmann, *Oncogenes in human breast Cancer*. In: *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases*, Vol I. Ed: Bland KI, Copeland EM. WB Saunders Company, USA, 1998, 499-517.
- [58] R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*, **CA Cancer J. Clin.**, 65:1 (2015) 5-29.
- [59] O. Baykara, *Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment*, **Horizons in Cancer Research**, 57 (2015) 105-156.
- [60] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*, **Cell**, 100:1 (2000) 57-70.
- [61] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. **CA: Cancer J. Clin.**, 68 (2018) 394-424.
- [62] Türkiye Kanser İstatistikleri 2015.
- [63] K. Polyak, *Breast cancer gene discovery*, **Expert Rev. Mol. Med.**, 4:18 (2002) 1-18.
- [64] J. A. Peters, W. S. Rubinstein, *Genetics and The Multidisciplinary Breast Center*, **Surgical Oncology Clinics of North America**, 9:2 (2000) 367-396.
- [65] <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-ovarian-genetics-pdq> (24/11/2019)
- [66] E. P. Diamandis, *Cancer Biomarkers: Can We Turn Recent Failures into Success?* **Journal of the National Cancer Institute**, 102:19 (2010) 1462-1467.
- [67] U. Manne, R. G. Srivastava, S. Srivastava, *Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment*, **Drug Discovery Today**, 10:14 (2005) 965-976.
- [68] M. C. King, J.H. Marks, J. B. Mandell, *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*, **Science**, 302 (2003) 643-646.
- [69] <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-fact-sheet> (26/11/2019)
- [70] K. Somasundaram, *BRCA1 and BRCA1 Genes and Inherited Breast and/or Ovarian Cancer: Benefits of Genetic Testing*, **Indian J. Surg Oncol.**, 1:3 (2010) 245-249.
- [71] F. Karami and P. Mehdipour, *A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer*, **BioMed Research International**, (2013).

- [72] C. C. Chen, W. Feng, P. X. Lim, E. M. Kass, M. Jasin, *Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer*, **Annu. Rev. Cancer Biol.**, 2 (2018) 313-336.
- [73] A. Antoniou, P. D. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, et al. *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*, **Am. J. Hum. Genet.**, 72 (2003) 1117-1130.
- [74] B. B. Roa, A. A. Boyd, K. Volcik, C. S. Richard, *Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in BRCA1 and BRCA2*, **Nat. Genet.**, 14 (1996) 185-187.
- [75] E. Manguoğlu, S. Güran, D. Yamaç, T. Colak, M. Simşek, M. Baykara, M. Akaydın, G. Lüleci. *Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast, ovarian, and prostate cancer patients*, **Cancer Genet. Cytogenet.**, 203:2 (2010) 230-237.
- [76] D. G. Evans, J. Barwell, D. M. Eccles, A. Collins, L. Izatt, C. Jacobs, A. Donaldson, A. F. Brady, A. Cuthbert, R. Harrison, S. Thomas, A. Howell, FH02 Study Group; RGC teams, Z. Miedzybrodzka, A. Murray, *The Angelina Jolie effect: how high celebrity profile can have a major impact on provision of cancer related services*. **Breast Cancer Res.**, 16:5 (2014) 442.
- [77] K. N. Syrigos, G. Rowlinson-Busza, A. A. Epenetos, *In vitro cytotoxicity following specific activation of amygdalin by beta-glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody*, **Int. J. Cancer**, 78:6 (1998) 712-719.
- [78] H. Y. Kwon, S. P. Hong, D. H. Hahn, J. H. Kim, *Apoptosis induction of Persicae Semen extract in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells*, **Arch. Pharm. Res.**, 26:2 (2003) 157-161.
- [79] H. J. Park, S. H. Yoon, L. S. Han, L. T. Zheng, K. H. Jung, Y. K. Uhm, J. H. Lee, J. S. Jeong, W. S. Joo, S. V. Yim, J. H. Chung, S. P. Hong, *Amygdalin Inhibits Genes Related to Cell Cycle in SNU-C4 Human Colon Cancer Cells*, **World J. Gastroenterol**, 11:33 (2005) 5156-5161.
- [80] H. K. Chang, M. S. Shin, H. Y. Yang, J. W. Lee, Y. S. Kim, M. H. Lee, J. Kim, K. H. Kim, C. J. Kim, *Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells*, **Biol. Pharm. Bull.**, 29:8 (2006) 1597-1602.
- [81] H. J. Hwang, P. Kim, C. J. Kim, H. J. Lee, I Shim, C. S. Yin, Y. Yang, D. H. Hahm, *Antinociceptive effect of amygdalin isolated from Prunus armeniaca on formalin-induced pain in rats*, **Biol. Pharm. Bull.**, 31:8 (2008) 1559-1564.
- [82] H. Mirmiranpour, S. Khaghani, A. Zandieh, O. O. Khalilzadeh, S. Gerayesh-Nejad, A. Morteza, A. Esteghamati, *Amygdalin inhibits angiogenesis in the*

