

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CERATONIA SILIQUA L. (HARNUP)'NİN SİTOTOKSİK VE
ANTİTÜMORAL ETKİSİ***

Eczacı Furkan GÜREL

**FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

2019 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CERATONIA SILIQUA L. (HARNUP)'NİN SİTOTOKSİK VE
ANTİTÜMORAL ETKİSİ***

Eczacı Furkan GÜREL

**FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

2019 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner, Ortak Program) Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/07/2019



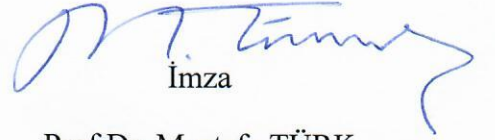
İmza

Prof.Dr. Ender YARSAN
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı



İmza

Prof.Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



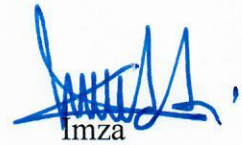
İmza

Prof.Dr. Mustafa TÜRK
Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi
Üye



İmza

Doç.Dr. Ebru YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



İmza

Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| Kabul ve Onay | II |
| İçindekiler | III |
| Önsöz | IV |
| Simgeler ve Kısaltmalar | V |
| Şekiller | VI |
| Çizelgeler | VIII |
| ÖZET | X |
| SUMMARY | XII |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1.Harnup (<i>Ceratonia siliqua</i> L.) | 1 |
| 1.1.1.Keçiboynuzunun Tarihçesi | 2 |
| 1.1.2.Keçiboynuzu Meyvesinin Özellikleri | 4 |
| 1.1.3.Keçiboynuzu Pekmezinin Bileşimi ve Üretimi | 6 |
| 1.1.4.Keçiboynuzunun Kullanım Alanları | 8 |
| 1.1.4.1.Gıda Endüstrisinde | 9 |
| 1.1.4.2.Tekstil Endüstrisinde | 9 |
| 1.1.4.3.Kağıt Endüstrisinde | 9 |
| 1.1.4.4.Petrol Endüstrisinde | 9 |
| 1.1.5.Keçiboynuzunun Sağlık Üzerine Etkisi | 10 |
| 1.2.Kanser | 11 |
| 1.2.1.Akciğer kanseri | 12 |
| 1.3.Çalışma Amacı | 13 |
| 2.GEREÇ VE YÖNTEM | 14 |
| 2.1.Araç, Cihazlar ve Kimyasal Maddeler | 14 |
| 2.2.Yöntem | 15 |
| 2.2.1.Ekstraksiyon | 15 |
| 2.2.2.MTT VE Double Staining Protokolü | 15 |
| 2.2.3.İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi | 17 |
| 3.BULGULAR | 18 |
| 3.1.MTT Testi Bulguları | 18 |
| 3.2.Apoptoz ve Nekroz Bulguları | 30 |
| 4.TARTIŞMA VE SONUÇ | 45 |
| KAYNAKLAR | 49 |
| ÖZGEÇMİŞ | 54 |

ÖNSÖZ

Akciğer kanseri, akciğer dokularında kontrolsüz hücre büyümesi ile görülen akciğer tümörüdür. Bu hücreler metastaz ile yakınındaki dokulara veya vücudun diğer kısımlarına yayılabilir. Tümörün kaynağı akciğer olan kanserler, primer akciğer kanseri olarak adlandırılır.

Harnup (*Ceratonia siliqua* L.), meyvesinin değerli olması nedeniyle ülkemizde önemli orman ağacı türlerinden kabul edilir. Fabacea (Leguminosae) familyasının, Caesalpinioideae alt familyasının bir türü olan harnup, meyvesinin yenilebilmesi sebebiyle ekonomik değere sahip önemli bitkilerden biridir.

Dünya üzerinde en yaygın kanserlerden biri olan akciğer kanseri için, günümüzde tıbbi ve alternatif tıp olarak giderek artan araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmada harnup (keçiboynuzu) meyve ekstraktı, harnup pekmezi ve harnup özünün akciğer kanser hücrelerine olan etkisi incelenmiştir.

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana olan desteğini esirgemeyen başta tez danışmanlarım sayın Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ'ye, Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e, Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ebru YILDIRIM'a, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 4.sınıf öğrencisi nişanım Eda Nisa DAVAZ'a, Yüksek lisans eğitimime destek olan sevgili anneme, babama ve aileme desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------|---|
| HMF | Hidroksimetilfurfural |
| BT | Bilgisayarlı Tomografi |
| PET-BT | Pozitron Emisyon Tomografisi Bilgisayarlı Tomografi |
| MTT | Metiltiazol difenil tetrazolyum |
| TUİK | Türkiye İstatistik Kurumu |
| ORS | Oral Rehidrasyon Solüsyonu |
| g | Gram |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| μ | Mikro |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Keçiboynuzu ağacının genel görünümü | 1 |
| Şekil 1.2. Keçiboynuzu meyvesi | 5 |
| Şekil 1.3. Pekmez üretimi akım şeması | 7 |
| Şekil 2.1. Kuyucuklara hücre ekimi | 17 |
| Şekil 2.2. İkili boyama yöntemi ile hücre sayımı | 17 |
| Şekil 3.1. Keçiboynuzu pekmezinin A549 kanser hücrelerine toksik etkisi | 20 |
| Şekil 3.2. Keçiboynuzu pekmezinin L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisi | 22 |
| Şekil 3.3. Keçiboynuzu özünün A549 kanser hücrelerine toksik etkisi | 24 |
| Şekil 3.4. Keçiboynuzu özünün L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisi | 26 |
| Şekil 3.5. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzu meyvesinin A549 kanser hücrelerine toksik etkisi | 27 |
| Şekil 3.6. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzu meyvesinin L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisi | 28 |
| Şekil 3.7. Farklı konsantrasyonlarda keçiboynuzu uygulanmış kanser ve normal hücrelerin fotoğrafları | 29 |
| Şekil 3.8. 1/10 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz - nekroz Oranları | 30 |
| Şekil 3.9. 1/20 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz - nekroz oranları | 31 |
| Şekil 3.10. 1/40 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları | 32 |
| Şekil 3.11. 1/10 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları | 33 |
| Şekil 3.12. 1/20 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz - nekroz oranları | 34 |
| Şekil 3.13. 1/40 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları | 35 |
| Şekil 3.14. 1/10 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları | 36 |
| Şekil 3.15. 1/20 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları | 37 |
| Şekil 3.16. 1/40 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları | 38 |

| | |
|--|----|
| Şekil 3.17. 1/10 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları | 39 |
| Şekil 3.18. 1/20 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları | 40 |
| Şekil 3.19. 1/40 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları | 41 |
| Şekil 3.20. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzunun A549 kanser hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları | 42 |
| Şekil 3.21. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzunun L929 fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 43 |
| Şekil 3.22. Keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser ve normal hücrelerinin örnek apoptoz nekroz görüntüleri | 44 |

ÇİZELGELER

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1. Dünya’da 2013 yılı keçiboynuzu dikili alan, üretimi ve oranı | 3 |
| Çizelge 1.2. Keçiboynuzu pekmezinin fiziksel ve kimyasal özellikleri | 8 |
| Çizelge 3.1.1/10 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezinin a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 18 |
| Çizelge 3.2.1/20 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezinin a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 19 |
| Çizelge 3.3.1/40 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezinin a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 19 |
| Çizelge 3.4.1/10 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezinin 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 20 |
| Çizelge 3.5.1/20 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezinin 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 21 |
| Çizelge 3.6.1/40 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezinin 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 21 |
| Çizelge 3.7.1/10 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu özünün a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 22 |
| Çizelge 3.8.1/20 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu özünün a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 23 |
| Çizelge 3.9.1/40 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu özünün a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 23 |
| Çizelge 3.10.1/10 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu özünün 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 24 |
| Çizelge 3.11.1/20 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu özünün 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 25 |
| Çizelge 3.12.1/40 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu özünün 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 25 |
| Çizelge 3.13. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzu meyvesinin a549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi | 26 |
| Çizelge 3.14. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzu meyvesinin 1929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi | 27 |

| | |
|---|----|
| Çizelge 3.15.1/10 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 30 |
| Çizelge 3.16.1/20 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 31 |
| Çizelge 3.17.1/40 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 32 |
| Çizelge 3.18.1/10 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 33 |
| Çizelge 3.19.1/20 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 34 |
| Çizelge 3.20.1/40 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 35 |
| Çizelge 3.21.1/10 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 36 |
| Çizelge 3.22.1/20 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 37 |
| Çizelge 3.23.1/40 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 38 |
| Çizelge 3.24.1/10 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 39 |
| Çizelge 3.25.1/20 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 40 |
| Çizelge 3.26.1/40 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 41 |
| Çizelge 3.27. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzunun A549 kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 42 |
| Çizelge 3.28. Ekstrakte edilmiş keçiboynuzunun L929 fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları | 43 |

ÖZET

Harnup (*Cerotonia siliqua* L.) halk arasında sağlık alanında çeşitli kullanımları olan bir bitkidir. Bu çalışma kapsamında, harnup meyve ekstraktı, harnup pekmezi ve harnup özü formunun adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi (A549) ve fare adipoz doku kökenli fibroblast (L929/R) hücrelerinde, toksisite ve nekroz/apoptoz etkileri değerlendirildi.

Bu amaçla MTT ve DOUBLE STAINING protokolüne göre uygun besiyerleri oluşturularak hazırlanan A549 VE L929 hücreleri tripan mavisi ile boyandıktan sonra sayılan hücreler; kuyucuk başına 10.000 hücre düşecek şekilde 48 well-plate'de kültüre edildi. Üzerlerine L929 ve A549 için %10 fetal bovine serum, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) eklendi. Hücreler 37 °C de % 5 CO₂-li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından keçiyoynuzu pekmezi ve özü 1/10,1/20,1/40 oranlarındaki farklı seyreltmelerle 3 farklı konsantrasyon ve 5 farklı doz olarak uygulandı. Yine aynı şekilde 24 saat önceden ekstrakte edilen harnup meyvesi 5 farklı doz olarak uygulandı. 24 saat inkübasyondan sonra plakaların içindeki vasat atıldı ve her bir kuyucuk başına 100 µl fenol kırmızısı besiyeri ve 50 µl MTT solüsyonundan eklendi. Solüsyon eklendikten sonra 2 saat etüvde bekletildi. 2 saatin sonunda MTT solüsyonu çekilip üzerine 100 µl izopropanol eklenip ELİSA okuyucuda 570 nm'de okutularak toksisite sonuçlarına bakıldı.

Elde edilen sonuçlara göre; harnup ekstraktının uygulanan dozlarda hem L929 hücrelere hem de A549 hücrelerine karşı toksik etki göstermediği tespit edildi. L929 ve A549 hücrelerine harnup pekmezi ve özü direk uygulandığında yüksek oranda toksisiteye sebep olduğu görülmüştür. Bu nedenle 1/10, 1/20 ve 1/40 oranında seyreltilerek elde edilen solüsyonlar 200 µg/ml konsantrasyona kadar hücrelere uygulanmıştır. Sonuçlara göre seyrelme oranı arttıkça, toksisitenin her üç formda da düştüğü gözlemlendi.

İkili boyama protokolünde ise apoptoz/nekroz sonuçlarına bakılmıştır. Sonuçlara göre gerek L929 hücrelerde gerekse A549 hücrelerinde nekrotik ölüm apoptotik ölüme göre daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Özellikle harnup ekstraktında apoptoz yok denecek kadar düşük olduğu görülmüştür. Pekmez ve özünde apoptoz oranları birbirine yakın elde edilmiştir. Ayrıca nekroz oranı yine seyrelme oranına ve uygulanan doza bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Yüksek oranlarda, nekroz yüksek olarak bulunurken, oran düştükçe nekrozun azaldığı görülmüştür. L929 fibroblast hücrelerinde apoptoz oranının A549 kanser hücrelerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Harnup, ülkemiz şartlarında kolay yetiştirilebilen ve işlenebilen bir bitkidir. Çalışma kapsamında akciğer kanser hücrelerine yönelik etkileri de dikkate alınarak söz konusu bitkinin; tedavi ile uygulamalarda alternatif bir yaklaşım olarak ifade edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: MTT, keçiboynuzu (*Cerotonia siliqua* L.), akciğer kanseri, toksisite, nekroz, apoptoz

SUMMARY

Carob (*Cerotonia siliqua* L.) is a plant with various uses in the field of health among the public. The aim of this study was to evaluate the potential toxic, necrotic/apoptotic effects of carob (*Cerotonia siliqua* L.) fruit extract, syrup and essence on adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549) and mouse adipose tissue derived fibroblast (L929) cells.

For this purpose, in our MTT and DOUBLE STAINING protocol experiments; A549 and L929 cells were prepared by forming suitable media, stained with trypan blue and seeded in 48 well-plate at 10,000 cells per well. DMEM (containing 10% foetal bovine serum and 1% penicillin / streptomycin) were used for both cell cultures. The cells were incubated at 37 ° C in a 5% CO₂ incubator for 24 hours. After 24 hours of incubation the carob syrup and essence; It was applied in 3 different concentrations and 5 different doses with 1/10, 1/20 and 1/40 different dilutions. In the same way, the extract of the carob extract, which was extracted 24 hours in advance, was applied at 5 different doses. After 24 hours of incubation, the residue in the plates was discarded and 100µl of phenol red and 50µl of MTT solution were added per well. After the solution was added, it was kept in the oven for 2 hours. After 2 hours, MTT solution was withdrawn, 100µl isopropanol was added and the ELISA reader was studied at 570 nm and toxicity results were examined.

According to the results carob extract were not found to be toxic against both L929 cells and A549 cells at administered doses. High degree of toxicity was detected in L929 and A549 cells which carob syrup and essence were directly applied. Therefore, solutions obtained by diluting 1/10, 1/20 and 1/40 were applied to the cells up to a concentration of 200µg/ml. According to the results, as the dilution rate increased, the toxicity was observed to decrease in all three forms.

Apoptosis / necrosis results were evaluated in the double staining protocol. According to the results, necrotic death in both L929 cells and A549 cells was higher

than apoptotic death. Apoptosis in the carob extract were found to be especially low. In syrup and in essence, apoptosis ratios were found to be close to each other. In addition, the rate of necrosis was observed to vary depending on the dilution rate and the dose administered. In high doses, necrosis was found to be high, and necrosis was found to be decreased as it fell. The ratio of apoptosis in L929 cells was higher than that of A549 cells. Carob is a plant that can be easily cultivated and processed under the conditions of our country. Within the scope of the study, taking into consideration the effects on lung cancer cells; It can be expressed as an alternative approach in treatment with applications.

Keywords: MTT, carob (*Cerotonia siliqua* L.), lung cancer, toxicity, necrosis, apoptosis



1. GİRİŞ

1.1 Harnup (*Ceratonia siliqua* L.)

Harnup (*Ceratonia siliqua* L.), Leguminosae familyasının (Fabacea), Caesalpinioideae alt familyasının bir türü olan, meyvesinin yenilebilir olması sebebiyle ekonomik değere de sahip bir bitkidir (Battale ve Tous 1997). Yeryüzünde en eski bitkilerden biri olduğu söylenen harnubun, Cerotonia cinsi içerisinde yer aldığı belirtilmiştir. M.Ö. 79 'da Vezüv yanardağının çevresinde yanmış bitki kalıntıları incelenmiş ve keçiboynuzuna rastlanıldığı belirtilmiştir (Anon 2016a). Türkiye’de keçiboynuzu, boynuz, yaban balı isimleriyle adlandırılan harnubun en çok kullanılan ismi keçiboynuzudur. Akdeniz ikliminin tipik bitki örtüsü olan makinin en önemli üyelerinden biridir (Seçmen 1975, Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).



Şekil 1.1. Keçiboynuzu ağacı (Vehbi 1991).

Keçiboynuzu ağacı kuraklığa ve taşlı zeminlere dayanıklı olduğundan, diğer mahsuller için çok sert ve uygun olmayan topraklarda yetiştirilebilir (Yüksel ve ark. 1992).

Keçiboynuzu ağacı kışın yapraklarını dökmemektedir. Oval yapraklı, düz kenarlı, açık yeşil renkte, ortadaki ana damardan ayrılan sağlı sollu yan damarlara sahiptir. Yapraklarının büyüklüğü 4-5 cm civarı, parlak, alt yüzeyi kırmızımsı esmer renkte ve çok kısa saplıdır. Yeşilimsi çiçeklere sahiptir (Yılmaz 2009).

Bu bitki iklim koşullarına göre değişse de yıl içerisinde ortalama 24 °C sıcaklığa, %74 nispi neme ve m² başına 100 mm yağışa ihtiyaç duymaktadır. Kök yapısının güçlü olmasından dolayı çok az suya ihtiyaç duymakta ve kuraklıkta bile meyve verebilmektedir. Keçiboynuzu bitkisi nem oranı yüksek ve çok su içeren toprağı sevmemektedir. Tuz oranı yüksek, mineral oranı düşük, taşlı ve kumlu topraklarda gelişiminin iyi olduğu belirtilmiştir (Demirtaş 2007).

1.1.1 Keçiboynuzunun Tarihçesi

Keçiboynuzunun tohumlarının ağırlıklarının sabit olması nedeniyle aynı zamanda ölçü birimi olarak da kullanılmıştır. Dirhem kelimesi keçiboynuzu çekirdekleri temel alınarak oluşturulan ağırlık birimidir (Anon 2016b). Bir meyvede yaklaşık 10-15 (tohum) çekirdek vardır (Anon 2016a). Arapça karşılığı kirat olan keçiboynuzu aynı zamanda elmaslarda da ölçü birimi olarak kullanılmıştır. Mücevher ağırlık birimi olan karatın keçiboynuzundan aldığı belirtilmiştir (Anon 2016b).

Keçiboynuzunun insanlık tarihinde ölçü, değer ve ağırlık birimi olarak kullanılmasının yanında, insanların karşılaştıkları pek çok önemli sağlık probleminde doğal ilaç olarak kullanılması bu bitkinin daha da önemli hale gelmesini sağlamaktadır (Anon 2016b).

Keçiboynuzu, Akdeniz iklimindeki özelliklere uyum sağlayan tipik bir meyvedir. Keçiboynuzu ağacı, yıl içerisinde sürekli yeşil, baklagiller familyasına ait, düşük sıcaklıklarda dayanıklı bir meyve ağacıdır. Kültüre alınmasına gerek olmadan ve yetişmesi sırasında hiçbir kimyasal maddeye ihtiyaç duyulmadan yetiştirilen bu ağaç, ilk meyvesini 5-10 yaşlarında verir, ekonomik ömre ise 10-15 yaşlarında ulaşmaktadır. İlerleyen yıllarda meyve miktarını ve kalitesini artırmaktadır. Bu ağacın elli yıl süresinde 15 metre yüksekliklere kadar erişebildiği belirtilmiştir (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

Günümüzde Dünya genelinde başta İspanya, Portekiz, İtalya olmak üzere Yunanistan, Fas, Tunus, Cezayir, Kıbrıs, İsrail ve Türkiye gibi Akdeniz ülkeleri dışında ABD, Avustralya ve Güney ve Kuzey Afrika'da yoğun olarak keçiboynuzu yetiştirilmektedir. Keçiboynuzu, verimi değişiklik göstermekle birlikte bu ülkelerin iklimlerine uyum sağlamıştır (Demirtaş 2007).

Keçiboynuzunun istatistiksel verilerinde, 11 ülkede yetiştirilebilen bir meyve olduğu ve en önemli üretici ülkelerin İspanya, İtalya, Fas, Portekiz, Yunanistan, Türkiye ve Kıbrıs olduğu görülmüştür. En fazla üretim İspanya'dadır. İspanya dikili alanda Dünyada % 52,27; üretimde % 27,51 oranında pay sahibidir. İspanya'yı sırasıyla İtalya, Fas ve Portekiz takip etmektedir. Türkiye ise % 3,65 üretim oranı ile üretimde son sıralarda görülmektedir (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003, Gübbük ve ark. 2016).

Dünya'da 2013 yılı keçiboynuzu dikili alan ve üretimi, Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Dünya'da 2013 yılı keçiboynuzu dikili alan, üretimi ve oranı (Gübbük ve ark. 2016).

| ÜLKELER | Üretim Alanı (ha) | Üretim Miktarı (ton) | Alan (oran %) | Üretim (oran %) |
|------------|-------------------|----------------------|---------------|-----------------|
| İspanya | 43000 | 40000 | 52.27 | 27.51 |
| Portekiz | 9800 | 23000 | 11.91 | 15.82 |
| Yunanistan | 5600 | 22000 | 6.81 | 15.13 |
| Fas | 9750 | 20500 | 11.91 | 14.10 |
| Türkiye | 3000 | 14261 | 3.65 | 9.81 |
| İtalya | 5768 | 9445 | 7.01 | 6.49 |
| Kıbrıs | 1637 | 9120 | 1.99 | 6.27 |
| Diğer* | 3656 | 7098 | 4.44 | 4.88 |
| DÜNYA | 82261 | 145424 | 100 | 100 |

*Cezayir, Lübnan, Tunus, Hırvatistan, İsrail, Ukrayna, Meksika

Keçiboynuzu, Türkiye'de henüz kültürü yapılmamış, ancak doğal ortamda yetiştirilmektedir. Orman içlerinde ve orman arazilerinde sayılı gruplar halinde bulunan bu ağaçların doğal floradaki miktarı tam tespit edilememiştir. Türkiye'de keçiboynuzu ağaçlarının % 90'ının yabancı ağaçlardan oluştuğu için meyve kalitesi düşüktür (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2008 verilerinden alınan bilgiye göre Türkiye'de yetişmiş 326229 adet keçiboynuzu ağacının 284789 adedinin meyve verdiği belirtilmiştir (Aydın 2011).

Ülkemizde ise keçiboynuzu, Akdeniz Bölgesinde Tarsus ve Mersin'den başlayıp Marmaris'e kadar uzanan yaklaşık 1750 km²'lik kıyı şeridinde doğal olarak yetişmektedir. Etlı, sisam ve yabancı çeşitleri Türkiye'de görülen tiplerdir ve keçiboynuzu yetiştiriciliği giderek önem kazanmaktadır (Demirtaş 2007).

1.1.2 Keçiboynuzu Meyvesinin Özellikleri

Keçiboynuzu ağaçları 100 yaşlarına kadar canlı kalan ve bu yaşlarda dahi meyve verebilmektedir. Ticari olgunluğa erişmiş bir keçiboynuzu ağacının yıllık ortalama 90-115 kg meyve verebildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte; toprak kalitesi, çeşit ve ağacın yaşına bağlı olarak bazı ağaçların yılda 300 kg meyve verebildiği de gözlenmiştir (Şenay 2009).

Bu bitkinin çeşide ve hava koşullarına göre Eylül-Aralık döneminde çiçek açmaktadır. Çiçekleri ait olduğu familyanın diğer üyelerine göre çok renkli değildir. Çiçekler, ağacın gövdesinden veya dallarından fışkırmakta olup çok eşeylidirler. Renkleri kırmızımsı çok ufak tomurcuklardan oluşan salkım şeklindedir. Her iki eşeye sahip olan çiçeklerin, dişi veya erkek eşey özelliğini kaybetmiş diğer çiçeklerin eksikliğini tamamlama özelliğine sahip oldukları halde, kültüre alınmış tüm çeşitleri iki eşeylidir. Nadir de olsa keçiboynuzu bitkileri, tamamen erselik veya aynı saptta olan çiçeklerde hem erkek hem de dişi eşeyin bir arada bulundurabildiği belirtilmiştir (Demirtaş 2007).

Mayıs ayı başında büyümeye başlayan keçiboynuzu meyveleri, haziran-temmuz aylarında olgunlaşmaktadır. Meyvelerin rengi olgunlaştıktan itibaren yeşilden kahverengiye dönüşmektedir. Meyveler olgunlaştığında eylül ayında hasat edilmeye başlanır ve mevsim koşullarına bağlı şekilde hasat kasım-aralık aylarına kadar devam edebilir (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003). Eylül ve ekim ayı gibi meyveler olgunlaştığında kendiliğinden ağaçtan dökülebilmektedir. Elde edilen keçiboynuzları rutubetsiz ortamlarda saklanmalıdır ve uzun süre bekletildiyse; keçiboynuzunu tüketmeden önce bazı yerlerinden kırılarak kurtlanıp kurtlanmadığına bakılır (Anon 2016b).

Dünyanın birçok yerinde yetişen keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında; cins, bölge ve iklime bağlı olarak 6 – 32 g ağırlığında, 85 – 177 mm

uzunluğunda, 6 – 24 mm genişliğinde ve 4 -10 mm kalınlığında, 7 – 14 adet çekirdek (tohum) içermekte olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Shawakfen ve Ereifej 2005, Yousif ve Alghzawi 2000, Biner ve ark. 2007). Şekil 1.2’de keçiboynuzu meyvesi görülmektedir.



Şekil 1.2. Keçiboynuzu meyvesi (Anon 2016c).

Keçiboynuzu meyvesi incelendiğinde meyvenin cinsi, yetiştirildiği bölge, hasat zamanı (olgunluk), yetiştiği toprak ve iklim özelliği ile kültürel tekniklere bağlı olarak kimyasal bileşimin oldukça değişken olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, keçiboynuzu meyvesinin kuru madde (% 84 – 94), şeker (% 45 – 77), mineral madde (% 2,2 – 3,4), yağ (%0,2 – 1,2) ve protein (% 0,3 – 7,6) içerdiği saptanmıştır (Karkacier ve Artık 1995, Ayaz ve ark. 2007, Şenay 2009, Karabulut ve ark. 2006, Ekşi ve Artık 1986).

Keçiboynuzu meyvesinin yaklaşık %90’ını etli kısım meydana getirir. Bu kısımda sukroz, glukoz, selüloz ve tanen yönünden oldukça zengindir. Bu içeriklerinden dolayı özellikle ülkemizde kışın hem hastalıklardan koruyucu hem de enerji verici olarak pekmez şeklinde, doğrudan ya da çeşitli gıdalara karıştırılarak değişik şekillerde tüketilmektedir. Ülkemizde pek de yaygın olmasa da Morton (1987)’ e göre çekirdeklerinden arındırılmış ve öğütülmüş keçiboynuzu zengin şeker içeriğinden istifade edilerek kakao gibi sıcak ya da soğuk süt ile karıştırılarak tüketilebilmektedir. Ancak bazı kaynaklar yüksek kondanse tanen içeriğinden dolayı

tüketiminin kontrollü yapılmasını önermektedir (Morton 1987, Avallone ve ark. 1997).

Keçiboynuzu meyvelerinin şeker oranı şeker kamışından daha fazla durumdadır. Çekirdeksiz haliyle keçiboynuzu meyvesinin ağırlığının % 52'si şekerdir (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003). Keçiboynuzu meyvesi, fasulyenin şekline benzeyen, deriye benzer sert ve yarılamayan özelliktedir. Olgunlaşmamış meyveler yeşil, olgunlaşma başlayınca kahverengi ve olgun halde koyu kahverengi görünümündedir. Çekirdeklere sahip meyvenin boyutu, şekli ve kalınlığı, yetiştirilmesine ve türüne bağlı olarak büyük ölçüde değişebilmektedir (Demirtaş 2007).

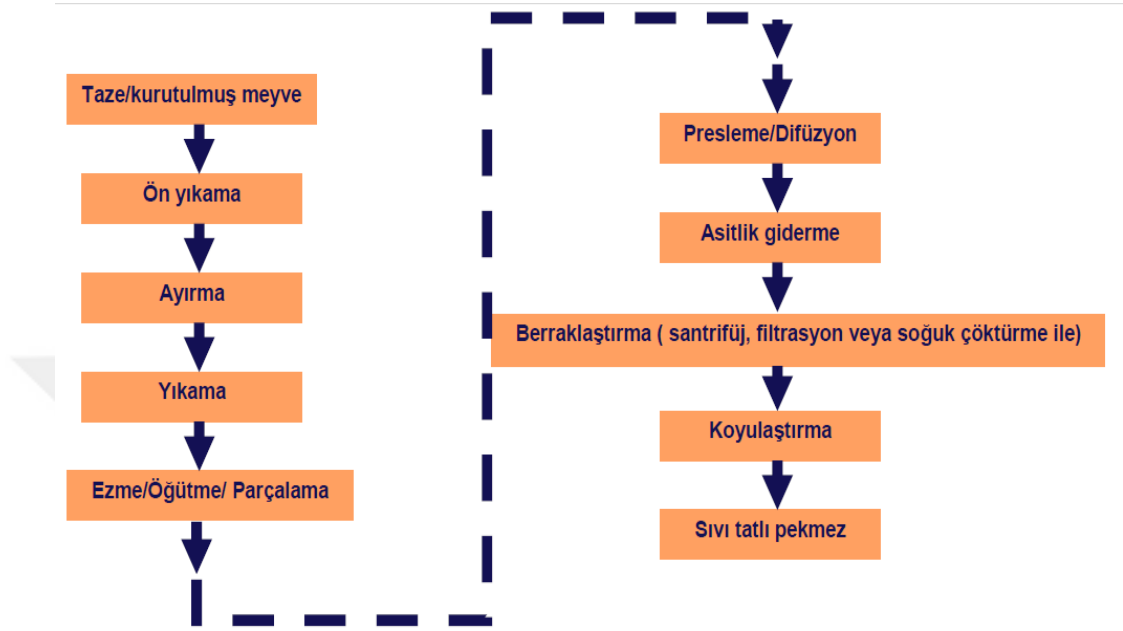
Çekirdekler meyve ağırlığının yaklaşık %10'unu kapsamakta ve çekirdek endosperminin başlıca içeriğini galaktoman (polisakkarit) oluşturmaktadır (Calixto ve Cañellas 1982; Morton 1987; Batlle ve Tous 1997). Çekirdek endosperminin öğütülmesiyle elde edilen keçiboynuzu zıkkı (E410) pek çok alanda kullanılmaktadır (Temiz 2011). Keçiboynuzu, çikolata ile benzeyen görünüme ve kendine ait özel tada sahip doğal tatlandırıcıdır. Keçiboynuzu, çoğunlukla kakao ve çikolata yerine kullanılır. (Yousif ve Alghzawi 2000).

1.1.3 Keçiboynuzu Pekmezinin Bileşimi ve Üretimi

Pekmez, yüksek karbonhidrat içeriği, üretildiği meyvenin çeşidine göre birçok vitamin ve mineral madde içermesi sebebiyle enerji veren, oldukça faydalı bir gıda olup ülkemize has geleneksel bir üründür (Şengün ve ark. 2007). Türk milleti yıllarca şeker içeriği olan her şeyden pekmez üretimi yapmıştır (Şimşek ve ark. 2004, Kaya ve ark. 2005).

Ticari bir işletmede keçiboynuzu pekmezi üretimine ilişkin üretim sürecinde öncelikle yüzey alanı genişletilip meyvenin bünyesinde bulunan şekerin ekstraksiyonunu hızlandırmak için küçük parçalara bölünmüş keçiboynuzu meyvelerinin suda bekletilerek içindeki şekerin alınması sağlanır. Elde edilen şıra separatörden geçirilerek içindeki partiküller ayrılır ve daha berrak bir şıra elde edilmiş olur. Elde edilen şıra vakum altında konsantre edilir ve şıranın pekmeze dönmesi sağlanır. Henüz keçiboynuzu pekmezi için hazırlanmış bir standart veya

Türk Gıda Kodeksinde tebliği bulunmamaktadır (Çakır 2009). Pekmez üretim aşamaları Şekil 1.3'te görülmektedir.



Şekil 1.3. Pekmez üretimi akım şeması (Karababa ve Işıklı 2005).

Keçiboynuzu pekmezi üretiminde, ekstraksiyon esnasında uygulanan maserasyon işleminde meyvenin çekirdekli ya da çekirdeksiz oluşu pekmezin bileşimini etkilemektedir. Çekirdekli meyvenin maserasyon ekstraktından elde edilen pekmez daha yüksek çözünür kuru madde ve şeker içeriğine sahipken pH değeri, çekirdeksiz meyveden elde edilen pekmezde daha yüksektir (Ekşi ve Artık 1986).

Vakum yöntemi ile üretilen keçiboynuzu pekmezi 6 ay süre ile 5 ve 20 °C sıcaklıkta depolanarak, depolama süresi ve koşullarının pekmezin kalitesine etkisinin incelendiği bir çalışmada; depolama süresince keçiboynuzu pekmezinin hidroksimetilfurfural (HMF) değerinde önemli bir değişimin olmadığı ve soğuk odalarda bekletilen pekmezlerin daha olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Batu ve ark. 2007).

Türkiye’de keçiboynuzu meyvesinin en yaygın kullanımı pekmez üretimi olarak belirtilmiştir. Meyveye göre bakıldığında pekmez daha iyi bir enerji kaynağı olarak gösterilebilir. Keçiboynuzu pekmezinin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.2’de gösterilmiştir. Pekmez, şekerce zengin iyi bir enerji kaynağıdır. Yüksek şeker

içeriği sebebiyle, insan beslenmesi açısından özellikle bebekler, çocuklar, sporcular ve hamileler için çok yararlıdır. Bununla birlikte, % 0,33 oranında protein içerir (Şengül ve ark. 2007).

Şengül ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada piyasada bulunan keçiboynuzu pekmezinin toplam şeker içeriğini % 70,1 olarak bulmuşlardır.

Çizelge 1.2. Keçiboynuzu pekmezinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Şengül ve ark. 2007).

| PARAMETRE | DEĞERLER |
|------------------------|----------------|
| Toplam Kuru Madde | % 75,9 (w/w) |
| Çözünabilir Kuru Madde | % 72 (w/w) |
| Nem | % 24,1 (w/w) |
| Toplam Şeker | % 71,2 g/100g |
| İnvert Şeker | % 49,1 g/100g |
| Sakaroz | % 22,11 g/100g |
| Toplam Fenolik Madde | 1,62 mg/kg |
| Kül | % 2,48 (w/w) |
| Protein | % 0,33 (w/w) |
| 5- HMF | 21,32 mg/L |
| pH | 5,09 |
| Titrasyon Asitliği | % 0,60 (w/w) |

1.1.4 Keçiboynuzu Kullanım Alanları

Ağacından meyvesine, meyvesinden tohumuna kadar çok farklı amaçlarla kullanılan keçiboynuzu, Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde doğal olarak yetişmektedir. Sanayide meyve ve tohumunun entegre olması, bu türün ekonomik olarak değerini daha da arttırmaktadır (Gübbük ve ark. 2016).

1.1.4.1 Gıda Endüstrisinde

Keçiboynuzundan elde edilen zank, sakız ve türevleri stabilizör ve kabartıcı etkileri sebebiyle dondurma üretim aşamalarında kullanılır. Sos, jöle, meyve şurupları, meyve konsantrelerinde stabilizör etkisi ile kullanılan, pasta ve çöreklerin içine yardımcı madde olarak katılan keçiboynuzu zankı; ürünlerin gevşekliğini ve bayatlamalarını önleyip, kek ve bisküvilerin içinde ise yumurtadan tasarruf ederek parçalanmaları önleyebilmek ve kolayca taşınabilir özellik kazandırmaktadır (Gübbük ve ark 2016, Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

1.1.4.2 Tekstil Endüstrisinde

Keçiboynuzu zankı ve türevleri eşit geçirgenlik, sabit nem ve düz yüzey elde etmede kolaylık sağladığı için pamuklu dokumalarda kullanılır. Bununla beraber boyacılıkta alkaliye dayanıklı olmasından dolayı yoğunluğu arttırıcı olarak kullanılır. Baskıda kalınlaştırmayı sağlaması ve renk dağılımını eşit hale getirmesi özellikleri ile kullanılır. Ayrıca dokumanın boyayı kolay emmesini sağlar (Gübbük ve ark 2016, Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

1.1.4.3 Kâğıt Endüstrisinde

Kâğıdın dökülmesinde zaman ve enerji kaybı olmaması için keçiboynuzu zankı kullanılır. Böylelikle kâğıt hamuru drenaj oranı artmış olmakla beraber makine hızı artırılmıştır (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

1.1.4.4 Petrol Endüstrisinde

En etkili koruyucu katkı maddesi yönüyle keçiboynuzu zankı sondaj operasyonlarında, derin tuz tabakalarının sondajında veya tuzlu su çalışmalarında , su kaybını önleme amacıyla ve çamur yoğunluğunun azaltılmasında kullanılmaktadır (Gübbük ve ark 2016, Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

Keçiboynuzunun bu kullanım alanları yanında; matbaacılıkta, kibrit yapımında, mobilyacılıkta, dericilikte (dabaklamada), kozmetik sanayinde, fotoğraf filmlerinin emülsiyonunda, deterjan ve plastik sanayinde, sigara endüstrisinde tütüne lezzet vermek için, patlayıcı madde yapımında, seramik endüstrisinde tutkal olarak, diş macunu yapımında yoğunlaştırıcı olarak kullanılmaktadır (Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

1.1.5 Keçiboynuzunun Sağlık Üzerine Etkisi

Keçiboynuzu, gastrointestinal sistem bozuklukları, gastrit, karaciğer ve özellikle de akciğer rahatsızlıklarında kullanılmıştır. Bununla beraber diş ve diş etleri rahatsızlıklarında, kolesterolün düşürülmesinde, kas gelişiminde ve yüksek enerji potansiyeli nedenleriyle doğal enerji verici olarak kullanılmaktadır (Ahraz 2003, Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

Ülkemizde bu meyvenin en yaygın kullanım şekli pekmez olarak kullanımındır. Keçiboynuzu pekmezi demir ve kalsiyum bakımından zengin bir mineral kaynağıdır. Bundan dolayı osteoporoz gibi rahatsızlıklarda kalsiyum ihtiyacının karşılanmasında vücuda çok iyi bir destekleyici maddedir (Gübbük ve ark. 2016).