cultured endothelial cells of diabetic rats. Indian J. Pathol. Microbiol., 55:2 (2012) 211-214.

- [83] Y. Chen, J. Ma, F. Wang, J. Hu, A. Cui, C. Wei, Q. Yang, F. Li, *Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells*, **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 35:1 (2013) 43-51.
- [84] J. Y. Moon, S. W. Kim, G. M. Yun, H. S. Lee, Y. D. Kim, G. J. Jeong, I. Ullah, G. J. Rho, B. G. Jeon, *Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines*, **Animal Cells and Systems**, 19:5 (2015) 295-304.
- [85] L. Qian, B. Xie, Y. Wang, J. Quian, *Amygdalin-mediated inhibition of non-small cell lung cancer cell invasion in vitro*. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, 8:5 (2015) 5363-5370.
- [86] E. Juengel, A. Thomas, J. Rutz, J. Makarevic, I. Tsauro, K. Nelson, A. Haferkamp, R. A. Blaheta, *Amygdalin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells in vitro*, **Int. J. Mol. Med.**, 37:2 (2016) 526-532.
- [87] H. M. Lee, A. Moon, *Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells*. **Biomol. Ther. (Seoul)**, 24:1 (2016) 62-66.
- [88] J. Makarevic, I. Tsauro, E. Juengel, H. Borgmann, K. Nelson, C. Thomas, G. Bartsch, A. Haferkamp, R. A. Blaheta, *Amygdalin Delays Cell Cycle Progression and Blocks Growth of Prostate Cancer Cells in vitro*, **Life sciences**, 147 (2016) 137-142.
- [89] E. Juengel, M. Afschar, J. Makarević, J. Rutz, I. Tsauro, J. Mani, K. Nelson, A. Haferkamp, R. A. Blaheta, *Amygdalin blocks the in vitro adhesion and invasion of renal cell carcinoma cells by an integrin-dependent mechanism*, **Int. J. Mol. Med.**, 37:3 (2016) 843-850.
- [90] A. Zhang, W. Pan, J. Lv, H. Wu, *Protective Effect of Amygdalin on LPS-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NF- κ B and NLRP3 Signaling Pathways*, **Inflammation**, 40:3 (2017) 745-751.
- [91] E. Kolesar, E. Tvrda, M. Halenar, M. Schneidgenova, L. Chrastinova, L. Ondruska, R. Jurcik, A. Kovacik, E. Kovacikova, P. Massanyi, A. Kolesarova, *Assessment of rabbit spermatozoa characteristics after amygdalin and apricot seeds exposure in vivo*, **Toxicol Rep.**, 5 (2018) 679-686.
- [92] A. hamoody jumaa, W. Sajid Hashim Al Uboody, A. mhdy hady, *Esomeprazole and Amygdalin combination cytotoxic effect on human cervical cancer cell line (Hela cancer cell line)*, **J. Pharm. Sci. and Res.**, 10:9 (2018) 2236-2241.