Akciğer ödeminde keçiboynuzunun etkisi ve desteği önemli bir imkândır. Ekspektoran gücü ve astım hastalığına karşı tedavi etkisi çok fazladır. Sigara içenlerde, akciğer kanser önleyici gücünden dolayı büyük yararlanımları vardır. Keçiboynuzu aynı zamanda hareketli sperm proliferasyonunu artırıcı özellikte olduğu belirtilmiştir. İyi huylu prostat büyümesi (benign prostat hiperplazisi) şikâyeti olan hastaların sıklıkla keçiboynuzu tüketmelerinde çok fayda vardır (Anon 2016d).

Aynı zamanda insan vücudunda meydana gelebilecek dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu, antioksidan özellik gösteren polifenoller ve yüksek lif içeriği nedeniyle sağlık üzerinde pek çok faydası bulunmaktadır. Keçiboynuzu lifinin antioksidatif etkisinin diğer liflere oranla daha fazla olduğu görülmüştür (Gümüşhan Aktaş 2018, Tunalıoğlu ve Özkaya 2003).

Polifenoller aynı zamanda serbest radikallerin rol aldığı ateroskleroz, yaşlanma, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etki gösterirler (Halliwell

1994). Keçiboynuzu meyvesi 24 adet fenolik bileşen içermektedir ve bu bileşenlerin içinde gallik asit en yüksek orandadır (Owen ve ark. 2003).

Yüksek lif içeriğinden dolayı, kanda bulunan HDL-LDL dengesinin kurulmasında önemlidir. Keçiboynuzunun kolesterol seviyesindeki etkinliğine bakıldığı bir çalışmada, günlük 15 gr keçiboynuzu tüketiminde kolesterolü % 10,5, kandaki trigliserid miktarını ise %11,3 oranlarında düşürdüğü gözlenmiştir (Zunft ve ark. 2003).

Pratikte, çok eski çağlardan beri diyare tedavisinde kullanılmakta olan keçiboynuzunu, oral rehidrasyon solüsyonlarıyla birlikte kullanıldığında diyare süresini %45 oranında azaltmakta ve oral rehidrasyon solüsyonu (ORS) kullanımını % 38 düşürmektedir (Aksit ve ark. 1998). Yapılan bir çalışmada diyare tedavisinde kullanılan bir antibiyotiğin de içinde bulunduğu bir tedavi şeklinde, diyare 7 günde tedavi edilirken, % 5 oranında keçiboynuzu meyvesinin parçalanıp kavrulmasıyla elde edilen keçiboynuzu unu ilave edilen bir başka diyetin uygulanmasıyla diyarenin tedavi süresinin 2 gün kısaldığı görülmüştür (Plowright 1951, Gümüşhan Aktaş H 2018).

Keçiboynuzu çekirdeklerinden elde edilen protein izolatları, yüksek aminoasit içeriği nedeniyle insanlar için gıda üretiminde kullanılabilir önemli bir alternatiftir. Glutamik asit ve arginine bakımından zengin olduğundan özellikle sporcu gıdaları ve fonksiyonel gıdalarda kullanılabilir (Dakia ve ark. 2006; Bengoechea ve ark. 2007).

Keçiboynuzu şeker içeriğinin yanı sıra tanen içeriğinden dolayı, bazı selülotik bakterilere (*Celvibrio fulvus*) karşı bakteriyostatik ve bakterisidal etki göstermektedir (Henis ve ark. 1963).

1.2 Kanser

Tüm kanserler hücrelerde başlar. İnsan vücudu yüz milyondan fazla hücreden oluşur. Kanser, bir hücrede veya küçük bir hücre grubunda değişikliklerle başlar. Vücutta her hücre sayısı belirlidir ve bunu, hücrelerin ne kadar ve ne sıklıkla bölündüğünü sinyaller ile kontrol eder. Bu sinyallerden herhangi biri arızalı veya eksikse, hücreler büyüyüp çoğalabilir ve tümör adı verilen bir yumru oluşturabilir. Bir tümör

milyonlarca kanser hücresi içerebilir. Tüm vücut dokuları, o dokunun hücrelerini içeride tutan bir katmana (zara) sahiptir. Bu, bazal membrandır. Kanser hücreleri bu zarı kırabilir. Bu durumda, kanser invaziv olarak adlandırılır (Anon, 2017a).

Dünya üzerinde kanserin, ekonomi açısından da önemi giderek artmaktadır. 2010 yılındaki toplam maliyetinin tahmini 1,16 trilyon ABD doları olduğu düşünülmektedir (Stewart BW ve Wild CP 2014).

Epidemiyolojik çalışmalar, kanserin Dünya’da kalp hastalıklarından sonra ikinci sıradaki ölüm nedeni olmaya devam ettiğini belirtmektedir. Son yıllardaki gelişmelerde çeşitli koruyucu önlemler alınarak riskin azaltılabilmesi, en azından hastalığın erken evrede teşhis edilerek etkili tedavi yöntemlerine başvurulması mümkün görünmektedir. Neredeyse insanlık tarihi kadar eski zamanlardan beri kanser dahil pek çok hastalık için alternatif bir tedavi aracı olarak bitkiler ve onlardan hazırlanan preparasyonlar karşımıza çıkmaktadır. Etkin maddesi saflaştırılarak yumurtalık, meme, akciğer, testis gibi çeşitli kanserlere karşı günümüzde ticari ilaç olarak kullanılan bu bitkiler arasında *Taxus brevifolia* (taxol/paclitaksel), *Podophyllum peltatum* (podofilotoksin), *Vinca minor*, *Catharanthus roseus* (vinkristin, , vinblastin, vinorelbin) ve benzerleri sayılabilir (Gümüştan Aktaş 2018).

1.2.1 Akciğer Kanseri

Dünyada en yüksek ölüm oranına sahip kanser tipi akciğer kanseridir. Erkeklerde sıklık olarak birinci sırada, bayanlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Parkin ve ark. 2005). Sigara, hava kirliliği ve radyasyon akciğer kanserine neden olan en önemli sebeplerdir (Janssen-Heijnen ve ark. 2003). 20. yüzyıl öncesi az görülen bir hastalık iken, sigara içmedeki artışa bağlı olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en sık görülen kanser çeşitlerinden biri olmuştur (Spiro ve ark. 2002). Akciğer kanserinin gelişiminde sigara içimi en önemli etiyolojik faktördür. Sigara içenlerde içmeyenlere göre akciğer kanseri riski 20 kat yüksektir. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi riski etkilemektedir. Çevresel sigara dumanı maruziyeti de akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (Hirayama 1981). Akciğer kanseri önlenabilir bir hastalıktır.

Risk faktörlerine dikkat edildiğinde % 85-100 oranında önlem sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu konuda öncelik, sigara kullanımını ortadan kaldırmaktır (Silvestri ve ark. 1995).

Akciğer kanseri erken evrede özellikle çevre lezyonlarda semptom göstermez. Genellikle akciğer kanseri dışında yapılan taramalar sırasında tesadüf olarak saptanır. Uygulanacak tanı yönteminde, seçimi primer tümörün tipi, yeri, büyüklüğü, metastazların varlığı ve hastanın durumuna bağlıdır. Akciğer kanseri için alınabilecek ilk önlem sigaranın bırakılması, ikinci önlem de erken teşhistir. Akciğer kanserinde gerek belirti ve bulguların hastalığa özgün olmayışı gerekse semptomsuz hastaların çok sayıda olması sebebiyle erken tanı yöntemleri geliştirilmiştir. akciğer kanserli hastalar, tanı konulduğunda çoğunluğu (ortalama %80'i) ileri evrededir (evre III, IV) (Aydın 2007). Bazı akciğer kanseri tanı tarama yöntemleri; PA ve Lateral Akciğer Grafileri, Bilgisayarlı Tomografi (BT), Pozitron Emisyon Tomografisi Bilgisayarlı Tomografi (PET-BT), Beyin MRG/BT, Bronkoskopi, Torakotomi olarak belirtilmiştir (Aydın 2007, Usluer ve Örs Kaya 2017).

1.3. Çalışma Amacı

Akciğer kanseri, akciğer dokularında kontrolsüz hücre büyümesi ile görülen akciğer tümörüdür. Bu hücreler metastaz ile vücutta diğer dokulara yayılabilir. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), ülkemiz şartlarında kolay yetiştirilebilen ve işlenebilen bir bitkidir. Bu çalışma kapsamında, keçiboynuzu meyvesinin ve bu meyveden üretilen keçiboynuzu pekmez ve özünün adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi (A549) ve fare adipoz doku kökenli fibroblast (L929/R) hücrelerinde, toksisite ve nekroz/apoptoz etkilerini değerlendirmektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalarda, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD ile Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (KÜBTUAM) laboratuvarlarında kullanılan cihaz ve malzemelerden yararlanılmıştır.

2.1. Araç, Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

-DMEM (Biological Industries),

-Trypsin EDTA Solution c (Biological Industries),

-Foetal Bovine Serum (Biological Industries),

-Pen-Strep Solution (Biological Industries),

-fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS),

Sitotoksosite testleri için;

-MTT ve İkili Boyama'da RNase,

-propodiyum iodür (PI),

-Hoechst boyası (33342/PI) ,

Hücre kültürü çalışmaları için;

-Biyolojik güvenlik kabini (Esco, Class II BSC),

-CO₂'li inkübatör (Binder),

-santrifüj (Hettich, Rotina 380R),

-tekrarlayıcı pipet (Gilson, Repetman),

-çok kanallı pipet (Gilson, PipetmanUltra),

Sitotoksosite çalışmaları için;

-mikroplak okuyucu (Biotek, PowerWave XS2),

-Apoptoz tayini çalışmalarında mikroskop (Leica, Ctr6000) kullanılmıştır. Hücre kültür çalışmalarının tamamı, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plaklarda (Corning,ABD) gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Ekstraksiyon

Keçiboynuzu pekmezi (70 g karbonhidrat, 0.1 g lif) ve keçiboynuzu özü (532.2 mg Mg, 12.135 mg K, 943.2 mg Ca, 805.82 mg P, 27.09 mg Fe, 14.81 mg Zn, 16.1 mg çözüdür diyet lifi) eczanelerde tezgah üstü ürün olarak ticari amaçlı satılmaktadır. Kırıkkale Eczanesinden temin edilen keçiboynuzu pekmezi, keçiboynuzu özü ve Kırıkkale ilindeki aktardan temin edilen keçiboynuzu meyvesi, TS EN ISO 10993-12 standardında belirtildiği şekilde numunelerden 0,2 g/ml olacak şekilde tartılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar *in vitro* testlerde kullanılmıştır.

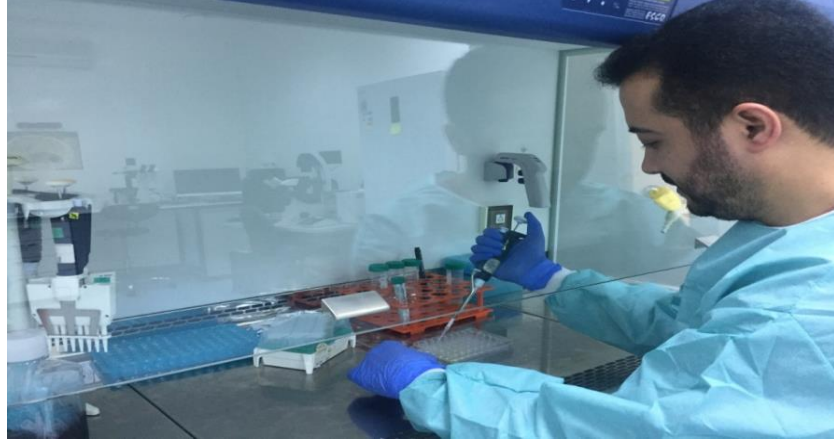
2.2.2. MTT VE Double Staining Protokolü

MTT: Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), 2,3-Bis (2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçümüne dayalı bir yöntemdir (Terzioğlu ve ark. 2013).

Sitotoksosite; canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade eder. Sitotoksosite testleri, toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere denir (Terzioğlu ve ark. 2013).

Kriyotüpler kullanılarak -80°C de dondurularak saklanan L929 ve A549 hücreleri, dondurucudan alınarak çözülmesi sağlanmıştır. DMEM içerisinde % 89 DMEM, % 10 FBS ve % 1 Penisilin Streptomisin olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır. Çözülme işlemi gerçekleştirilirken hücreler falkon tüp içerisine

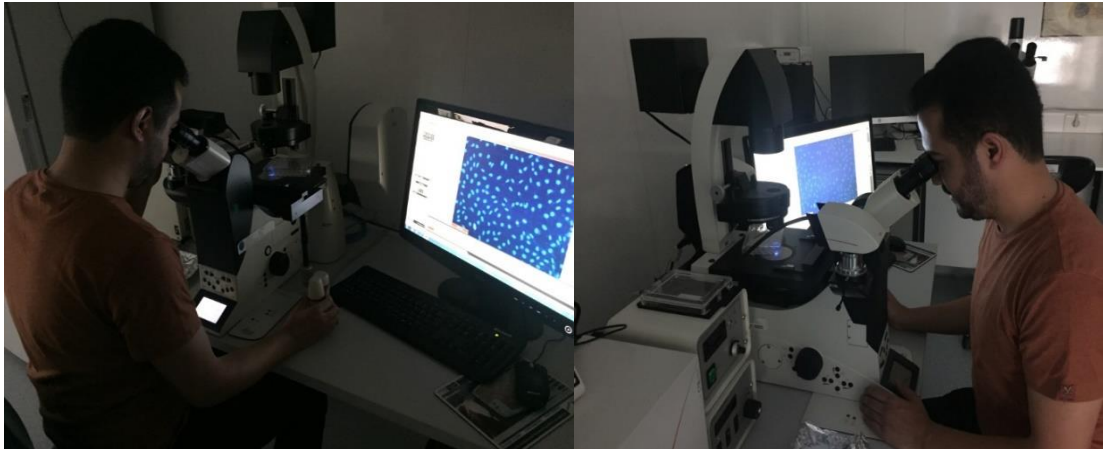
alındıktan sonra 4 mL hazırlanmış olan besiyerinden eklenmiştir. Bu işlemden sonra hücrelerin bulunduğu falkon tüp 2000 rpmde 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından falkon içerisinde bulunan süpernatant atılmış ve pellet besiyeri ile süspansiyon edilerek flasklara aktarılmıştır. 37°C de % 5 CO₂ içeren inkübatöre alınan flasklar 24 saatte bir kontaminasyon ve hücre çoğalmalarının incelenmesi için kontrol edilmiştir. Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında kültürler tripsin enzimi yardımı ile kaldırılmış ve pasaklanarak yeni flasklara aktarılmıştır. Flasklara aktarılarak çoğaltılan L929 ve A549 hücreleri yüzeyleri kaplama oranlarına bakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreleri flasktan kaldırmak için içindeki vasatı atıp 2 mL PBS (1X) ile yıkanarak, ardından 2 mL Tripsin-EDTA eklenmiştir ve 4 dakika boyunca etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılmaları mikroskop yardımı ile kontrol edildikten sonra taze besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 2000 rpm ve 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1mL taze besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Bu işlemin ardından, hücrelerin tripan mavisi ile boyandıktan sonra sayılan hücreler her biri kuyucuk başına 10.000 hücre düşecek şekilde 48 well-plate ekilmiştir. Üzerlerine L929 ve A549 için % 10 fetalbovine serum, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM eklenmiştir. Hücreler 37 °C'de % 5 CO₂-li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından keçiyoynuzu pekmezi ve özü 1/10, 1/20, 1/40 farklı seyreltmelerde 3 farklı konsantrasyon ve 5 farklı doz olarak uygulanmıştır. Yine aynı şekilde 24 saat önceden ekstrakte edilen keçiyoynuzu ekstraktı 5 farklı doz olarak uygulanmıştır. Uygulamamız 24 saat inkübasyondan sonra plakaların içindeki vasat atılmış ve her bir kuyucuk başına 100 µl fenol kırmızısı besiyeri ve 50 µl MTT solüsyonundan eklenmiş ve solüsyon eklendikten sonra 2 saat etüvde bekletilmiştir. 2 saatin sonunda MTT solüsyonu çekilip üzerine 100 µl izopropanol eklenmiş (Şekil 2.1) ve ELİSA okuyucuda 570 nm'de okutulmuştur.



Şekil 2.1. Kuyucuklara hücre ekimi.

2.2.3. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

MTT için yapılan ekim ve uygulama aşamaları aynı olup bu aşamada MTT yerine ikili boyama protokolü uygulanmıştır. Doublestaining için 24 saat inkübasyondan sonra plakaların içindeki vasat atılmıştır. Her bir kuyucuk için 70 μ l Doublestaining solüsyonu (doublestaining solüsyonu 100 μ l Ribonükleaz A, 100 μ l Propodiumiodide, 500 μ l Hoescht 33342 10 ml PBS içerisinde çözülerek hazırlanır) eklenip, 15 dakika etüvde bekletilmiştir. İnkübasyonun hücreler Hoechst 33342 ve propodium iyodid floresan çekirdek boyaları ile boyanmıştır. Sonrasında inverted mikroskobun dapi filtresi ve yeşil floresan filtresinde incelenmiştir. Apoptotik hücre çekirdekleri parlak veya parçalı parlak olarak görülürken, nekroz filtresinde nekrotik hücrelerin çekirdekleri turuncu renkte görünmektedir. Nekroz filtresinde sağlam hücreler yeşil çekirdekli görünmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İkili boyama yöntemi ile hücre sayımı.