- [93] X. Zhang, J. Hu, Y. Zhuo, L. Cui, C. Li, N. Cui, S. Zhang, *Amygdalin improves microcirculatory disturbance and attenuates pancreatic fibrosis by regulating the expression of endothelin-1 and calcitonin gene-related peptide in rats*, **J. Chin. Med. Assoc.**, 81:5 (2018) 437-443.
- [94] D. Sireesha, B. S. Reddy, B. A. Reginald, M. Samatha, F. Kamal, *Effect of amygdalin on oral cancer cell line: An in vitro study*, **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, 23:1 (2019) 104-107.
- [95] M. M. Abboud, W. Al-Awaida, H. H. Alkhateeb, A. N. Abu-Ayyad, *Antitumor Action of Amygdalin on Human Breast Cancer Cells by Selective Sensitization to Oxidative Stress*, **Nutrition and Cancer**, 71:3 (2019) 483-490.
- [96] F. Tang, K. Fan, K. Wang, C. Bian, *Amygdalin attenuates acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide by regulating the NLRP3, NF-kappaB and Nrf2/NQO1 signalling pathways*, **Biomed Pharmacother.**, 111 (2019) 527-536.
- [97] J. Mani, J. Neuschäfer, C. Resch, J. Rutz, S. Maxeiner, F. Roos, F.K. Chun, E. Juengel, R. A. Blaheta, *Amygdalin Modulates Prostate Cancer Cell Adhesion and Migration In Vitro*, **Nutrition and Cancer**, 12 (2019) 1-10.
- [98] B. Moradipoodeh, M. Jamalan, M. Zeinali, M. Fereidoonnehad, G. Mohammadzadeh, *In vitro and in silico anticancer activity of amygdalin on the SK-BR-3 human breast cancer cell line*, **Mol. Biol. Rep.**, 46:6 (2019) 6361-6370.
- [99] A. Arshi, S. M. Hosseini, F. S. K. Hosseini, Z. Y. Amiri, F. S. Hosseini, M. Sheikholia Lavasani, H. Kerdarian, M. S. Dehkordi, *The anti-cancer effect of amygdalin on human cancer cell lines*. **Mol. Biol. Rep.**, 46:2 (2019) 2059-2066.
- [100] V. Kovacova, A. Sarocka, R. Omelka, M. Bauerova, B. Grosskopf, G. Formicki, A. Kolesarova, M. Martiniakova, *Subacute exposure to amygdalin influences compact bone remodeling of rabbits*, **J. Physiol. Pharmacol.** 70:4 (2019) 1-8.
- [101] Z. Wang, K. Fang, G. Wang, X. Guan, Z. Pang, Y. Guo, Y. Yuan, N. Ran, Y. Liu, F. Wang, *Protective effect of amygdalin on epithelial-mesenchymal transformation in experimental chronic obstructive pulmonary disease mice.*, **Phytother Res.**, 33:3 (2019) 808-817.
- [102] E. Kovacikova, A. Kovacik, M. Halenar, K. Tokarova, L. Chrastinova, L. Ondruska, R. Jurcik, E. Kolesar, J. Valuch, A. Kolesarova, *Potential toxicity of cyanogenic glycoside amygdalin and bitter apricot seed in rabbits-Health status evaluation*, **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)**, 103:2 (2019) 695-703.

- [103] I. F. Bolarinwa, C. Orfila, M. R. Morgan, *Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK*, **Food Chem.**, 152 (2014) 133-139.
- [104] J. Yan, S. Tong, J. Li, J. Lou, *Preparative isolation and purification of amygdalin from *Prunus armeniaca* L. with high recovery by high-speed countercurrent chromatography*, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 29:6 (2006) 1271-1279.
- [105] T. Wang, S. Lu, Q. Xia, Z. Fang, S. Johnson, *Separation and purification of amygdalin from thinned bayberry kernels by macroporous adsorption resins*, **Journal of Chromatography B**, 975 (2015) 52-58.
- [106] S. S. Muhammad, S. M. Abbas, Z. A-A Khammas, *Extraction and determination of amygdaline in Iraqi plant seeds using the combined simple extraction procedure and high-performance liquid chromatography*, **Baghdad Science Journal**, 10:2 (2013) 350-361.
- [107] W. Cassiem, M. Kock, *The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro*, **[BMC Complement Altern. Med.](#)**, 19:1 (2019) 32.
- [108] J. Shi, Q. Chen, M. Xu, Q. Xia, T. Zheng, J. Teng, M. Li, L. Fan, *Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: A review*, **Cancer Medicine**, (2019) 1-8.
- [109] F. A. Yıldırım, M. A. Askın, *Variability of Amygdalin Content in Seeds of Sweet and Bitter Apricot Cultivars in Turkey*, **African Journal of Biotechnology**, 9 :39 (2010) 6522-6524.
- [110] X. Sun, Y. Gong, M. S. Rao, S. Badve, *Loss of BRCA1 expression in sporadic male breast carcinoma*, **Breast Cancer Res. Treat**, 71:1 (2002) 1-7.
- [111] Ö. Çandır, N. Karahan, M. Bülbül, F. Kılınç, Ş. Başpınar, *Ispartada meme kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 ekspresyonu*, **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.**, 12:2 (2005) 50-54.
- [112] İ. Pirinçci, S. Tanyıldızı, S. Özaydın, H. Kara, A. Ateşşahin, İ. Karahan, *Deneyisel olarak amigdalin ile zehirlenen koyunlarda serum kalsiyum, sodyum, potasyum, magnezyum ve bakır düzeylerinin belirlenmesi*, **Vet. Bil. Derg.**, 12:1 (1996) 35-41.
- [113] B. Tanboğa, M. A. Akkuş, *Kolorektal kanserlerde serum bakır, çinko ve seruloplazmin oranlarının prognostik değerleri*, **Konuralp Tıp Dergisi**, 6:1 (2014) 32-35.
- [114] K. Sharma, L. Piccinini, D. K. Mittal, R. C. Kesarwani, V. P. Kamboj, Chovvdhery. *Diagnostic and prognostic significance of serum and tissue*

trace elements in breast malignancy, **Indian J. Med. Sci.**, 48:10 (1994) 227-32.

- [115] C. M. Tinoco-Veras, M. S. Bezerra Sousa, B. Borges da Silva, S. M. Franciscato Cozzolino, L. Viana Pires, J. A. Coelho Pimentel, N. do Nascimento-Nogueira, D. do Nascimento-Marreiro, *Analysis of plasma and erythrocyte zinc levels in premenopausal women with breast cancer*, **Nutr Hosp.**, 26:2 (2011) 293-297.
- [116] M. L. Adeoti, A. S. Oguntola, E. O. Akanni, O. S. Agodirin, G. M. Oyeyemi, *Trace elements; copper, zinc and selenium, in breast cancer afflicted female patients in LAUTECH Osogbo, Nigeria*, **Indian Journal of Cancer**, 52:1 (2015) 106-109.
- [117] S. A. Nazarali, S. A. Narod, *Tamoxifen for women at high risk of breast cancer*, **Breast Cancer (Dove Med Press)**, 6 (2014) 29-36.
- [118] J. Gronwald, N. Tung, W. D. Foulkes, K. Offit, R. Gershoni, M. Daly, C. Kim-Sing, H. Olsson, P. Ainsworth, A. Eisen, H. Saal, E. Friedman, O. Olopade, M. Osborne, J. Weitzel, H. Lynch, P. Ghadirian, J. Lubinski, P. Sun, S. A. Narod; Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group, *Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update*, **Int. J. Cancer.**, 118:9 (2006) 2281-2284.



ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : Ufuk Günay DOĞAN
DOĞUM YERİ / TARİHİ : HEKİMHAN/04.09.1974
ADRES : İnönü Üniversitesi Merkezi
Araştırma Laboratuvarı PAL Müdürlüğü
E-POSTA : ufuk.dogan@inonu.edu.tr

EĞİTİM:

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE(*)	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
1994-1998	Lisans	İnönü Üniversitesi	Eğitim Fakültesi
1999-2002	Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi	Biyoloji Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD.

TEZ KONULARI:

Y.Lisans Tez : Bazı Tekstil Boyalarının Anfibi İribaşlarına Toksik Etkileri Üzerine Bir Araştırma

AKADEMİK ve MESLEKİ DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	UNVAN	ÜNİVERSİTE	BÖLÜM
2005-2011	Uzman	İnönü Üniversitesi	Merkezi Araştırma Lab.
2012-2014	Teknik Yönetici	İnönü Üniversitesi	Petrol Araştırma Lab.
2014-	Öğretim Grv.	İnönü Üniversitesi	Petrol Araştırma Lab.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1- Karaer A., Tanrıkut E., Gönüllü Urhan R., Doğan U.G., "The role of the blood metal concentrations in the etiology of unexplained infertility", 10 th Biennial Conference of Alpha, Scientist in Reproductive Medicine, ANTALYA, TÜRKİYE, 9-11 Mayıs 2014, vol.28, no.1, pp.s14-s15