3. BULGULAR

Çalışma kapsamında keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*)'na ait 3 farklı form; keçiboynuzu pekmezi, keçiboynuzu özü ve keçiboynuzu ekstraktı üzerinde seyreltme işlemleri yapılarak uygulanan kanser ve fibroblast hücrelerinde sitotoksosite, nekroz ve apoptoz değerlendirmeleri yansıtılmıştır. Bulgular çizelge ve şekillerle, her forma ve orana göre gösterilmiştir.

3.1. MTT Testi Bulguları (Sitotoksosite Bulguları)

Toksik etkinin değerlendirilmesi L929 fibroblast ve A549 kanser hücre hattında MTT sitotoksosite metoduna göre ve mikroskopik morfolojik analize göre yapılmıştır. Normal ve kanser hücrelerine keçiboynuzu özü ve pekmezi direk uygulandığında yüksek oranda toksisite tespit edilmiştir. Bu nedenle 1/10, 1/20 ve 1/40 oranında seyreltilerek elde edilen solüsyonlar 200 µg/ml konsantrasyona kadar hücrelere uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. 1/10 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Pekmezinin A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/10 Pekmez - A549 | % Canlılık Değerleri |
|--------------------|----------------------|
| 200 µl | 59,40 |
| 100 µl | 63,65 |
| 50 µl | 68,17 |
| 25 µl | 75,81 |
| 12,5 µl | 93,06 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/10 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 59,4 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.2. 1/20 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Pekmezinin A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

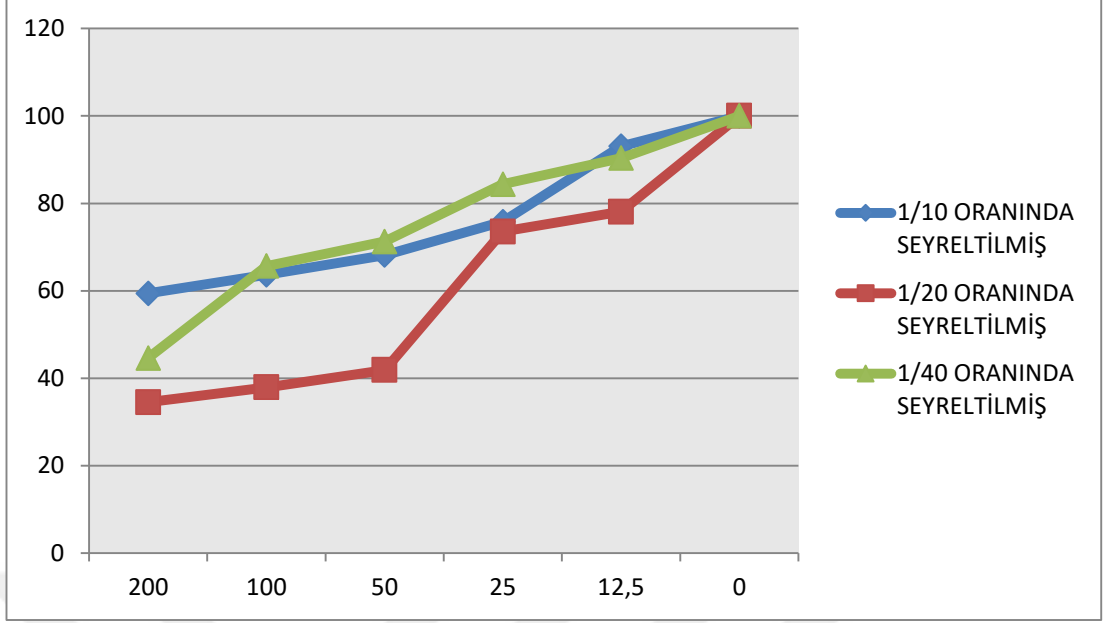
| 1/20 Pekmez - A549 | % Canlılık Değerleri |
|---------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 34,51 |
| 100 µl | 37,90 |
| 50 µl | 41,86 |
| 25 µl | 73,55 |
| 12,5 µl | 78,07 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/20 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 34,51 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.3. 1/40 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Pekmezinin A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/40 Pekmez - A549 | % Canlılık Değerleri |
|---------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 44,61 |
| 100 µl | 65,68 |
| 50 µl | 71,26 |
| 25 µl | 84,38 |
| 12,5 µl | 90,35 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/40 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.3’te gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 44,61 birime kadar azaldığı gözlemlendi.



Şekil 3.1. Keçiboynuzu pekmezinin A549 kanser hücrelerine toksik etkisi.

Keçiboynuzu pekmezinin A549 kanser hücrelerine toksik etkisi incelendiğinde uygulanan dozun artmasıyla toksik etkininde arttığı görülmüştür. Bu durum keçiboynuzu pekmezinin tüm seyrelme durumları için geçerlidir. Fakat aynı dozda seyrelme oranı arttıkça toksisitesinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.1).

Çizelge 3.4. 1/10 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Pekmezinin L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/10 Pekmez - L929 | % Canlılık Değerleri |
|--------------------|----------------------|
| 200 µl | 41,61 |
| 100 µl | 66,44 |
| 50 µl | 77,39 |
| 25 µl | 83,56 |
| 12,5 µl | 84,24 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/10 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksikite sonucu Çizelge 3.4’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 41,61 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.5. 1/20 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Pekmezinin L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

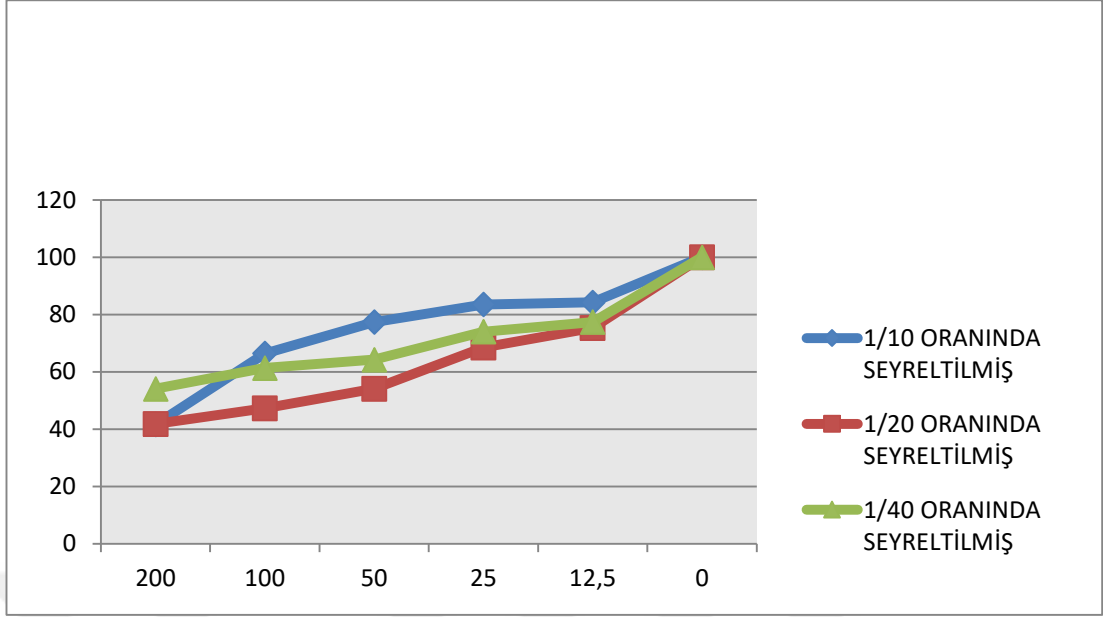
| 1/20 Pekmez - L929 | % Canlılık Değerleri |
|---------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 41,78 |
| 100 µl | 47,26 |
| 50 µl | 54,10 |
| 25 µl | 68,49 |
| 12,5 µl | 75,34 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/20 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 41,78 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.6. 1/40 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Pekmezinin L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/40 Pekmez - L929 | % Canlılık Değerleri |
|---------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 54,08 |
| 100 µl | 61,36 |
| 50 µl | 64,28 |
| 25 µl | 73,02 |
| 12,5 µl | 77,39 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/40 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.6’da gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 54,08 birime kadar azaldığı gözlemlendi.



Şekil 3.2. Keçiboynuzu pekmezinin L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisi.

Keçiboynuzu pekmezinin L929 hücrelerine toksik etkisi uygulanan doz arttıkça artmıştır. Aynı dozda seyrelme oranının artışı toksisiteyi azaltmaktadır (Şekil 3.2).

Çizelge 3.7. 1/10 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Özünün A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/10 Özü - A549 | % Canlılık Değerleri |
|-----------------|----------------------|
| 200 µl | 46,39 |
| 100 µl | 53,18 |
| 50 µl | 66,76 |
| 25 µl | 76,94 |
| 12,5 µl | 81,47 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu özü 1/10 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksikite sonucu çizelge 3.7'de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 46,39 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.8. 1/20 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Özünün A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

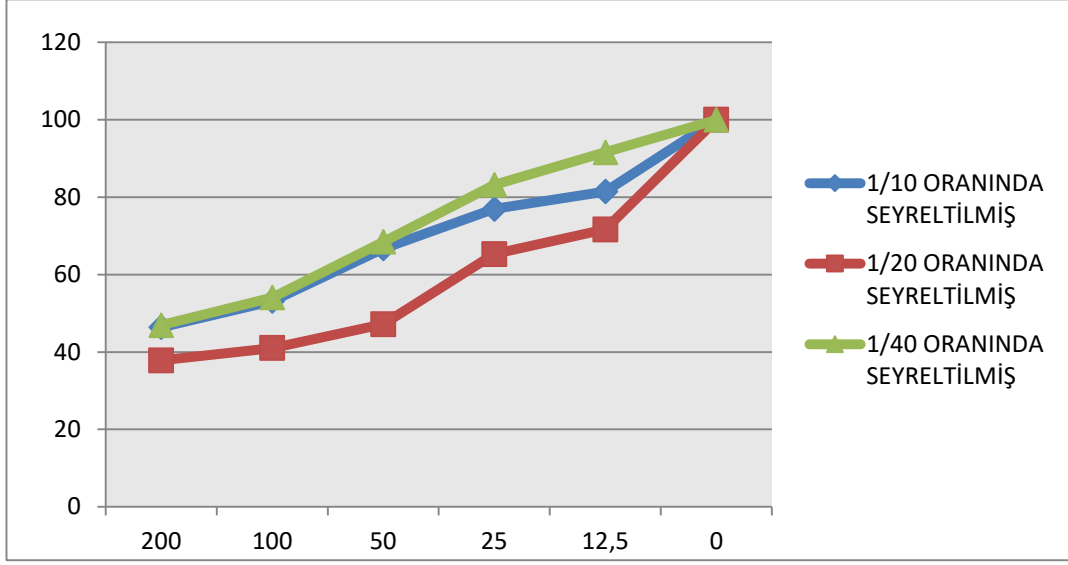
| 1/20 Özü - A549 | % Canlılık Değerleri |
|------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 37,84 |
| 100 µl | 41,02 |
| 50 µl | 47,19 |
| 25 µl | 65,29 |
| 12,5 µl | 71,65 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu özü 1/20 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.8’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 37,84 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.9. 1/40 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Özünün A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/40- Özü - A549 | % Canlılık Değerleri |
|-------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 46,93 |
| 100 µl | 54,09 |
| 50 µl | 68,47 |
| 25 µl | 83,19 |
| 12,5 µl | 91,60 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu özü 1/40 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.9’da gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 46,93 birime kadar azaldığı gözlemlendi.



Şekil 3.3. Keçiboynuzu özünün A549 kanser hücrelerine toksik etkisi.

Keçiboynuzu özünün A549 kanser hücrelerine toksik etkisi uygulanan doz arttıkça artmıştır. Aynı dozda seyrelme oranının artışı ile toksik etki azalmıştır (şekil 3.3).

Çizelge 3.10. 1/10 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Özünün L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/10 Özü - L929 | % Canlılık Değerleri |
|-----------------|----------------------|
| 200 µl | 51,02 |
| 100 µl | 63,69 |
| 50 µl | 65,41 |
| 25 µl | 81,50 |
| 12,5 µl | 92,12 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu özü 1/10 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksisite sonucu Çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 51,02 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.11. 1/20 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Özünün L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

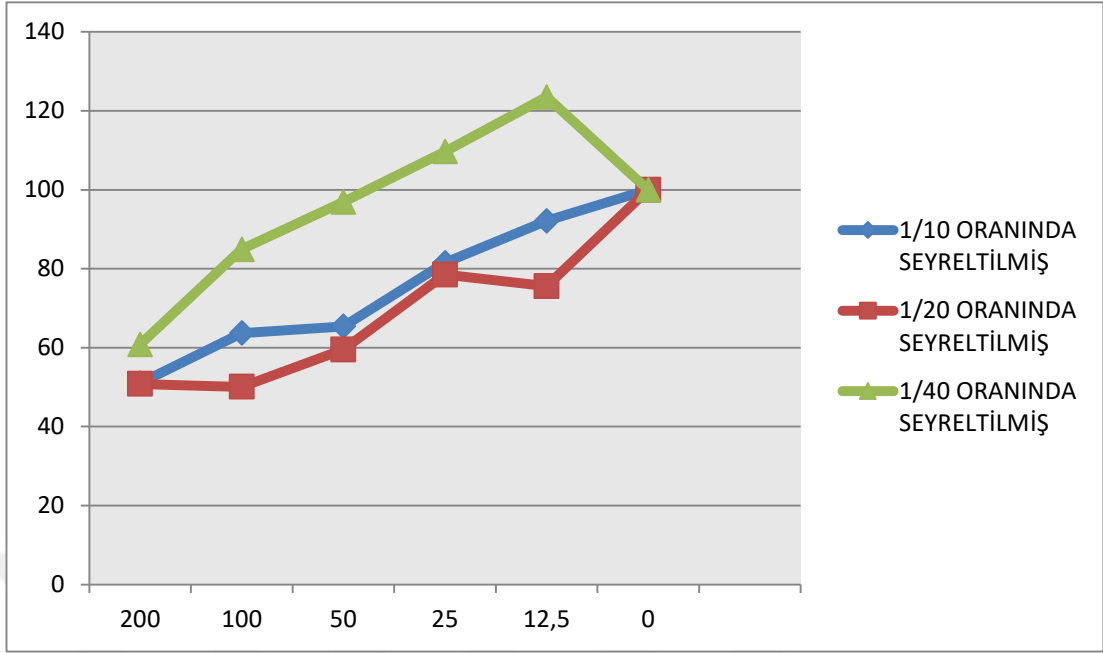
| 1/20 Özü - L929 | % Canlılık Değerleri |
|------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 50,80 |
| 100 µl | 50,07 |
| 50 µl | 59,54 |
| 25 µl | 78,48 |
| 12,5 µl | 75,57 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu özü 1/20 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 50,80 birime kadar azaldığı gözlemlendi.

Çizelge 3.12. 1/40 oranında seyreltilmiş Keçiboynuzu Özünün L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

| 1/40- Özü - L929 | % Canlılık Değerleri |
|-------------------------|-----------------------------|
| 200 µl | 60,83 |
| 100 µl | 84,88 |
| 50 µl | 96,90 |
| 25 µl | 109,66 |
| 12,5 µl | 123,49 |
| 0 | 100 |

Keçiboynuzu özü 1/40 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu Çizelge 3.12’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 60,83 birime kadar azaldığı gözlemlendi.



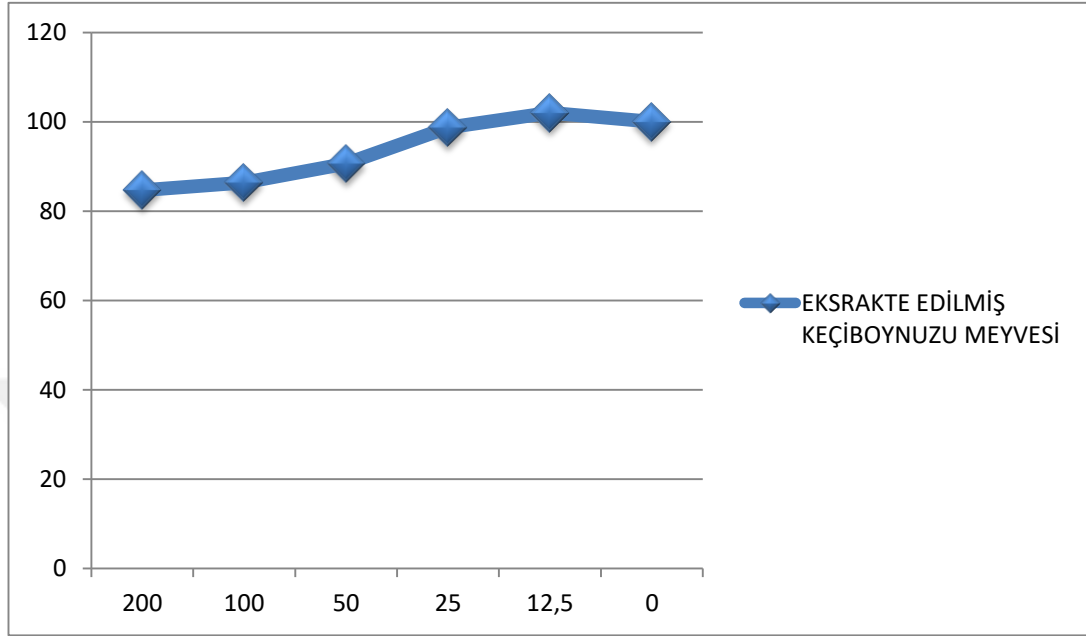
Şekil 3.4. Keçiboynuzu özünün L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisi.

Keçiboynuzu özütünün L929 hücrelerine toksik etkisi uygulanan doz arttıkça artmıştır. Aynı dozda seyrelme oranının artışıyla toksik etki azalmıştır (Şekil 3.4).

Çizelge 3.13. Ekstrakte edilmiş Keçiboynuzu Meyvesinin A549 kanser hücrelerine karşı toksik etkisi.

| A549-Keçiboynuzu Meyve Ekstraktı | % Canlılık Değerleri |
|----------------------------------|----------------------|
| 200 µg | 84,71 |
| 100 µg | 86,38 |
| 50 µg | 90,63 |
| 25 µg | 98,74 |
| 12,5 µg | 102,02 |
| 0 | 100 |

Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesi A549 kanser hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu çizelge 3.13’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin 100 birimden 84,71 birime kadar azaldığı gözlemlendi.



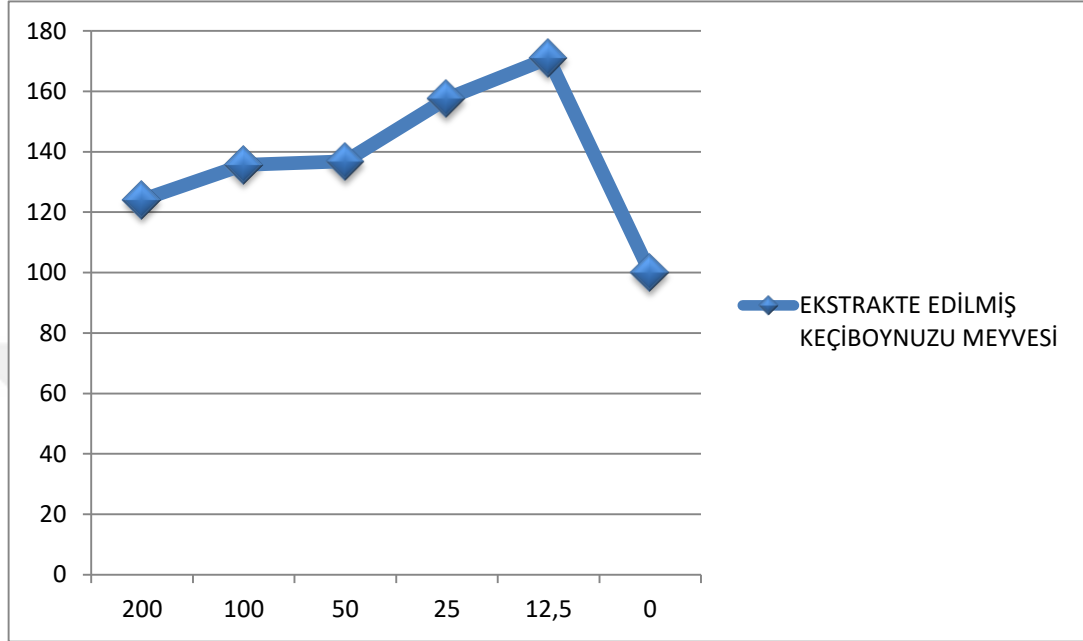
Şekil 3.5. Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesinin A549 kanser hücrelerine toksik etkisi.

Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesinin A549 hücrelerine toksik etkisi doz arttıkça arttığı görülmüştür (Şekil 3.5).

Çizelge 3.14. Ekstrakte edilmiş Keçiyoynuzu Meyvesinin L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkisi.

| L929-Keçiyoynuzu Meyve Ekstraktı | % Canlılık Değerleri |
|----------------------------------|----------------------|
| 200 µg/mL | 124,09 |
| 100 µg/mL | 135,63 |
| 50 µg/mL | 136,80 |
| 25 µg/mL | 157,57 |
| 12,5 µg/mL | 170,97 |
| 0 | 100 |

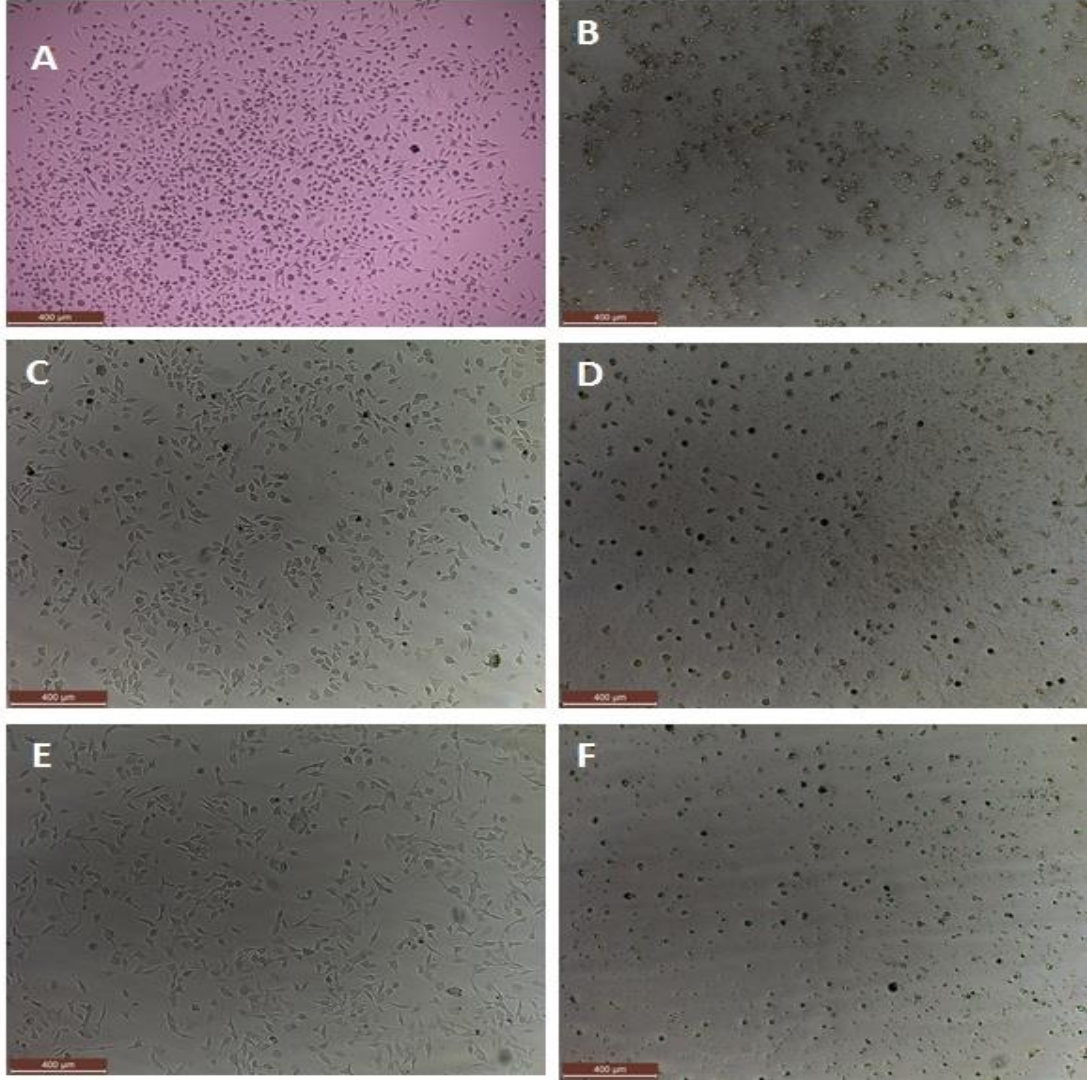
Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesi L929 fibroblast hücrelerine verildi. Sitotoksosite sonucu çizelge 3.14'de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça canlılık değerlerinin önce 100 birimden 170,97 birime kadar arttığı fakat doz arttıkça 124,09 birime kadar azaldığı gözlemlendi.



Şekil 3.6. Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesinin L929 fibroblast hücrelerine toksik etkisi.

Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesinin L929 hücrelerine toksik etkisi doz arttıkça artmıştır. Fakat canlılık değerlerini yükseltmesi, bu hücrelerin daha iyi gelişim sağladığını göstermiştir (Şekil 3.6).

Farklı konsantrasyonlarda keçiyoynuzu uygulanmış kanser ve normal hücrelerin mikroskoptaki görüntüleri Şekil 3.7.'de verilmiştir. Bu görüntülerde keçiyoynuzu formlarının hücre proliferasyonlarına etkisi görülmektedir. Her görüntü sitotoksositeye bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığını göstermektedir.



Şekil 3.7. Farklı konsantrasyonlarda keçiyoynuzu uygulanmış kanser ve normal hücrelerin fotoğrafları.

A) Kontrol fibroblast,

B) 200 µg/ml keçiyoynuzu pekmezi (1/10 oranında seyreltilmiş) uygulanmış fibroblast hücrelerin fotoğrafı,

C) 200 µg/ml keçiyoynuzu meyve ekstraktı uygulanmış fibroblast hücrelerin fotoğrafı,

D) 200 µg/ml keçiyoynuzu özü (1/10 oranında seyreltilmiş) uygulanmış A549 kanser hücrelerin fotoğrafı,

E) 200 µg/ml keçiyoynuzu meyve ekstraktı uygulanmış A549 kanser hücrelerin fotoğrafı,

F) 200 µg/ml keçiyoynuzu pekmezi (1/10 oranında seyreltilmiş) uygulanmış A549 kanser hücrelerin fotoğrafı.

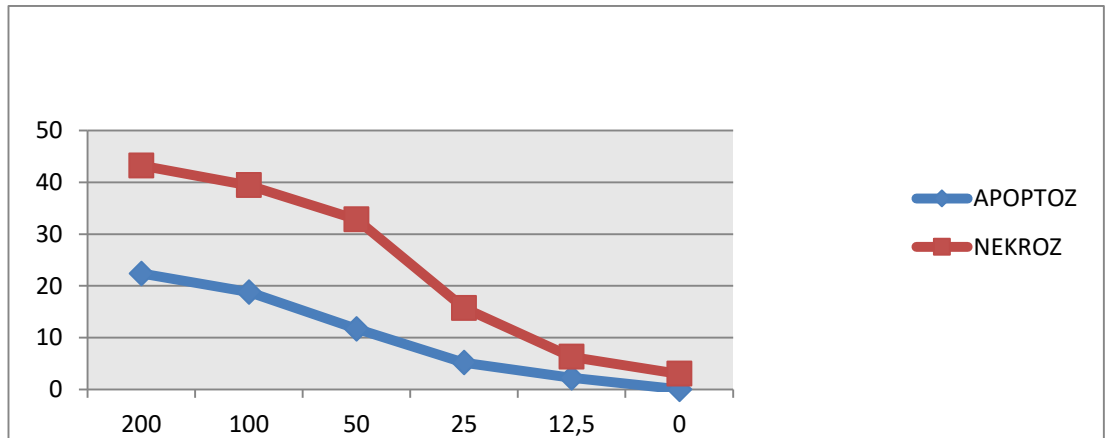
3.2. Apoptoz ve Nekroz Bulguları

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*)'na ait 3 farklı farmasötik şekil; keçiboynuzu pekmezi, keçiboynuzu özü ve keçiboynuzu meyve ekstraktı üzerinde seyreltme işlemleri yapılarak kanser ve fibroblast hücrelerine uygulandı. Hücrelerde görülen apoptoz ve nekroz değerleri tablolarda gösterildi.

Çizelge 3.15. 1/10 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

| 1/10 Pekmez - A549 | % Apoptoz | % Nekroz |
|--------------------|-----------|----------|
| 200µl | 22,38 | 43,23 |
| 100 µl | 18,79 | 39,42 |
| 50 µl | 11,67 | 32,84 |
| 25 µl | 5,14 | 15,69 |
| 12,5 µl | 2,21 | 6,27 |
| 0 | 0 | 3 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/10 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.15'de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.8'de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

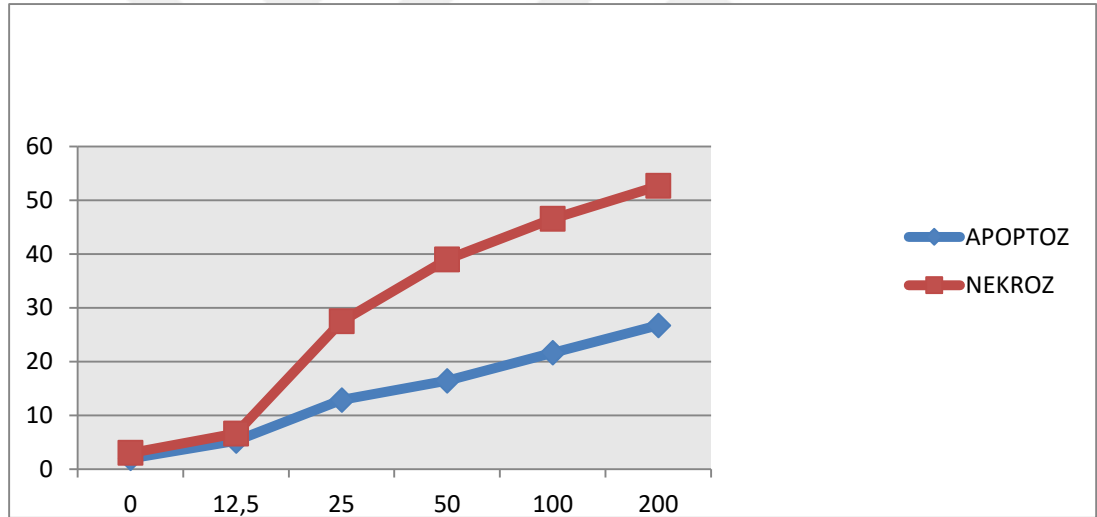


Şekil 3.8. 1/10 oranında Keçiboynuzu Pekmezi Uygulanmış Kanser Hücrelerinde % Apoptoz-Nekroz Oranları.

Çizelge 3.16. 1/20 oranında keçiyoynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

| 1/20 Pekmez - A549 | % Apoptoz | % Nekroz |
|--------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 26,72 | 52,64 |
| 100 µl | 21,63 | 46,53 |
| 50 µl | 16,44 | 38,97 |
| 25 µl | 12,86 | 27,48 |
| 12,5 µl | 5,23 | 16,61 |
| 0 | 2 | 3 |

Keçiyoynuzu pekmezi 1/20 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.16'da gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.9'da apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

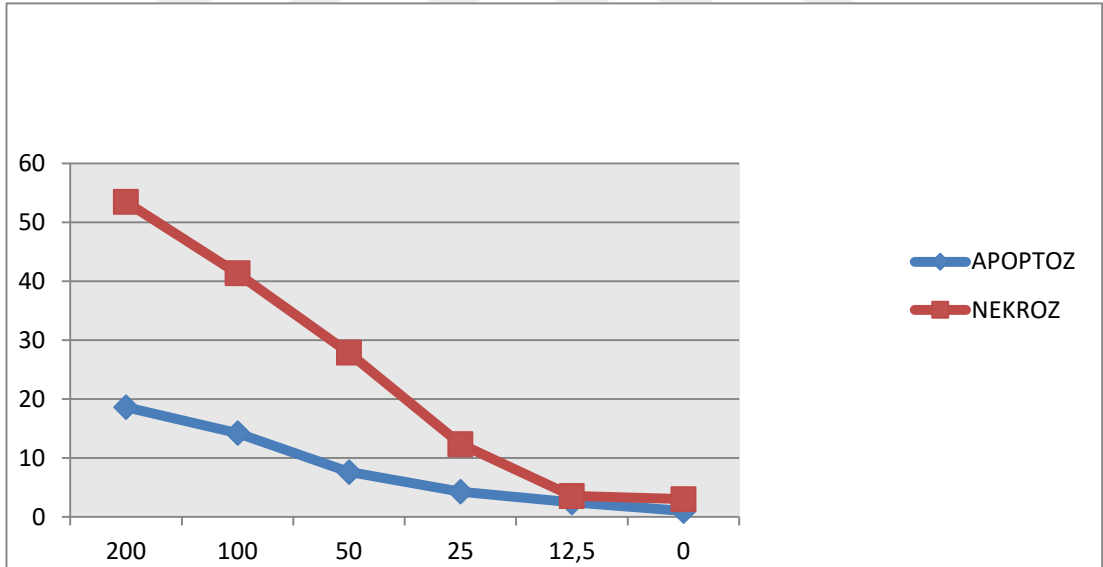


Şekil 3.9. 1/20 oranında Seyreltilmiş Keçiyoynuzu Pekmezi Uygulanmış Kanser Hücrelerinde % Apoptoz-Nekroz Oranları.