2- Doğan U.G., "TOXICITY BIOASSAY OF ASTRAZON DYES USING AMPHIBIAN TADPOLE", EUROTOX 2001, Toxicology Letters , İSTANBUL, TÜRKİYE, 13-16 Eylül 2001, vol.123, no.1, pp.110-110

KURS ve ETKİNLİKLER:

- 1.XXI. Ulusal Biyoloji Kongresi. 1-7 Eylül 2002, Malatya
- 2.XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Aydın
- 3.Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Bahar Toplantısı, 18-19 Mayıs 2007,Malatya
- 4.TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar-Standardı Eğitimi, TÜRKAK, 26-27 Mayıs 2007,Malatya
- 5.VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, Malatya
- 6.Genel Su Mikrobiyolojisinde Membran Filtrasyon Yöntemi Uygulaması Eğitimi, 07-08 Şubat 2008,Ankara
7. Deney Hayvanlarını Kullanım Sertifikası 27 Nisan-4 Mayıs 2009, Malatya
8. ICP-OES Eğitim Sertifikası, 16 Ağustos 2012,Malatya
- 9.MultiEA 3100 UVFD Eğitim Sertifikası, 23 Mart 2012,Malatya
- 10.Metod Validasyonu Eğitimi, 12-14 Kasım 2012, TÜBİTAK UME Gebze Yerleşkesi
- 11.Kimyasal Ölçümlerde Belirsizlik Hesaplanması Eğitimi, 15-16 Kasım 2012,TÜBİTAK UME Gebze Yerleşkesi
- 12.ISO 17025 Laboratuar Akreditasyonu Temel Eğitimi, 22-23 Haziran 2013, Malatya
- 13.FT-IR Eğitim Sertifikası, 24.06.2013, Malatya
- 14.İş Sağlığı ve Güvenliği I (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
- 15.Ölçüm Belirsizliği ve Ölçüm İzlenebilirliği (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
- 16.Ölçüm Belirsizliği ve Petrol Ürünleri Sınıflandırma (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PALMalatya
- 17.Laboratuar Kimyasal Maddelerin Sağlığa Etkileri (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
- 18.Risk Analizi (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
19. Petrol Rafinasyonu ve Petrol Ürünleri (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
- 20.Laboratuar Kimyasal Maddelerin Sağlığa Etkileri (*Kurum İçi Eğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
- 21.İş Sağlığı ve Güvenliği II (*Kurum İçiEğitim*), İNÖNÜ PAL Malatya
- 22.ISO 22000-2005 HACCP “ Food Safety Management Systems” Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 23.18001 2007-OHSAS “ Occupational Health and Safety Systems”Eğitimi,14. Kasım 2015,Malatya
- 24.ISO 9001-2008 Kalite Yönetimi Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 25.ISO 19011-2011 Internal Auditor Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 26.Risk Analizi Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 27.Proje Yönetimi Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 28.ISO 19011-2011 İç Denetçi Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 29.Girişimcilik Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 30.İletişim Teknikleri Eğitimi, 14. Kasım 2015,Malatya
- 31.ISO 22000 2005-HACCP Gıda Güvenliği Eğitimi, 15. Kasım 2015,Malatya
- 32.Liderlik Eğitimi, 15. Kasım 2015,Malatya
- 33.ISO 14001-2004 Çevre Yönetimi Eğitimi,15. Kasım 2015,Malatya
- 34.Zaman Yönetimi Eğitimi, 15. Kasım 2015,Malatya

- 35.**Dökümantasyon Eğitimi, 15. Kasım 2015,Malatya
36.18001-2007 OHSAS İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, 15. Kasım 2015,Malatya
37.ISO 14001-2008 “Environmental Management Systems” Eğitimi, 15. Kasım 2015,Malatya
38.ISO 9001-2008 “Quality Management Systems” Eğitimi,15. Kasım 2015, Malatya
39.Genel Metroloji ve Kalibrasyon Eğitimi, 22 Aralık 2015,Malatya
40.Embriyonik Kök Hücre Kültürü eğitimi, 09-13 Mayıs 2016, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Müh. ve Biyoteknoloji Enstitüsü
41.Analitik Jena Plasma Quant MS ICP-MS Sistemi Eğitim Sertifikası, Ekim 2016, Malatya