Çizelge 3.17. 1/40 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

| 1/40 Pekmez - A549 | % Apoptoz | % Nekroz |
|--------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 18,64 | 53,45 |
| 100 µl | 14,23 | 41,34 |
| 50 µl | 7,62 | 27,86 |
| 25 µl | 4,28 | 12,35 |
| 12,5 µl | 2,46 | 3,56 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/40 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.17’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.10’da apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

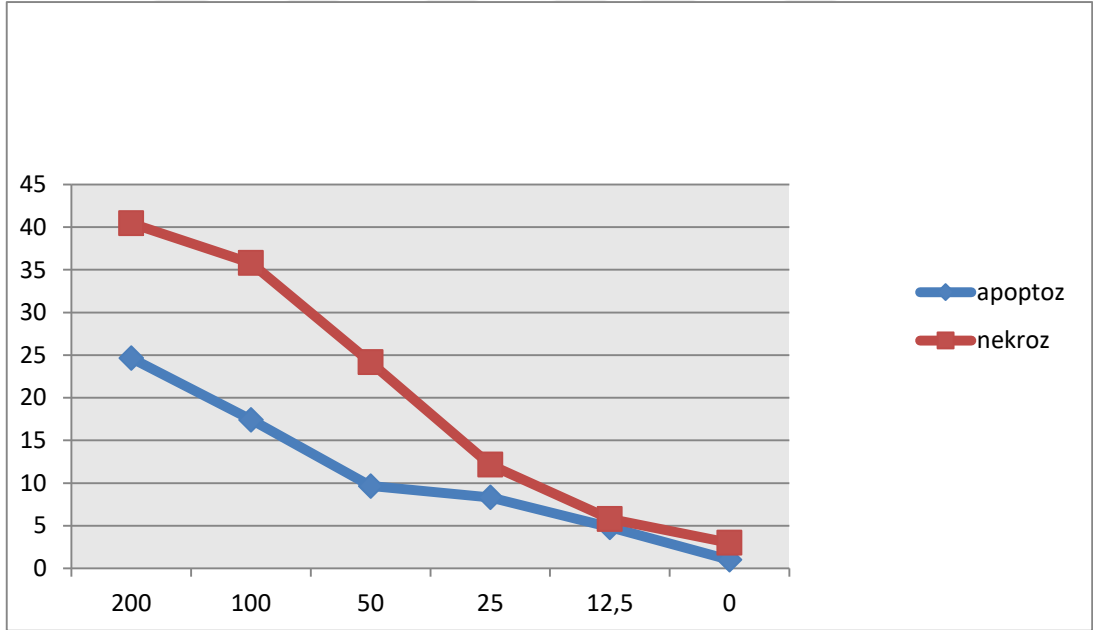


Şekil 3.10. 1/40 oranında seyreltilmiş keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

Çizelge 3.18. 1/10 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

| 1/10 Pekmez - L929 | % Apoptoz | % Nekroz |
|--------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 24,64 | 40,45 |
| 100 µl | 17,42 | 35,8 |
| 50 µl | 9,65 | 24,16 |
| 25 µl | 8,32 | 12,14 |
| 12,5 µl | 4,82 | 5,78 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/10 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.18’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.11’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

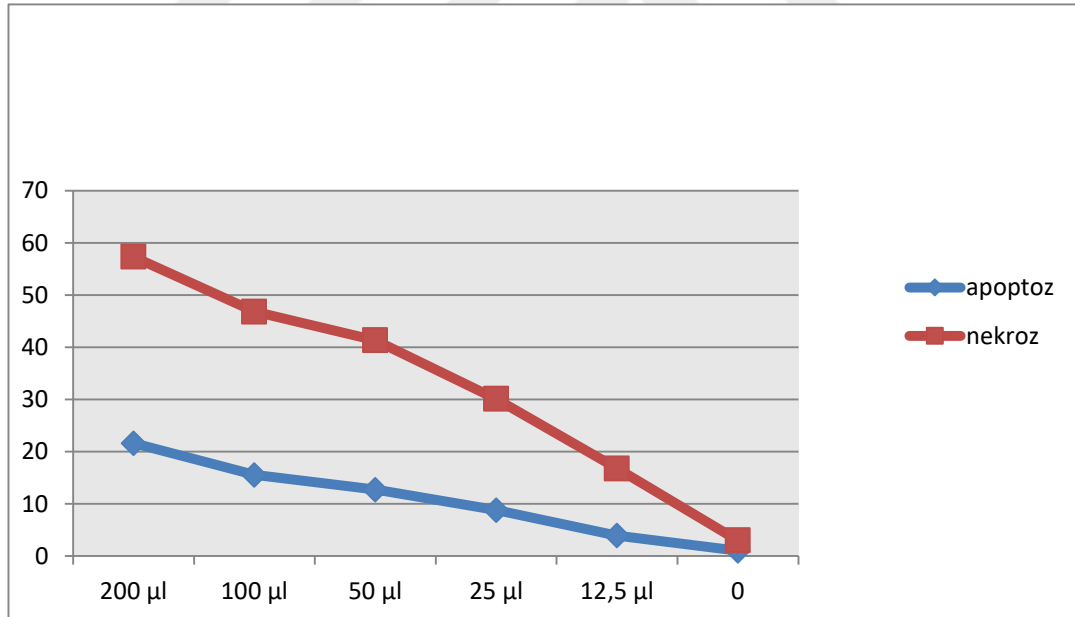


Şekil 3.11. 1/10 oranında Keçiboynuzu Pekmezi Uygulanmış Fibroblast Hücrelerinde % Apoptoz-Nekroz Oranları.

Çizelge 3.19. 1/20 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

| 1/20 Pekmez - L929 | % Apoptoz | % Nekroz |
|--------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 21,62 | 57,34 |
| 100 µl | 15,56 | 46,83 |
| 50 µl | 12,72 | 41,32 |
| 25 µl | 8,81, | 30,12 |
| 12,5 µl | 3,92 | 16,78 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/20 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.19’da gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.12’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

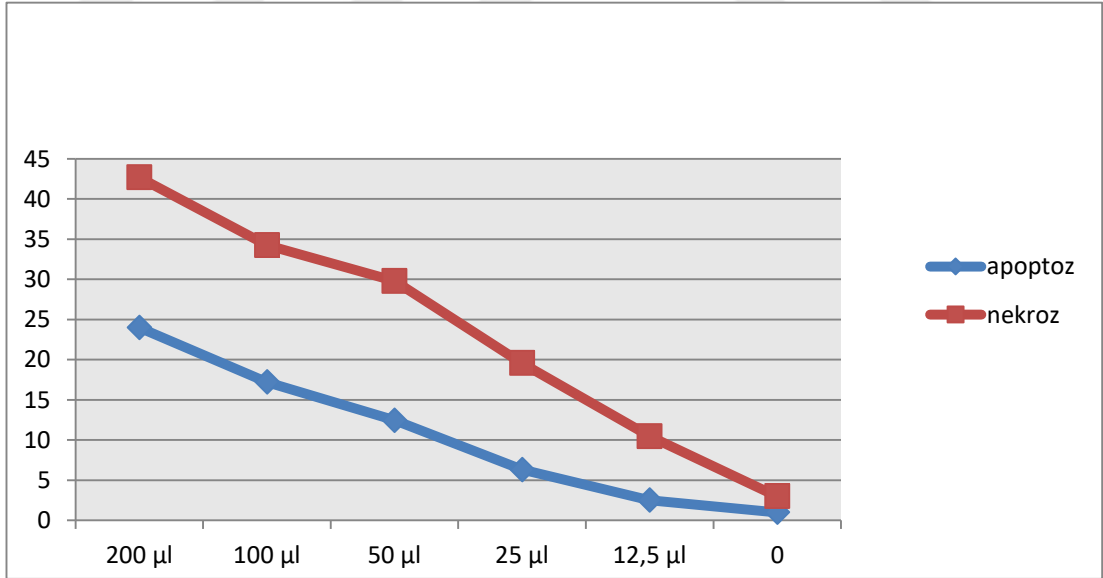


Şekil 3.12. 1/20 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz - nekroz oranları.

Çizelge 3.20. 1/40 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

| 1/40 Pekmez - L929 | % Apoptoz | % Nekroz |
|--------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 23,98 | 42,66 |
| 100 µl | 17,21 | 34,23 |
| 50 µl | 12,46 | 29,78 |
| 25 µl | 6,32 | 19,56 |
| 12,5 µl | 2,52 | 10,46 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiboynuzu pekmezi 1/40 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.20’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.13’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

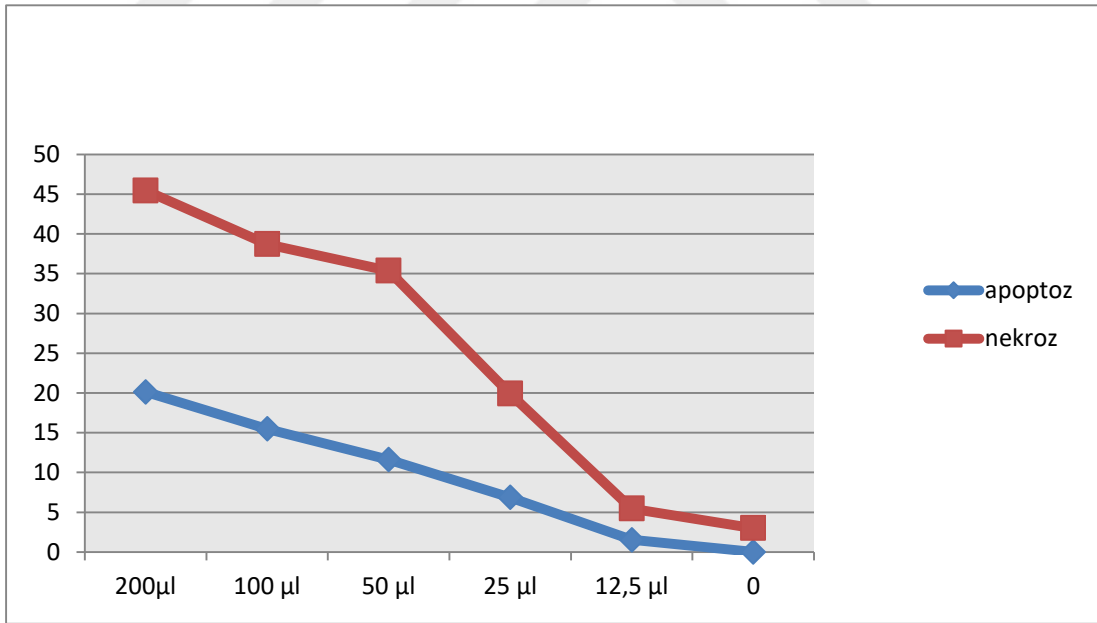


Şekil 3.13. 1/40 oranında keçiboynuzu pekmezi uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

Çizelge 3.21. 1/10 oranında keçiyoynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % apoptoz- nekroz oranları.

| 1/10 Özü - A549 | % Apoptoz | % Nekroz |
|-----------------|-----------|----------|
| 200 µl | 20,13 | 45,46 |
| 100 µl | 15,47 | 38,71 |
| 50 µl | 11,61 | 35,36 |
| 25 µl | 6,87 | 19,9 |
| 12,5 µl | 1,53 | 5,46 |
| 0 | 0 | 3 |

Keçiyoynuzu özü 1/10 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.21’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.14’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

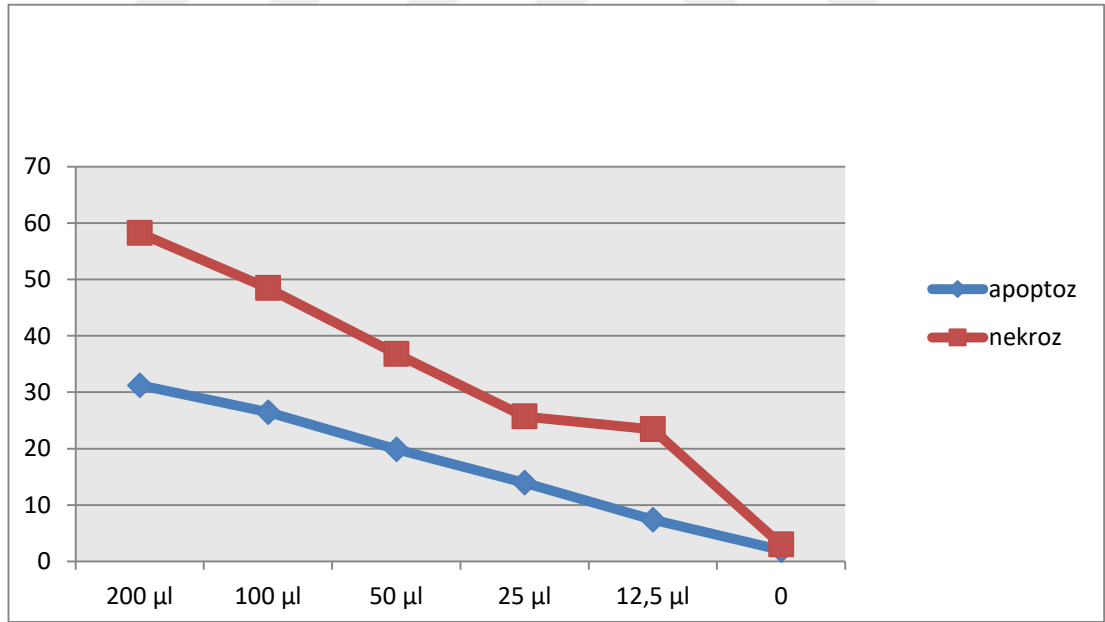


Şekil 3.14. 1/10 oranında Keçiyoynuzu Özü Uygulanmış Kanser Hücrelerinde % Apoptoz- Nekroz Oranları.

Çizelge 3.22. 1/20 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları

| 1/20 Özü - A549 | % Apoptoz | % Nekroz |
|-----------------|-----------|----------|
| 200 µl | 31,24 | 58,23 |
| 100 µl | 26,47 | 48,46 |
| 50 µl | 19,87 | 36,79 |
| 25 µl | 13,95 | 25,68 |
| 12,5 µl | 7,38 | 23,42 |
| 0 | 2 | 3 |

Keçiboynuzu özü 1/20 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.22’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.15’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

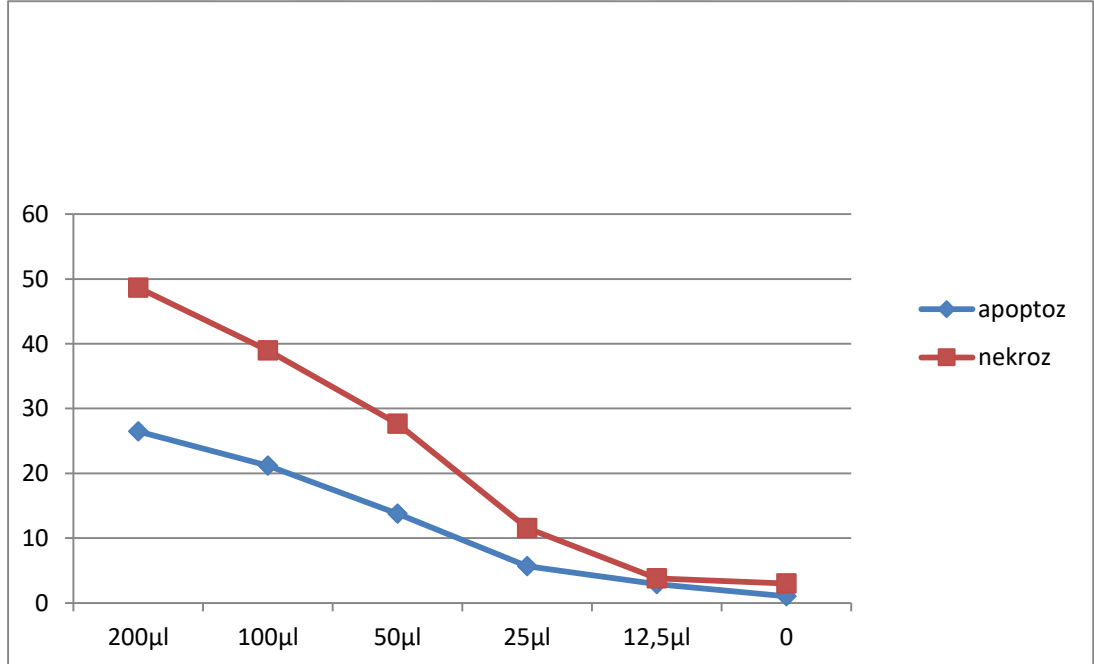


Şekil 3.15. 1/20 oranında Keçiboynuzu Özü Uygulanmış Kanser Hücrelerinde % Apoptoz-Nekroz Oranları.

Çizelge 3.23. 1/40 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları.

| 1/40- Özü - A549 | % Apoptoz | % Nekroz |
|------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 26,44 | 48,64 |
| 100 µl | 21,16 | 38,96 |
| 50 µl | 13,78 | 27,65 |
| 25 µl | 5,66 | 11,54 |
| 12,5 µl | 2,87 | 3,78 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiboynuzu özü 1/40 oranında seyreltilerek A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.23’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.16’da apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

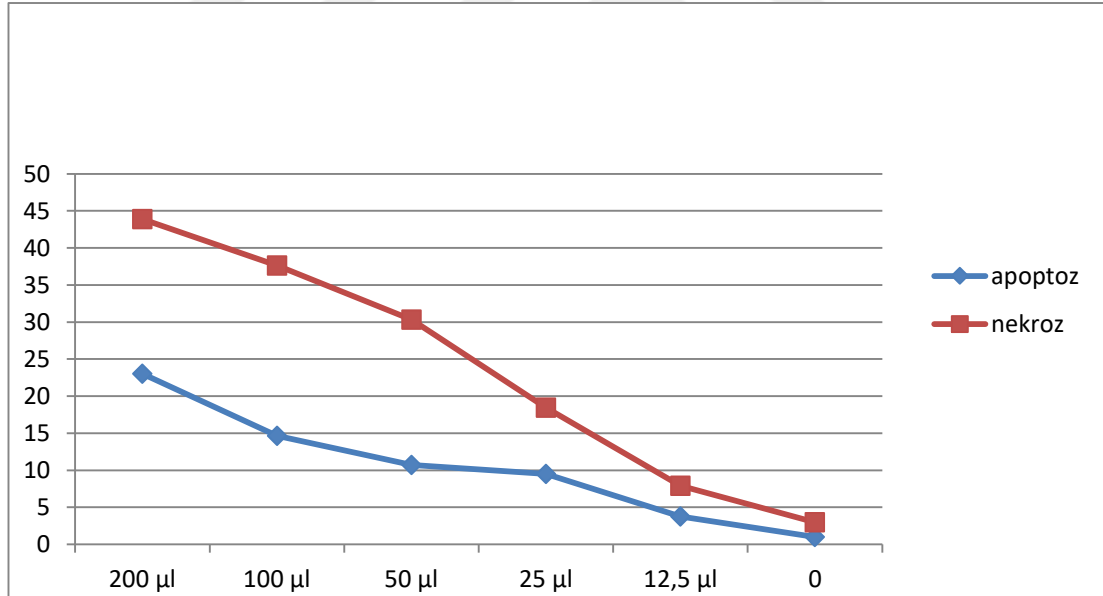


Şekil 3.16. 1/40 oranında Keçiboynuzu Özü Uygulanmış Kanser Hücrelerinde % Apoptoz-Nekroz Oranları.

Çizelge 3.24. 1/10 oranında keçiboynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları.

| 1/10 Özü - L929 | % Apoptoz | % Nekroz |
|-----------------|-----------|----------|
| 200 µl | 23,01 | 43,91 |
| 100 µl | 14,65 | 37,63 |
| 50 µl | 10,71 | 30,32 |
| 25 µl | 9,49 | 18,43 |
| 12,5 µl | 3,76 | 7,89 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiboynuzu özü 1/10 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.24’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.17’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

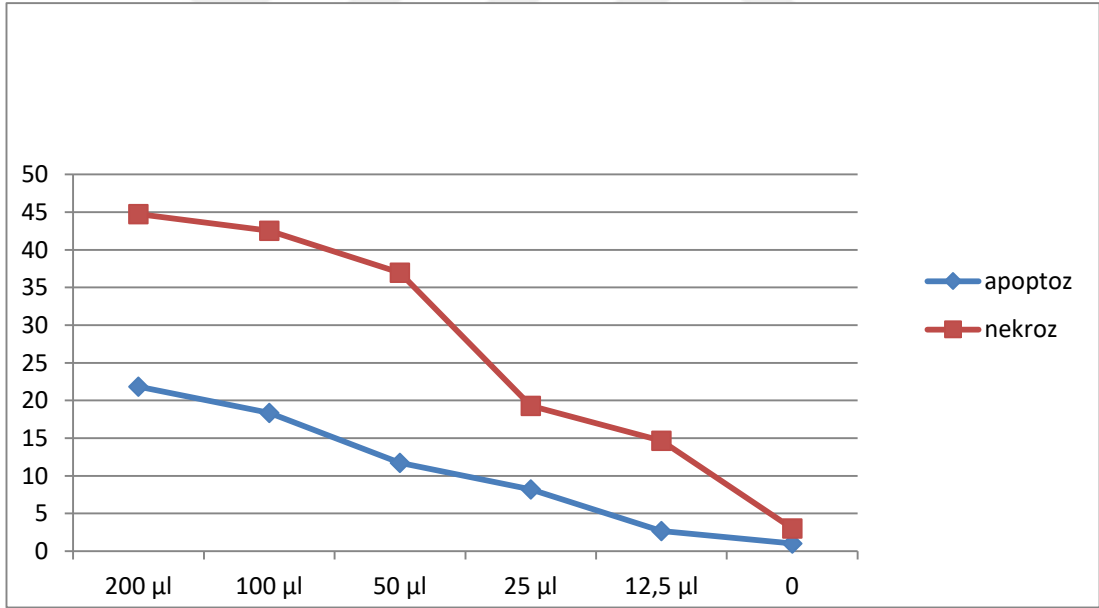


Şekil 3.17. 1/10 oranında Keçiboynuzu Özü Uygulanmış Fibroblast Hücrelerinde % Apoptoz-Nekroz Oranları.

Çizelge 3.25. 1/20 oranında keçiyoynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları.

| 1/20 Özü - L929 | % Apoptoz | % Nekroz |
|-----------------|-----------|----------|
| 200 µl | 21,86 | 44,76 |
| 100 µl | 18,36 | 42,54 |
| 50 µl | 11,74 | 36,96 |
| 25 µl | 8,21 | 19,31 |
| 12,5 µl | 2,68 | 14,67 |
| 0 | 1 | 3 |

Keçiyoynuzu özü 1/20 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.25'te gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.18'de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

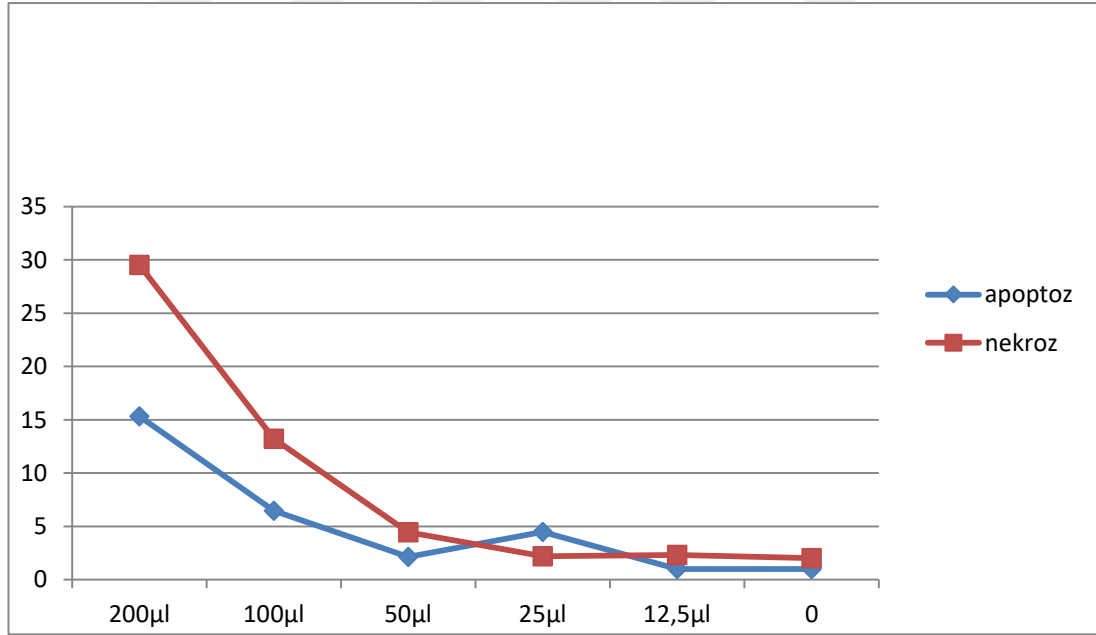


Şekil 3.18. 1/20 oranında keçiyoynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

Çizelge 3.26. 1/40 oranında keçiyoynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları.

| 1/40- Özü - L929 | % Apoptoz | % Nekroz |
|------------------|-----------|----------|
| 200 µl | 15,32 | 29,52 |
| 100 µl | 6,46 | 13,21 |
| 50 µl | 2,12 | 4,45 |
| 25 µl | 2,48 | 2,21 |
| 12,5 µl | 1 | 2,32 |
| 0 | 1 | 2 |

Keçiyoynuzu özü 1/40 oranında seyreltilerek L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.26’da gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı gözlemlendi. Şekil 3.19’da apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

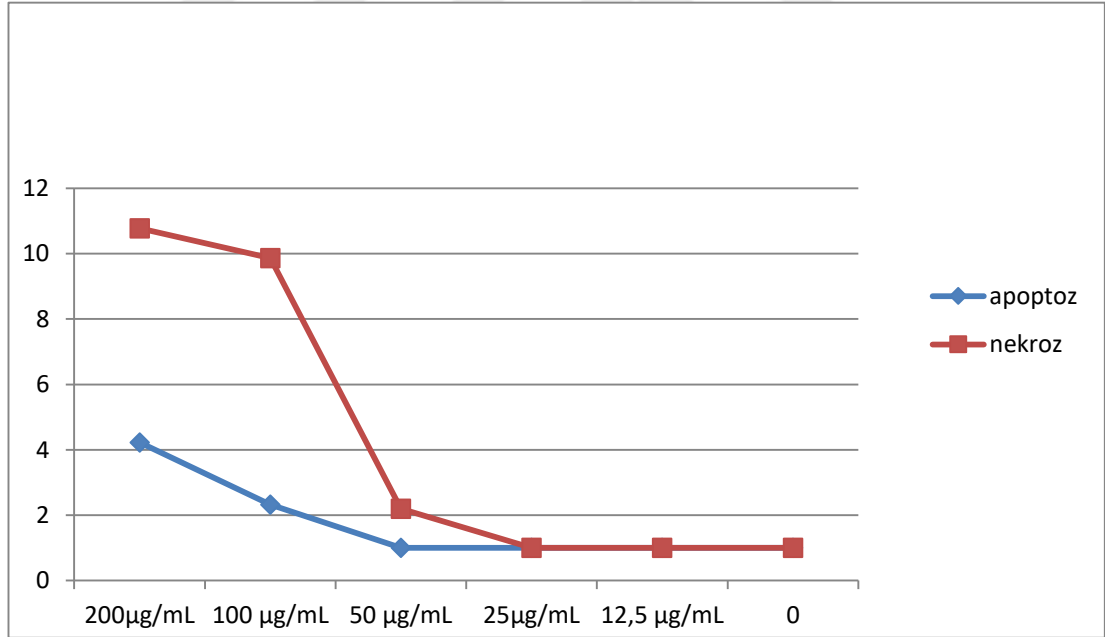


Şekil 3.19. 1/40 oranında keçiyoynuzu özü uygulanmış fibroblast hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

Çizelge 3.27. Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzunun A549 kanser hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları.

| A549-Keçiyoynuzu Meyve Ekstraktı | % Apoptoz | % Nekroz |
|----------------------------------|-----------|----------|
| 200 µg/mL | 4,22 | 10,78 |
| 100 µg/mL | 2,32 | 9,86 |
| 50 µg/mL | 1 | 2,20 |
| 25 µg/mL | 1 | 1 |
| 12,5 µg/mL | 1 | 1 |
| 0 | 1 | 1 |

Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesi A549 kanser hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.27’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekrozun arttığı fakat anlamlı bir artış olmadığı gözlenmiştir. Şekil 3.20’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.

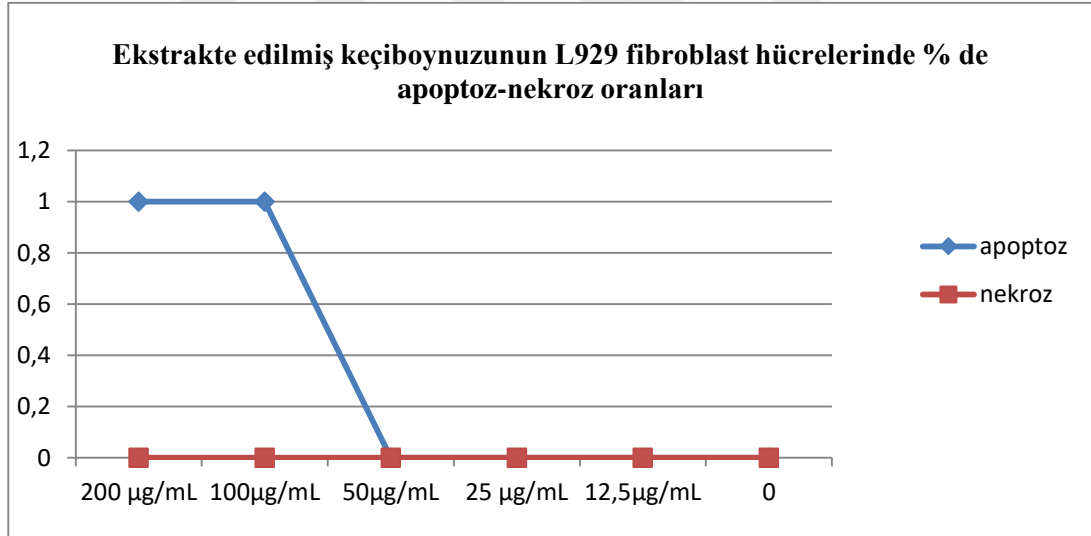


Şekil 3.20. Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesinin A549 kanser hücrelerinde % apoptoz-nekroz oranları.

Çizelge 3.28. Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesinin L929 fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları

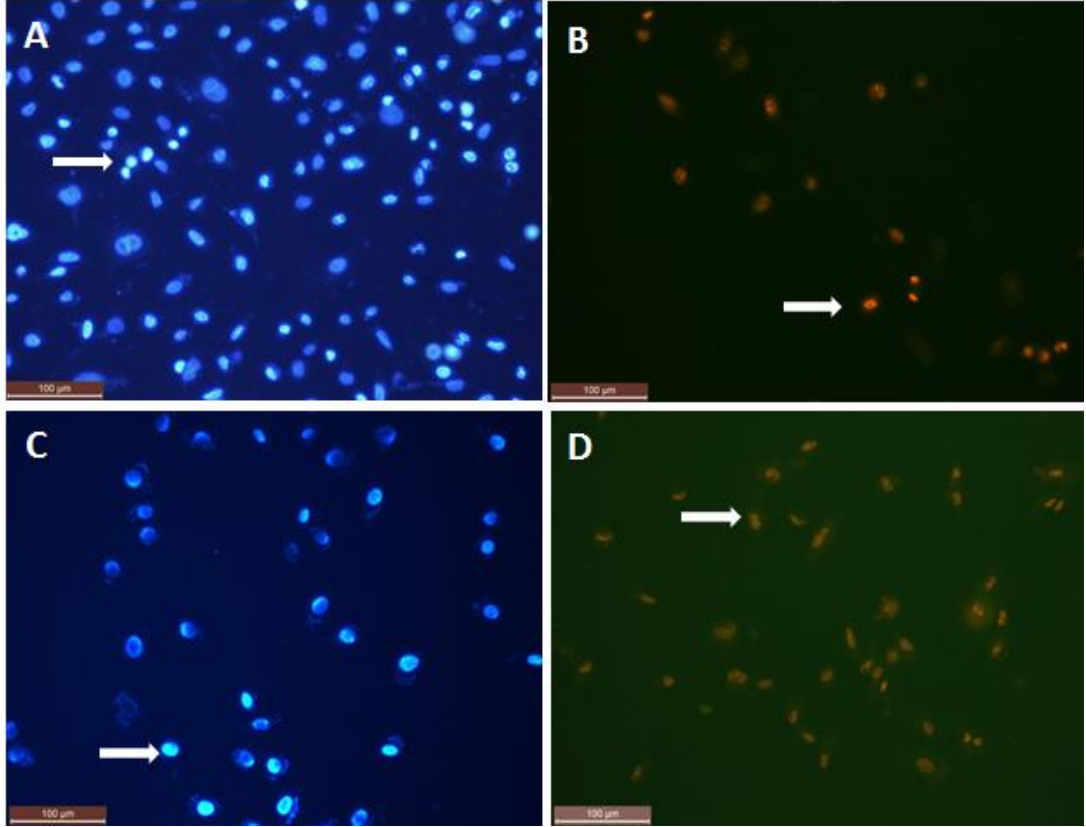
| L929-Keçiyoynuzu Meyve Ekstraktı | % Apoptoz | % Nekroz |
|----------------------------------|-----------|----------|
| 200 µg/mL | 1 | 0 |
| 100 µg/mL | 1 | 0 |
| 50 µg/mL | 0 | 0 |
| 25 µg/mL | 0 | 0 |
| 12,5 µg/mL | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |

Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu meyvesi L929 fibroblast hücrelerine verildi. Apoptoz ve nekroz sonucu Çizelge 3.28’de gösterilmiştir. Verilen pekmez miktarı arttıkça apoptoz ve nekroz değerlerinde anlamlı bir değişme olmadığı gözlenmiştir. Şekil 3.21’de apoptoz – nekroz karşılaştırılması görülmektedir.



Şekil 3.21. Ekstrakte edilmiş keçiyoynuzunun L929 fibroblast hücrelerinde % de apoptoz-nekroz oranları

Keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser ve normal hücrelerin apoptotik ve nekrotik olarak mikroskoptaki görüntüleri Şekil 3.22’de görülmektedir. Bu görüntülerde apoptotik hücre çekirdekleri parlak ve parçalı, nekrotik hücre çekirdekleri ise turuncu görünmektedir. Sağlam hücre çekirdekleri yeşil görülmektedir. Bu görüntülere göre hücrelerin apoptoz ve nekroz oranları tespit edilmiştir.



Şekil 3.22. Keçiboynuzu pekmezi uygulanmış kanser ve normal hücrelerinin örnek apoptoz nekroz görüntüleri.

- A) 200 µg/ml keçiboynuzu pekmezi (1/10 oranında syreltilmiş) uygulanmış Apoptotik fibroblast hücrelerin fotoğrafı (ok apoptotik hücreleri gösterir),
- B) 200 µg/ml keçiboynuzu pekmezi (1/10 oranında syreltilmiş) uygulanmış nekrotik fibroblast hücrelerin fotoğrafı (ok nekrotik hücreleri gösterir),
- C) 200 µg/ml keçiboynuzu pekmezi (1/10 oranında syreltilmiş) uygulanmış Apototik kanser hücrelerin fotoğrafı (ok apoptotik hücreleri gösterir)
- D) 200 µg/ml keçiboynuzu pekmezi (1/10 oranında syreltilmiş) uygulanmış nekrotik kanser hücrelerin fotoğrafı (ok nekrotik hücreleri gösterir).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanserinin Dünyadaki en yüksek insidans ve mortalite oranına sahip malign bir tümör olduğu belirtilmektedir. Uluslararası kanser araştırma ajansı verilerine göre, Dünya genelinde 2012 yılında 1.82 milyona yakın yeni akciğer kanseri vakası olduğu ve tüm malign tümörler arasında ilk sırada yer aldığı belirtilmiştir (YU ve ark. 2019).

Kanserin tedavisi amacıyla kullanılan ilaçlar noktasında farklı yaklaşımlar söz konusudur. Bu yönde yapılan bir değerlendirmede kanser ilaçları ile ilgili şu bilgiler paylaşılmıştır; konvansiyonel kanser ilaçlarının çoğu ile ilişkili ciddi yan etkilerin yanı sıra, bu ilaçların ikincil toksisitesini gösteren kanıtlar göz önüne alındığında, kanserli bireyler daha fazla doğal alternatiflere yönelmektedir. Benzer şekilde, ilaç endüstrisi kanseri tedavi etmek için doğal ürünler arayışı içindedir. Anti-kanser etkinliği bildirilen bitkisel ürünlerin çoğunda, yüksek seviyede polifenoller veya güçlü antioksidanlar bulunduğu bilgisi mevcuttur. Bitkinin antioksidan aktivitesinin, özellikle de polifenollerin, kanser önleyici ilaç keşif girişimlerinin odağı olması gerektiği yönünde yorumlanmıştır (Demain ve Vaishnav 2011).

Bu çalışmada *Ceratonia siliqua* L. (harnup) bitkisinden elde edilen üç farklı farmasötik şekil üzerinde çalışılmış ve bunların antikanser etkisi incelenmiştir. Hsauna (2011) ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada *Ceratonia siliqua* L.nin kansere karşı koruyucu etkisinin olduğunu açıklamışlardır. Elde edilen veriler belirli dozlarda, belirli aralıklarla ve kanserin belirli dönemlerinde bu bitkinin kullanılabilceğini göstermektedir.

Hsauna ve ark. tarafından yapılan çalışmada *Ceratonia siliqua* esansiyel yağının bileşimindeki yirmi beş farklı madde tespit edilmiştir. 13 bakteri ve 8 mantar suşunda agar difüzyon ve et suyu mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak antimikrobiyal değerlerine bakılmıştır. Test edilen türlere göre orta ve yüksek derecede antimikrobiyal etkisi olduğu görülmüştür. 7 °C de kıyılmış dana etine uygulanan bu yağın antimikrobiyal etkisi açık bir şekilde gözlemlendiği belirtilmiştir. Diğer yandan iki tümör hücresi olan HeLa (insan servikal kanser) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinom) üzerinde; yine bizim kullandığımız yöntem olan MTT yöntemi ile sitotoksik etkisine bakılmıştır. Özellikle HeLa hücreleri olmak üzere iki hücre

türünde güçlü inhibisyon görülmüştür. *Ceratonia siliqua L.*'nin antimikrobiyal ve sitotoksik etkisinden dolayı gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Ceratonia siliqua L.'nin, HeLa ve MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi gösterildiği bir çalışmada keçiboynuzu ürününe ait konsantrasyon arttıkça sitotoksitenin arttığı bulunmuştur (Hsauna ve ark. 2011). Yapılan bu çalışma, mevcut çalışma ile benzer sonuçlar gösterdiği görülmüştür. *Ceratonia siliqua L.*'nin farklı kanser hücre hatlarında benzer sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

Yine ülkemizde yapılan bir çalışmada (Gümüşhan Aktaş 2018); MTT yöntemi kullanılarak, keçiboynuzunun yaprak ve meyvelerinin etli kısımlarından metanol ve etanol ile hazırlanan ekstrelerin, HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 48 saat süreyle ve farklı konsantrasyonlarda (200-800 µg/mL) ekstre uygulamasının ardından canlı hücre sayıları tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre keçiboynuzunun metanolik ve etanolik yaprak ekstreleri HeLa hücrelerinin DNA sentezini inhibe ederek mitotik aktivitesini ve proliferasyonunu baskıladığı ve etanolik meyve ekstresinin HeLa hücrelerinin DNA sentezini azalttığı belirtilmiştir. Meyvelerinin bileşiminde karbonhidratlar, şekerler, selüloz, azotlu bileşikler, tanen ve sabit yağ bulunduğu belirtilmiştir. Geleneksel tıpta taze meyvelerin diüretik ve müshil; kuru meyvelerin, yapraklarının ve dal kabuklarının ise antidiyareik etkileri nedeniyle kullanımı bildirilmiştir. *Ceratonia siliqua* yaprak ve meyvelerinden hazırlanan ekstraktlar ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstraktın antimikrobiyal, antifungal ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, ayrıca apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada bu ifadeler ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, sitotoksik etkinin değerlendirilerek yeni çalışmaların geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Keçiboynuzu yaprak ve meyve ekstraktlarının fenolik antioksidanlarca zengin olduğu, sitotoksik ve antitümoral etkisinin bu bileşiklerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Karşılaştırıldığında vanilik asitin meyve ekstraktlarında daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Kateşin hidrat, floridzin dihidrat, mirisetin, bütein, naringenin, luteolin, 4-hidroksibenzoik asit ve salisilik asit yaprak ekstraktlarında meyveye göre daha yüksek oranda tespit edilmiş olup; resveratrol, gallik asit, ellajik asit ve kurmin ise meyvede daha fazla miktarda bulunmuştur. Kaempferol, olöropein,

hidroksisinnamik asit, slimarin, 2-hidroksi1,4-naftokinon, kurmin ve timokinon sadece meyve ekstraktlarında saptanmıştır. Kuersetin miktarının ise meyve ve yaprakta benzer olduğu görülmüştür. Ancak yapılan deneyler sonucunda ulaşılan bulgular bu bileşiklerden hangisi ya da hangilerinin katkı sağladığını belirleyebilmek için ek çalışmalar dizayn edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Gümüşhan Aktaş 2018, Hsauna ve ark. 2011).

Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada mikroorganizmalara karşı keçiboynuzu ektrelerinin antimikrobiyal ve sitotoksik etkisine bakılmıştır. Etanol ile hazırlanan ekstraktın güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir. Etanol, metanol ve N-heksan ile hazırlanan ekstraktların sitotoksik etki gösterdiği yorumu yapılmıştır (Kıvçak ve ark. 2002).

Keçiboynuzunun yanı sıra üzüm, narenciye, çilek, kiraz, elma, erik, şeftali, kahve, kakao ve bazı sebzeler polifenolik içeriğe sahip ana ürünlerdir. Başka bir çalışmada ise kullanılan *Ceratonia siliqua* türlerinin farklı olmasının fenolik bileşik içeriğinin değişebileceğini; buna bağlı olarak antioksidan, sitotoksik ve antitümöral özelliklerinin değişiklik gösterebileceği vurgulanmıştır. Polifenolik bileşimin farklarının bitkinin toplandığı bölgeden, bitki türünden ve hazırlama şekline kaynaklanmaktadır. Hermafrodit ağaçlardan elde edilen keçiboynuzları daha yüksek oranda polifenolik içeriğe sahiptir. Yüksek sıcaklığa maruz kalan keçiboynuzu ürünlerinin içerik bakımından olumsuz etkilendiği belirtilmiştir. Bu sebeple ekstraksiyon çözücüsü ve sıcaklığın yapılan çalışmalarda önemli olduğu belirtilmiştir (Stavrou ve ark. 2018).

Hajaji ve arkadaşları (2010), keçiboynuzu kabuğunun üç cinsi (spontan erkek, spontan dişi, aşıllı dişi) üzerinde yaptıkları çalışmada fitokimyasal bileşenlere ve antioksidan özelliklerine bakmışlardır. Metanolde ham kabuk ekstresi; özellikle spontan erkek cinsi en yüksek antioksidan aktivite gösteren ve polifenolik özellik gösteren olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile keçiboynuzu meyvesi gibi kabuklarında antioksidan aktivite gibi birçok biyolojik etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir (Hajaji ve ark. 2010).

Yapılan bu çalışmada keçiboynuzu ekstraktının uygulanan dozlarda hem normal hücrelere hem de kanser hücrelerine karşı anlamlı olacak derecede toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Keçiboynuzu özü ve pekmezinde ise kullanılan her

oran ve bu oranların farklı miktardaki uygulamalarında kanser hücrelerine karşı toksisite yüksek iken normal hücrelere ise daha düşük oranda toksik olduğu gözlenmiştir. Keçiboynuzu ekstrelerinin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu ve hücre kalitesini artırdığı tespit edilmiştir. Normal ve kanser hücrelerine keçiboynuzu özü ve pekmezi direk uygulandığında yüksek oranda toksisite tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre seyrelme oranı arttıkça, iki ayrı formda da toksisitenin düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca keçiboynuzunun fibroblastlarda toksik etkisi kanser hücrelerine göre daha yüksek çıkarken, konsantrasyon düştükçe fibroblast hücrelerinde canlılığın arttığı ve kanser hücrelerinde canlılığın azaldığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre gerek normal hücrelerde gerekse kanser hücrelerinde nekrotik ölüm apoptotik ölüme göre daha yüksek oranda elde edilmiştir. Özellikle keçiboynuzu ekstresinde apoptoz yok denecek kadar düşük elde edilmiştir. Keçiboynuzu özü ve pekmezinde apoptoz oranları bir birine yakın elde edilmiştir. Ayrıca nekroz oranı yine seyrelme oranına ve uygulanan doza bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Yüksek oranlarda nekroz yüksek elde edilirken oran düştükçe nekrozun azaldığı tespit edilmiştir. Normal hücrelerde apoptoz oranı kanser hücrelerine göre daha yüksek elde edilmiştir.

Son yıllarda sağlık konusunda bilinçli olan tüketiciler, besin tercihlerinde değişikliğe giderek vücutta özel fizyolojik etkili olan, bazı hastalıkların oluşumunu engelleyen, koruyucu, tedavi edici, ayrıca vücudun temel besin ögesi gereksinimlerini karşılayan gıdaları tercih etmektedir (Karagözlü ve Bayarer 2004)

Keçiboynuzunda bulunan potasyum, fosfor, kalsiyum gibi önemli mineraller, besinsel lifler, tanenler gibi bileşenler keçiboynuzuna fonksiyonel özellik sağlayan bileşenlerdir. Keçiboynuzu meyvesi bu özellikleri ve içerdiği yararlı bileşenlerden dolayı, fonksiyonel bir gıdadır. Ülkemizde, tamamen doğal yollardan yetişen keçiboynuzu meyvesi bu açıdan ele alındığında, çekirdekleri ayrıldıktan sonra kalan meyve kısmı çok yaygın bir kullanım alanına sahip değildir. Ülkemiz şartlarında keçiboynuzu bitkisinin kolay yetişmesi ve işlenmesi nedeniyle; özellikle akciğer kanseri gibi olgularda alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebileceği; konuyla ilgili kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

AHRAZ A, (2003) Locust Bean Gum (keçiboynuzu zankı) E-410'un Türkiye'de Üretimi. Gıda Teknolojisi, 7, s.36-37.

AKSİT S, ÇAĞLAY S, CUKAN R, YAPRAK (1998), "Carob Bean Juice: a Powerful Adjunct to Oral Rehydration Solution Treatment in Diarrhoe", Pediatric and Perinatal Epidemiology, 12: 176-181

ANONİM (2016a). Keçiboynuzu. Erişim: [www.cine-tarim.com.tr/dergi/arsiv57/sektorel05.html], Erişim Tarihi: 06.06.2016.

ANONİM (2016b). Keçiboynuzu. Erişim: [http://keciboynuzu-rehberi.blogspot.com.tr/2009/05/keciboynuzu.html], Erişim Tarihi: 06.06.2016.

ANONİM (2016c). Keçiboynuzu Planları Hazır. Erişim: [http://www.iha.com.tr/haber-keciboynuzu-planlari-hazir-400986/], Erişim Tarihi: 06.06.2016.

ANONİM (2016d). Beş Bin Yıllık Mucize İlaç Keçiboynuzu. Erişim: [http://www.hakaynasi.com/nazan-basogul/821/bes-bin-yillik-mucize-ilac-keciboynuzu-nazan-basogul-tabiati-ecza-as-ha.aspx], Erişim Tarihi: 06.06.2016.

ANONİM (2017a). How Cancers Grow. Erişim: [https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts] Erişim Tarihi: 17.06.2019.

AVALLONE R, PLESSI M, BARALDİ M, MONZANI A (1997), Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua* L.): protein, fat, carbohydrates, and tannins. J. Food Compos. Anal., 10: 166-172.

AYAZ FA, TORUN H, AYAZ S, CRREIA PJ, ALAIZ M, SANZ C, GRUZ J, STRNAD M, (2007) "Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds", Journal of Food Quality, 30, : 1040-1055.

AYDIN G (2007) Türkiyede sık karşılaşılan hastalıklar II, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 58, 141-152

AYDIN S, (2011), Keçiboynuzu Meyvesinden Sürülebilir Bir Ürün Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

BATTLE I, TOUS J, (1997) Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.

BATU A, KARAGOZ DD, KAYA C, YILDIZ M, (2007)“Dut ve harnup pekmezlerinin depolanması süresince bazı kalite değerlerinde oluşan değişimler”, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2: 7-16,.

BENGOECHEA C, ROMERO A, VİLLANUEVA A, MORENO G, ALAİZ M, MİLLAN F, GUERRERO A, PUPPO MC (2007) “Composition and Structure of Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) Germ Proteins”, Food Chemistry, 107: 675-683.

BİNER B, GUBBUK H, KARHAN M, AKSU M, PEKMEZCİ M (2007) “Sugar profiles of the cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey”, Food Chemistry, 100: 1453-1455.

ÇAKIR Ş, (2009) Keçiboynuzundan Pestil Üretimi ve Kalitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

DAKİA PA, WATHELET B, PAQUOT M (2006), “Isolation and Chemical Evaluation of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Seed Germ”, Food Chemistry, 102: 1368-1374.

DEMAIN AL, VAISHNAV P (2011) Natural products for cancer chemotherapy, Microbial Biotechnology 4(6), 687–699.

DEMİRTAŞ Ö (2007), Keçiboynuzu (*Ceratonia Siliqua* L.) Çekirdeklerinden Gam Üretim Yollarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

EKŞİ A, ARTIK N (1986) Harnup (Keçiboynuzu) Meyvesi ve Pekmezinin Kimyasal Bileşimi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, 36(1): 77- 82.

GÜBBÜK H TOZLU İ DOĞAN A BALKIÇ R (2016) Çevre, Endüstriyel Kullanım ve İnsan Sağlığı Yönleriyle Keçiboynuzu, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 21(2):207-215

GÜMÜŞHAN AKTAŞ H (2018) Keçiboynuzu ekstrelerinin insan servikal kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri,Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 15(3):199-206

HAJAJİ HE, LACHKAR N, ALAOUİ K, CHERRAH Y, FARAH A, ENNABİLİ A, BALİ BE, LACHKAR M (2010) Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco, Arabian Journal of Chemistry 4, 321–324

HALLİWELL B, GUTTERIDGE JMC (1999). Free Radical in Biology and Medicine. Oxford Science Publication. Oxford, NY.

HENİS Y, TAGARİ H, VOLCANI R (1963),”Effects of Water Extracts of Carob pods, Tannic Acid, And Their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms”, Applied Microbiology, 12 : 204- 209.

HİRAYAMA T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *BMJ (Clin Res Ed)*.1981; 282: 183-5.

HSOUNA AB, TRİGUİ M, MANSOUR RB, JARRAYA RM, DAMAK M, JAOUA S (2011) Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in mincedbeef meat, *International Journal of Food Microbiology* 148: 66–72

JANSSEN-HEIJNEN ML, COEBERG JW (2003) The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer.*; 41: 245-58.

KARABABA E, ISİKLİ DN (2005), Pekmez A Traditional Concentrated Fruit Product, *Food Reviews International*, 21:4, 357-366.

KARABULUT A, CANBOLAT O, KAMALAK A (2006) “ Evaluation of carob. *Ceratonia siliqua* pods as a feed for sheep”, *Livestock Research for Rural Development*, 18 (7).

KARAGÖZLÜ C, BAYARER M (2004) Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(2), 197-207.

KARKACIER M, ARTIK N (1995) “Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları”, *Gıda*, 20(3): 131- 136.

KAYA C, YILDIZ M, HAYOĞLU İ, KOLA O (2005) Pekmez Üretim Teknikleri, GAP VI. Tarım Kongresi, 1482-1490.

KIVÇAK B MERT T ÖZTÜRK HT (2002) Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts 26:197-200

MORTON JF, (1987) Carob, 10. Fruits of Warm Climates. (Julia F. Morton) Miami, FL. 65-69.

OWEN RW, HAUBNER R, HULL WE, ERBEN G, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H, HABER B, (2003) Isolation and Structure Elucidation of The major Individual Polyphenols in Carob Fibre, *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1727-1738.

PARKİN DM, BRAY F, FERLAY J, PİSANİ P (2005)Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*; 55: 74-108. 20.

PLOWRIGHT TR (1951) The Use of Carob Flour (Arobon) in a Controlled Series of Infant Diarrhoea, *J. Pediatr*, 39, 16-21.

RTİBİ K, SELMİ S, GRAMİ D, AMRİ M,ETO B,EL-BENNA J, SEBAİ H, MARZOUKİ L (2017) Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review,Biomedicine & Pharmacotherapy 93:522–528

SHAWAKFEN KQ, EREİFEJ KI (2005) “Pod characteristics of two *Ceratonia siliqua* L. varieties from Jordan”, Italian Journal of Food Science, 17(2): 187- 194.

SİLVESTRİ GA, LİTTENBERG B, COLİCE GL (1995) The clinical evaluation for detecting metastatic lung cancer. Am J Respir Crit Care Med. ;152:225-30.

SPIRO SG, PORTER JC (2002) Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Respir Crit Care Med.;166:1166- 96.

STAVROU IJ, CHRİSTOU A, KAPNİSSİ-CHRİSTODOULOU CP (2018) polyphenols in carobs: a review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact, food chemistry 269:355–374

STEWART BW, WİLD CP (2014) World cancer report, International Agency for Research on Cancer World Health Organization 978-92-832-0443-5

ŞENAY F (2009) Keçiboynuzu’ndan Sıvı Şeker Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ŞENGÜN M, ERTUGAY MF, YÜKSEL Y (2007) Rheological Characteristic of Carob, International Journal of Food Properties, 10, 39-46.

ŞİMŞEK A, ARTIK N, BAŞPINAR E (2004) Detection of Raisin Concentrate (Pekmez) Adulteration by Regression Analysis Method, Journal of Food Composition and Analysis, 17, 155-163.

TEMİZ MA (2011) Etil Alkol İle Oluşturulan Oksidatif Stresli Sıçanlarda Keçiboynuzu Çekirdeği’nin (*Ceratonia siliqua* L.) Karaciğer Koruyucu ve Antioksidan Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

TERZİOĞLU G,KESİN AÜ,YANIKKAYA DEMİREL G (2013) Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması Turkish Journal of Immunology 1(3):74-89

TUNALIOĞLU R, ÖZKAYA MT, (2003) “Keçiboynuzu”, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış Dergisi, 3: 1-4.

USLUER O, ÖRS KAYA Ş (2017) Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi,Türkiye Klinikleri J Thor Surg-Special Topics. 2017;8(1):34-8.

VEHBİ V (1991) *Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyetinin Yabani Çiçekleri ve Tıbbi Bitkileri*, KKTC Milli Eğitim ve Kültür Bakanlığı Yayınları-20, Ankara; Sistem Ofset.

YILMAZ MY (2009) Keçiboynuzu Suyu Üretim Teknolojilerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

YOUSİF AK, ALGHZAWİ HM (2000) "Processing and characterization of carob powder ,," Food Chemistry ,69:283-287.

YU DJ, LI YH, ZHONG M, (2019) LncRNA FBXL19-AS1 promotes proliferation and metastasis via regulating epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 23: 4800-4806.

YÜKSEL GY, TÜRLEG S, CİVELEKOĞLU H (1992), Keçiboynuzunda Bulunan Şekerlerin İncelenmesi, Gıda Mühendisliği Kongresi, İzmir, 27 Nisan- 1 Mayıs, 96-105.

ZUNFT HJF, LÜDER W, HARDE A, HABER B, GRAUBAUM H. J, KOEBNİCK C, GRÜNWALD J (2003) "Carob Pulp Preparation Rich in Soluble Fibre Lowers Total and LDL Cholesterol in Hypercholesterolemic Patients", Eur J Nutr, 42: 235-242.

Özgeçmiş

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Furkan
Soyadı : GÜREL
Doğum yeri ve tarihi : Çankırı- 30.09.1989
Uyruğu : T.C.
Medeni durum : Bekar
Askerlik durumu : Yaptı
E-mail : furkangurel@yahoo.com
İletişim : 0318 333 22 11
Cep : 0506 133 9045

II. Eğitim : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

III. Ünvanlar : Eczacı

IV. Mesleki Deneyim : 6 Yıl

V. Üye Olduğu Bilimsel Kurumlar : -

VI. Bilimsel İlgi Alanları : -

VII. Bilimsel Etkinlikler : -

Aldığı burslar : -

Projeler : -

Seminerler : -

Katıldığı Bilimsel Toplantılar : -

VIII. Diğer Bilgiler : -

Düzenlediği Bilimsel Faaliyetler : -

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası : -