

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(DOKTORA TEZİ)**

**KL21 KODLU POLİHERBAL FORMÜLASYONUN
ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE TOKSİSİTE
POTANSİYELİ**

Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM

Danışman: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.00

Sunum Tarihi: 15.05.2015

Bornova – İzmir

2015

Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM tarafından Doktora tezi olarak sunulan “*KL21 Kodlu Polih herbal Formülasyonun Anti-kanser Etkilerinin in vitro ve in vivo Yöntemlerle Belirlenmesi ve Toksisite Potansiyeli*” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.05.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri :

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Raportör Üye : Prof. Dr. Cemal ÜN

Üye : Doç. Dr. Nesrin Ebru GÖNCÜ

Üye : Yard. Doç. Dr. Devrim Demir DORA

Üye : Yard. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “*KL21 Kodlu Poliherbal Formülasyonun Anti-kanser Etkilerinin in vitro ve in vivo Yöntemlerle Belirlenmesi ve Toksisite Potansiyeli*” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15.05.2015

Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM

ÖZET**KL21 KODLU POLİHERBAL FORMÜLASYONUN ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE TOKSİSİTE POTANSİYELİ**

KÖKSAL KARAYILDIRIM, Çinel

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
Mayıs 2015, 221 sayfa

Tümör hücrelerinde anjiyogenezin inhibisyon ve apoptozun indüksiyonu kanser tedavisinin en yeni stratejilerinden biridir. Bu nedenle proapoptotik aktiviteye sahip anjiyogenik inhibitörlerin keşfi, kanser tedavisinde dikkate değer bir öneme sahip olmaktadır.

Bu amaçla tez çalışması, bir polihherbal formülasyon olan KL21’in anti kanser ajanı olabilecek bir farmasötik ürüne dönüşebilmesi için yapılması gereken araştırmaları ve uygulanması gereken yöntemleri ortaya koymak amacıyla dizayn edilmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle formülasyonun etanol ve metanol ekstraktlarının total fenolik, flavonoid içeriği ile antioksidan kapasitesi kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi kapsamında, DPPH radikali süpürme kapasitesi ile ABTS renksizleştirme yöntemleri kullanılarak antioksidan kapasite tespit edilmiştir. Ayrıca MIC metodu ile metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Toksisite testleri kapsamında hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş, MCF-7, HEK-293 ve HeLa hücre hatlarında LD₅₀ değeri tespit edilmiştir. Ekstrelerin AMES testi ile genotoksik etki görmediği belirlenmiştir. Akut toksisite testi ile “LD₅₀ değeri $\geq$ 2000 mg/kg” şeklinde sonuç elde edilmiş olup 28 gün süren subakut toksisite çalışmasına geçilmiştir. Bu çalışmanın sonunda, hematolojik ve biyokimyasal veriler sağlanmış, histopatolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Formülasyonun anti-kanser özelliği belirlemek amacı ile Ehrlich tümör modeli ile farelerde solid tümör oluşturulmuş, KL21 pos-implantasyon grubunda tümör hacminde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca “Real Time Ready Human Apoptosis Panel” ile apoptoz mekanizmasıyla ilişkili yaklaşık 84 genin ekspresyon profilleri incelenmiştir. Çalışmaların

devamında formülasyonun HET-CAM metodu ile 900 mg/kg ve 600 mg/kg doz gruplarında anti-anjiyogenik potansiyeli ortaya konulmuştur. “Cyto Select Kit” ile hücre migrasyon denemesi gerçekleştirilmiş, yara kapanma yüzdesi % 28 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Anti-Kanser Etki, Anti-Anjiyogenik Etki, Apoptoz, Hücre Kültürü, Toksisite, Poliherbal Formülasyon

ABSTRACT

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF ANTICANCER EFFECTS OF KL21 POLYHERBAL FORMULATION AND ITS TOXICITY POTENCY

KARAYILDIRIM KÖKSAL, Çinel

Ph.D. in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

2015 May, 221 pages

Inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis are two of the latest strategies for cancer treatment. The discovery of novel angiogenic inhibitors with proapoptotic activities is therefore extremely crucial for opening up new avenues in this area.

The present study is designed to provide a step-by-step methodology for evaluating a polyherbal formulation (KL21) for its potential as an anticancer agent that may later be developed into a pharmaceutical product.

In this regard, as the first step, the total phenolic flavonoid content and antioxidant capacity of ethanol and methanol extracts of KL21 were determined with chromatographical and spectrophotometrical methods. DPPH and ABTS assays were utilized for the estimation of antioxidant capacity in both extracts. Additionally, MIC method was also carried out and the methanolic extract showed better antimicrobial activity. In cytotoxicity tests, MCF-7, HEK-293 and HeLa cell lines were used for calculating LD₅₀ value. Extracts showed no genotoxic effect according to AMES test. Following the acute toxicity test which resulted in an LD₅₀ value of ≥ 2000 mg/kg, a 28-day subacute toxicity test was conducted. At the end of this study, hematological and biochemical parameters were obtained and histopathological analyses were performed. Anticancer efficacy of KL21 was investigated on Ehrlich ascites tumor model. Tumor volumes were found to be decreased in post-implantation group of KL21 polyherbal formulation. The profiles of 84 genes involved in various apoptotic pathways were investigated via “Real Time Ready Human Apoptosis Panel”. In another stage of the study, anti-angiogenic potencies of 900 mg/kg and 600 mg/kg dose groups were exhibited using the HET-CAM method. “Cyto Select Kit” was used in cell migration experiments and percent wound closure was calculated as 28%.

Keywords: Anti-cancer effect, anti-angiogenic effect, apoptosis, cell culture, toxicity, polyherbal formulation

TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans ve doktora tezlerimde hocam, iş yaşamında danışmanım, özel hayatımda yol göstericim...

12 yıl süren İzmir maceramın sonlanmasına izin vermeyen, şuan bildiğim her şeyi kendisinden öğrendiğim ve desteğini her zaman hissettiğim...

Prof. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'na sonsuz teşekkürler...

İyi ki varsınız...

Tez çalışmamı, 2012-Fen-067 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Polih herbal Formülasyonlar	2
1.2. Polih herbal Formülasyonların Biyolojik Aktiviteleri ve Anti-Kanser Etkileri.....	3
1.3. Hücre Ölümü ve Kanser.....	7
1.3.1. Programlı hücre ölümü	7
1.3.2. Tümör anjiyogenezi.....	9
1.4. KL21 Polih herbal Formülasyonunun İçeriğinde Bulunan Bitkiler ve Özellikleri.....	10
1.4.1. <i>Achillea millefolium</i> Linn. (Civanperçemi).....	11
1.4.2. <i>Urtica dioica</i> Linn. (Isırgan Yaprağı)	12
1.4.3. <i>Equisetum arvense</i> Linn. (At Kuyruğu)	14
1.4.4. <i>Thymus vulgaris</i> Linn. (Kekik).....	15
1.4.5. <i>Viscum album</i> Linn. (Ökse Otu).....	16
1.4.6. <i>Acorus calamus</i> Linn. (Eğir Otu)	17
1.4.7. <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn. (Biberiye).....	18
1.4.8. <i>Solidago virgaurea</i> Linn. (Altınbaşak).....	20
1.4.9. <i>Silybum marianum</i> Linn. (Devedikeni)	21
1.4.10. <i>Curcuma longa</i> Val. (Zerdeçal).....	23
1.4.11. <i>Lavandula stoechas</i> Linn. (Karabaş Otu).....	24
1.4.12. <i>Fumaria officinalis</i> Linn. (Şahtere).....	25
1.4.13. <i>Taraxacum officinale</i> Linn. (Kara Hindiba).....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.4.14.	<i>Cichorium intybus</i> Linn. (Hindiba).....	26
1.4.15.	<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Zencefil).....	27
1.4.16.	<i>Peganum harmala</i> Linn. (Üzerlik).....	28
1.4.17.	<i>Juniperus communis</i> Linn. (Ardıç)	29
1.4.18.	<i>Nigella sativa</i> Linn. (Çörek Otu)	30
1.4.19.	<i>Hypericum perforatum</i> Linn. (Kantaron).....	31
1.4.20.	<i>Valeriana officinalis</i> Linn. (Kedi Otu)	32
1.4.21.	<i>Melissa officinalis</i> Linn. (Melisa).....	33
2.	MATERYAL VE METOT.....	34
2.1.	Materyal.....	34
2.1.1.	Poliherbal formülasyon.....	34
2.1.2.	Analizlerde kullanılan kimyasallar ve kitler	34
2.1.3.	Deney hayvanları	34
2.2.	Metot	36
2.2.1.	Total fenolik ve flavonoid içeriğın belirlenmesi.....	36
2.2.2.	Biyolojik aktivitenin belirlenmesi	37
2.2.3.	Toksisite testleri	40
2.2.4.	Antikanser etkinin değeriendirilmesi.....	50
2.2.5.	İstatiksel değeriendirme	65
3.	BULGULAR	66
3.1.	Total Fenolik ve Flavonoid İeriğın Belirlenmesi	66
3.1.1.	Spektrofotometrik yöntem	66
3.1.2.	Kromatografik yöntem - GC-MS ile ierik analizi.....	66
3.2.	Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi	68
3.2.1.	Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	68
3.2.2.	Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	69
3.3.	Toksisite Testleri Sonuçları.....	70
3.3.1.	<i>In vitro</i> sitotoksisite testi sonuçları	70

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.2. <i>In vitro</i> genotoksik etkinin belirlenmesi	74
3.3.3. <i>In vivo</i> akut toksisite testi sonucu	85
3.3.4. <i>In vivo</i> subakut toksisite testi sonuçları	85
3.4. Anti-kanser Etkinin Değerlendirilmesi	101
3.4.1. <i>In vitro</i> apoptotik etkinin belirlenmesi	101
3.4.2. Anti-anjiyogenik etkinin belirlenmesi	139
3.4.3. <i>In vivo</i> Ehrlich Ascites tümör modeli	144
4. TARTIŞMA	163
5. SONUÇ	187
KAYNAKLAR DİZİNİ	188
ÖZGEÇMİŞ	221

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 GC-MS Cihazının Özellikleri	37
2.2 MIC Metodunda Kullanılan Mikroorganizmalar.....	39
2.3 KL21 Poliherbal Formülasyonunun Maruziyet Dozları	41
2.4 Maruziyet Dozuna Bağlı Hücre Canlılığının Hesaplanması	42
2.5 <i>Salmonella typhimurium</i> Suşlarının Genotipleri ve Özellikleri	43
2.6 Kofaktör Çözeltilerinin Hazırlanışları	44
2.7 Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	45
2.8 Template-Primer Karışımının Hazırlanması.....	52
2.9 Revers Transkriptaz (RT) Karışımının Hazırlanması.....	53
2.10 İnsan Apoptotik Panel Analizinde Kullanılan Plaka Şablonu	54
2.11 İnsan Apoptotik Panel İçerik Detayı.....	54
2.12 PCR Karışımının Hazırlanması	56
2.13 LightCycler® 480 Cihaz Çalışma Protokolü.....	57
2.14 $\Delta\Delta CT$ Değerinin Belirlenmesi.....	58
2.15 Karşılaştırmalı CT Metodu ile Kat Değişimi Hesaplanması	58
2.16 Yara İyileşme Modeli İşlem Basamakları	59
2.17 HET-CAM Değerlendirilmesinde Kullanılan Skor Değerleri.....	60
2.18 Tümör Hacminin Hesaplanması	62
3.1 Total Fenolik ve Flavonoid Sonuçları	66
3.2 Etanol Ekstresinin İçeriğinde Yer Alan Başlıca Bileşikler.....	66
3.3 Metanol Ekstresinin İçeriğinde Yer Alan Başlıca Bileşikler.....	67
3.4 DPPH İnhibisyon Sonuçları.....	69
3.5 % ABTS ⁺ İnhibisyonu Sonuçları.....	69
3.6 Minimum İnhibisyon Sonuçları.....	70
3.7 Hücre Çoğalmasının İnhibe Olduğu IC ₅₀ Değerleri	71
3.8 Revertant Koloni Sayıları (<i>S.typhimurium</i> TA 98).....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.9 <i>S. typhimurium</i> TA 98 Mutajenite Denemesinin Sonuçları	75
3.10 Revertant Koloni Sayıları (<i>S.typhimurium</i> TA 100)	77
3.11 <i>S. typhimurium</i> TA 100 Mutajenite Denemesinin Sonuçları	78
3.12 Revertant Koloni Sayıları (<i>S.typhimurium</i> TA 1535)	80
3.13 <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Mutajenite Denemesinin Sonuçları	80
3.14 Revertant Koloni Sayıları (<i>S.typhimurium</i> TA 1537)	82
3.15 <i>S. typhimurium</i> TA 1537 Mutajenite Denemesinin Sonuçları	83
3.16 2000 mg/kg Doz Uygulamada Analiz Durdurma Kriterleri	85
3.17 Erkek Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları.....	86
3.18 Dişi Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları	86
3.19 Erkek Farelerin Organ Ağırlık Ortalamaları.....	86
3.20 Dişi Farelerin Organ Ağırlık Ortalamaları.....	87
3.21 Erkek Farelerin Rölatif Organ Ağırlıkları.....	87
3.22 Dişi Farelerin Rölatif Organ Ağırlıkları.....	87
3.23 Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları (Dişi).....	88
3.24 Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları (Erkek).....	89
3.25 Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları (Dişi).....	89
3.26 Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları (Erkek).....	90
3.27 Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları (Dişi).....	91
3.28 Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları (Erkek).....	91
3.29 Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları (Dişi).....	92
3.30 Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları (Erkek).....	92
3.31 Hücre Hatlarının Total RNA İzolasyon Sonuçları.....	101
3.32 Hedef Gen için Belirlenen Kat Değişimi Değerleri	102
3.33 İnsan Apoptotik Yolak Gen Ailelerinin Sınıflandırılması	105
3.34 Yara İyileşme Modeli Sonuçları	140

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.35 Migrasyon Oranı.....	140
3.36 Anti-Anjiyogenik Skorelama Sistemi Sonuçları	141
3.37 Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları.....	145
3.38 Ehrlich Ascites Tümör Modeli Sonuçları	146
3.39 Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları.....	147
3.40 Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları.....	148
3.41 Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları.....	149
3.42 Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları.....	149

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Deney Hayvanlarının Tutulduğu Kafesler.....	35
3.1 KL21 Polihherbal Formülasyonun Etanol Ekstresinin GC-MS Kromotogramı	67
3.2 KL21 Polihherbal Formülasyonun Metanol Ekstresinin GC-MS Kromotogramı	68
3.3 A549 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre Kontrol b. DMSO	72
3.4 Caco-2 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre Kontrol b. DMSO.....	72
3.5 MCF-7 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre Kontrol b. DMSO c. KL21 Polihherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi Maruziyeti.....	72
3.6 HeLa Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre kontrol b. DMSO c. KL21 Polihherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi Maruziyeti.....	73
3.7 HEK-293 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre kontrol b. DMSO c. KL21 Polihherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi Maruziyeti d. Metanol Ekstresi Maruziyeti.....	73
3.8 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşu (-S9)	76
3.9 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşu (+S9)	76
3.10 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşu (-S9)	76
3.11 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 98 Suşu (+S9)	77
3.12 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 100 Suşu (-S9)	78
3.13 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 100 Suşu (+S9)	79
3.14 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 100 Suşu (-S9)	79
3.15 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA100 Suşu (+S9)	79
3.16 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşu (-S9)	81
3.17 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşu (+S9)	81
3.18 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 1535 Suşu (-S9)	81
3.19 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA1535 Suşu (+S9)	82
3.20 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 1537 Suşu (-S9)	83
3.21 Etanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 1537 Suşu (+S9)	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.22 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA 1537 Suşu (-S9).....	84
3.23 Metanol Ekstresi <i>S. typhimurium</i> TA1537 Suşu (+S9).....	84
3.24 Dişi Kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha), interlobular safra kanalları (isk) ve sinüzoidler (s) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ax20, Bx100.....	93
3.25 Dişi 300 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk), Hepatositler (hp) ve sinüzoidler (s) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Cx20, Dx100.	94
3.26 Dişi 600 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha), interlobular safra kanalları (isk) ve sinüzoidler (s) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ex20, Fx100.....	95
3.27 Dişi 900 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. Büyütme Gx20, Hx100.....	96
3.28 Erkek kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ax20, Bx100.	97
3.29 Erkek 300 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk) ve Hepatositler (hp) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Cx20, Dx100.....	98
3.30 Erkek 600'lük grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ex20, Fx100.....	99
3.31 Erkek 900 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Gx20, Hx100....	100
3.32 TNF Domaini Gen Ailesi Elemanlarının Kat Değişim Oranları.....	107

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.33 TNF ve Ölüm Domaini Gen Ailesinin Kat Değişim Oranları.....	112
3.34 TRAF Gen Ailesi Elemanlarının Kat Değişim Oranları.....	114
3.35 BCL ₂ Aile Üyelerinin Pro-Apoptotik, Multi-BH (BH123) Domaini İçeren Elemanlarını Kodlayan Genlerinin Kat Değişim Oranları	116
3.36 BCL ₂ Aile Üyelerinin Pro-Apoptotik, BH (BH3) Domaini İçeren Elemanlarını Kodlayan Genlerinin Kat Değişim Oranları	119
3.37 BCL ₂ Ailesinin Anti-Apoptotik Genlerinin Kat Değişim Oranları	121
3.38 NF-KB Sinyal Yolağı Genlerinin Kat Değişim Oranları	123
3.39 Pro-survival PTEN Sinyal Yolağı Genlerinin Kat Değişim Oranları.....	125
3.40 Pro-survival STAT Sinyal Yolağı Genlerinin Kat Değişim Oranları.....	127
3.41 DNA Fragmentasyonunda Görev Alan Genlerinin Kat Değişim Oranları..	129
3.42 Başlatıcı Kaspazların Gen Ekspresyonu Kat Değişim Oranları	130
3.43 Efektör Kaspazların Gen Ekspresyonu Kat Değişim Oranları	132
3.44 İnflamatuar Kaspazların Gen Ekspresyonu Kat Değişim Oranları.....	134
3.45 Kaspaz Regülatör Genlerinin Ekspresyonu Kat Değişim Oranları	136
3.46 Apoptoz İnhibitör Genlerinin Ekspresyonu Kat Değişim Oranları	138
3.47 24 Saat Sonunda Boyama Yapılmamış Alanların Görüntüsü A. Kontrol Grubu (% 0,1) B. KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi (5 mg/mL)	139
3.48 48 Saat Sonunda Giemsa Boyama Yapılmış Alanların Görüntüsü A. Kontrol Grubu (% 0,1) B. KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi (5 mg/mL)	139
3.49 48 Saat Sonunda DAPI Boyama Yapılmış Alanların Görüntüsü A. Kontrol Grubu (% 0,1) B. KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi (5 mg/mL)	140
3.50 HET-CAM Negatif Kontrol Grubu	142
3.51 HET-CAM DMSO Çözgen Kontrol Grubu.....	142
3.52 HET-CAM Pozitif Kontrol Grubu.....	142

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

3.53 HET-CAM 900 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Metanol Ekstresi	142
3.54 HET-CAM 900 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Etanol Ekstresi .	143
3.55 HET-CAM 600 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Metanol Ekstresi	143
3.56 HET-CAM 600 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Etanol Ekstresi .	143
3.57 HET-CAM 300 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Metanol Ekstresi	143
3.58 HET-CAM 300 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Etanol Ekstresi .	144
3.59 Tümör Kontrol Grubu	144
3.60 Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça kompaktlaşmış tümör dokusunu saran diğer gruplara göre azalmış stromal dokuda (s) lökosit infiltrasyonu (i) ve çok sayıda hemorajik damar izlenmektedir (v). tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Ax4, Bx100.....	151
3.61 Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre azalmış nonkompakt tümör dokusu içerisinde ve etrafındaki stromal doku (s) içerisinde daha az sayıda damar (v) ve yoğun lökosit infiltrasyonu (i) görülmektedir (v). tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Cx4, Dx100.....	152
3.62 KL21 pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre daha az yaygın kompakt tümör dokusu görülmektedir. Daha az sayıda damar (v) ve artmış lökosit infiltrasyonu (i) görülmektedir. s: stromal doku; tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Ex4, Fx100.	153
3.63 KL21 post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre daha az yaygın kompakt tümör dokusu görülmektedir. Damar (v) ve stromal doku (s) ile çevrilmiş ve artmış lökosit infiltrasyonu (i) görülmektedir. tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Gx4, Hx100.....	154

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 3.64** Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça az sayıda apoptotik hücreler görülmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Ax20, Bx100..... 155
- 3.65** Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler yoğun bir şekilde tümör dokusu içerisinde izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Cx20, Dx100..... 156
- 3.66** KL21 pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Ex20, Fx100..... 157
- 3.67** KL21 post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Gx20, Hx100..... 158
- 3.68** Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça yoğun ve yaygın VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Ax10, Bx40..... 159
- 3.69** Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre azalmış VEGF ekspresyonu görülmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Cx10, Dx20..... 160
- 3.70** KL21 pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Ex10, Fx40..... 161
- 3.71** KL21 post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Gx10, Hx40. 162

1. GİRİŞ

İnsanlar bitkileri binlerce yıldır ilaç olarak kullanmaktadır. Günümüzde, bitkilerin çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanımlarının yanı sıra, yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde de bitkisel türevli bileşikler önemli kaynaklar olarak kabul edilmektedir (Rehman et al., 2015). Gelişen spektral yöntemlerle, bitkilerde bulunan sekonder bileşiklerin yapılarının aydınlatılması ve biyoaktivitelerinin araştırılması sonucu, çok sayıda bitkisel kaynaklı farmasötik ürün, özellikle alternatif tedavide yerini almıştır (Özdemir and Alpınar, 2015). Bu bileşikler, tedavisi zor olan kanser gibi hastalıklarda sitotoksik ve kanseri engelleyici etkileri de kapsayan farmakolojik özelliklerinden ötürü dikkate değer bir öneme sahip olmuşlardır (Mishra et al., 2011). Özellikle son yıllarda doğal kaynaklı ilaçlarla tedaviye yönelimin artması ile birlikte bu konuda yapılan araştırmaların ivme kazandığı görülmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan bir çok ilaç, hızlı atılım, zayıf etki ya da yüksek parçalanma ve direnç indüksiyonu gibi birçok sınırlamadan ötürü yetersiz kalmaktadır. Kanser tedavisinde bu sınırlamaların bulunmadığı yeni ilaçların taranması ve uygulamaya konması çok büyük önem taşımaktadır. Hasta ölümlerinin en büyük sebebi, konvensiyonel tedavilerle apoptoza karşı kazanılmış direnç ve organlara metastazdır. Bu yüzden de kanser hastalarının yaşam sürelerini uzatabilecek yeni tedavilerin geliştirilmesine acil ihtiyaç bulunmaktadır (Valaderes et al.,2009). Tümör hücrelerinde anjiyogenezin inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu kanser tedavisinin en yeni stratejilerinden biridir. Proapoptotik aktiviteye sahip anjiyogenik inhibitörlerin keşfi, kanser tedavisinde dikkate değer bir öneme sahip olmaktadır. Bu tez çalışmasının hedefi, daha önce yapılan tek bir çalışma ile kanser üzerine etkinliği sınırlı olarak gösterilmiş bir polihierbal formülasyonun antikanser ajanı olabilecek bir ürüne dönüşebilmesi için yapılması gereken araştırmaları ve uygulanması gereken yöntemleri belirlemek ve böyle bir polihierbal ürünün güvenli kullanımı ile birlikte anti-kanser etkinliğini ortaya koymaktır.

Bu amaç doğrultusunda, yirmi bir tıbbi bitkinin karışım halinde ekstre edilmesiyle hazırlanan KL21 kodlu polihierbal formülasyonun, total fenolik ve flavonoid içeriğinin ortaya konması, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle proapoptotik ve anti-anjiyogenik etkilerinin saptanması amaçlanmaktadır. Ayrıca farelerde Ehrlich solid tümör modeli oluşturularak formülasyonun tümör hacmi üzerine etkilerinin ortaya konması hedeflenmektedir. Bununla birlikte KL21polihierbal formülasyonunun *in*

vitro mutajenik etkisi ile *in vivo* toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması, terapötik olabilme potansiyeli olan bu maddenin güvenli kullanılabilmesi konusunda da veriler elde edilmesini sağlayacaktır.

Poliherbal formülasyonlar, birçok bitki ya da bitki ektresinin karışımından oluşmaktadır. Sayısız poliherbal formülasyon, geleneksel olarak birçok hastalığın tedavisinde başarılı olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden, bu tip formülasyonların geliştirilme aşamasında ve standardizasyonu sırasında kalite kontrolü sağlamak için, formülün içeriğinin belirlenmesi ve biyolojik aktivitesinin ortaya konması aşamalarında basit ve hassas yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece bu tip formülasyonların bir farmasötik ürüne dönüşmesinin yolu açılacak ve güvenle kullanım olanağı yaratılmış olacaktır.

1.1. Poliherbal Formülasyonlar

Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam sürdürmeyi hedefleyen insan için en büyük yardımcı, ilaçlardır. Kullanılan ilaçlara bağlı olarak uzayan insan yaşamı ve gelişen teknolojiler yeni hastalıkların fark edilmesine neden olmuştur. Bu durum sentetik ilaçların yetersiz kaldığı, bir çok yan etki ile birlikte zayıf bağışıklık sistemi gibi sorunların ortaya çıktığı kimyasal ilaç tüketimine destekleyici ürünler aramaya teşvik etmiştir (Kong et al., 2006). Bilindiği gibi hastalıkların tedavisi için ilaç geliştirilmesinde yüzyıllardır en önemli kaynak doğanın kendisidir. İnsanlar, tarih boyunca bitkileri en önemli gıda maddesi olarak tercih etmişlerdir. Bununla birlikte bitkilerin ilaç olarak kullanılmaları öncelikle, doğal olarak yetişen bitkilerden yararlanma şeklinde başlamıştır. İnsanlık tarihinin bilinen en eski doğal tedavi yöntemlerinden olan fitoterapi (Bitkiler ile tedavi), bitkilerin tamamının veya bazı bölümlerinin kullanılması yoluyla hazırlanarak elde edilen doğal ilaçlarla hastalıkları önlemeyi ve tedavi etmeyi amaç edinmiştir (Sarışen ve Çalışkan, 2005).

Bugün elimizde olan kanıtlar, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin çok eski çağlardan beri; Şamanizm inanışından köklü kültürlere kadar (Mezopotamya, Mısır, Çin ve Hindistan) uzanan bir süreçte kullanıldığını göstermektedir. Eski uygarlıklardan biri olan Sümerlerin 5000 yıl öncesinde çamur tabletler üzerine yüzlerce tıbbi bitki adlarını yazarak kayıt altına aldıkları bilinmektedir (Lust, 2000). 1873 yılında Alman romancı ve Mısır bilimi uzmanı George Maurice Ebers tarafından bulunan ve 20 metreden uzun olan “Ebers papirüsü” (M.Ö. 1550) tıp metinlerini derlemesi bakımından önem taşımaktadır. Bu papirüste birçok bitkisel karışımın reçetesi yer almaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011). M.Ö. VI.

yüzyılda yaşamış olan Pisagordan, Yunan Hekim Hippokrates'in yazdığı "*Corpus Hippocraticum*" ile birlikte Aristoteles, Theophrastus, Pedanius Dioscorides gibi birçok filozof, hekim ve bilimadamı çeşitli tıbbi bitkileri tanımlamış ve hastalıkların tedavisinde kullanımları ile ilgili bilgiler vermişlerdir. Bu tarihi kanıtlar yıllar öncesine dayanan hastalıklar ile ilgili bilgilerin yanı sıra bitkisel formülasyonlar ve onların etki mekanizmalarına ilişkin önemli bilgiler ortaya koymaktadır (Üstün, 2003).

Modern botanik bilimindeki gelişmeler ışığında, son yıllarda birçok bitki karışımından oluşan formülasyonların üretimi de ivme kazanmıştır. Bütün bu bitkisel preparatlar sahip oldukları biyolojik aktiviteleri nedeniyle farmakolojik değere sahiptirler. Bu durum dikkate alındığında bitkisel tedavinin desteklenmesi ve yeni herbal formülasyonların keşfi, hastalıkların tedavisinde, ayrıca sağlığın uzun vadeli korunmasında önemli rol oynamaktadır (Rafter, 2002; Gonzales and Valerio, 2006).

1.2. Polih herbal Formülasyonların Biyolojik Aktiviteleri ve Anti-Kanser Etkileri

Birçok bitki karışımından oluşan polih herbal formülasyonlar, çok sayıda biyoaktif birleşik içermektedir. Ayrıca sentetik ilaçlara göre biyoyararlanımları yüksek olmasının yanı sıra yan etki bakımından kullanımları oldukça güvenlidir (Kleinwächter et al., 2015). Özellikle, son yıllarda artan kanser gibi tedavisi zor ve zaman alıcı hastalıkların iyileştirilmesinde yardımcı, bazen de alternatif maddeler oldukları görülmektedir (Kang et al., 2007; Valadares et al., 2009; Rehman et al., 2013). Kemoterapi, radyoterapi ve ameliyat gibi konvansiyonel tedavilerin yan etkileri, uzun iyileşme süreçleri ve çoklu ilaç direnci oluşumu gibi bir çok majör faktör gözönüne alındığında, özellikle polih herbal formülasyonların kullanımına yönelimdeki artışın dikkate değer olduğu görülmektedir (Kong et al., 2006).

Kanser, yüzlerce farklı dokunun birbirinden farklı moleküler mekanizmalarla ortaya çıkmış proliferatif, invazif ve agresif yapıli hastalıkların tümü için kullanılan bir terim olmakla birlikte, tüm dünya ve ülkemizde en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Konu ile ilgili olarak 2011 yılında yayınlanan Global Kanser İstatistikleri ışığında 12.007.000 kanser vakası kayıt altına alınmışken, belirlenen kanser vakalarından yaklaşık 7.000.000'ü, kanser teşhisi konulduktan sonra hayatını kaybetmiştir (Jemal et al., 2011). 2014 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Dünya Kanser Raporunda ise kanser, dünya çapında ana morbitite ve mortalite nedeni

olarak gösterilmiş, yaklaşık 14.000.000 yeni vaka kaydı arasında 8.000.000'lük bir kanser teşhis sonrası ölüm oranı saptanmıştır (Stewart and Wild, 2014).

Kanser genellikle, kontrolsüz büyüme, yeni damarların oluşması (anjiyogenez), anormal hücrelerin yayılması (metastaz) ve bir programlanmış hücre ölümü olan apoptozun bozulması ile karakterize edilen, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliğidir. Kanser gelişimi çok kompleks bir süreçtir ve bu süreçte bireysel hücreler ve çevresel faktörler birçok genetik değişimin oluşmasına sebep olmaktadır ve tüm dünyadaki ölümlerin ikinci sıradaki sebebi çeşitli kanser türleri olduğu bildirilmiştir (Madhusudan and Middleton, 2005). Dünya Sağlık Örgütü, her yıl 10 milyondan daha fazla yeni kanser olgusunun oluşacağını bildirilmiş olup, istatistiki veriler 2020 yılında bu rakamın ikiye katlanacağına dikkati çekmektedir (Mignogna et al., 2004).

Kanser tedavisinde kullanılan birçok ilaç, yan etki göstermesi, ilaç direnci oluşturması gibi birçok sınırlamadan ötürü yetersiz kalmaktadır. Kısa biyolojik yarılanma ömrü gibi zayıf farmakokinetik de bu ilaçların klinik etkinliklerini sınırlamaktadır (Kong et al., 2006). Aynı sınıftaki tümörler arasında bile yüksek derecede moleküler varyasyon bulunmaktadır. Bu nedenle her bir tümörün bireysel olarak tedavi edilmesi ve her hastanın da kendine uygun tedaviyi alması gerekmektedir. Son 20 yılda geliştirilen birçok kanser ilacı, hedefe yönlü tedavi gerçekleştirmesine rağmen bazı kanser türlerinde başarı oranında değişme gözlenmemiştir. Bu nedenlerden ötürü kanser tedavisinde bu sınırlamaların bulunmadığı yeni ilaçların taranması ve uygulamaya konması çok büyük önem taşımaktadır. Hasta ölümlerinin en büyük sebebi, konvensiyonel tedavilerle apoptoza karşı kazanılmış direnç ve organlara metastazdır. Bu yüzden de kanser hastalarının yaşam sürelerini uzatabilecek yeni tedavilerin geliştirilmesine acil ihtiyaç bulunmaktadır.

Bitkisel türevli bileşikler, her zaman çeşitli hastalıkların tedavisi için önemli bir ilaç kaynağı olmuştur (Mishra et al., 2011). Yeni keşfedilen doğal kaynaklı anti-kanser ajanlar, yüksek biyoaktif bileşikler içermelerinden ötürü tedavilerde hedef oluşturmaktadırlar (Rafter, 2002; Gonzales and Valerio, 2006). Literatürler dünya çapında görülen yaygın kanser vakalarında doğal ürünlerin, kimyasalların zararlı etkilerine karşı koruyucu ajanlar olduklarını göstermektedir. Bu doğal ürünlerin büyük bir çoğunluğu güçlü antioksidandır ve doğal ortamlarında fenol içeren bitkilerden oluşmaktadır; diğerleri ise farklı işlevsel grup içeren koruyucu niteliklere sahip olanlardır (Nogueira et.al., 2008; Kunimasa et.al., 2009; Li et.al.,

2011). İnsan vücudunda biyolojik moleküller tarafından oluşturulan oksidatif hasar, içsel koruma sistemini yavaşlatmakta ve özellikle kanser gibi hastalıkların dejeneratif ve patolojik proseslerinde ortaya çıkmaktadır. (Bergendi et al., 1999). Son 10 yılda yapılan bir çok epidemiyolojik çalışmalarda, bu gibi hastalıklardan korunma ya da bu hastalıkların baskılanmasında dışsal antioksidan alımının etkinliği kanıtlanmıştır (Block et.al, 1992; Singh and Downing, 1995). Antioksidan olarak rol oynadığı bilinen fenolik bileşikler, bitkilerin sekonder metabolitleridir (Oh et al., 2015). Bunlar, hücresel ve fizyolojik seviyelerde oksidasyondan etkili bir koruma sağlayabilmekte ve anti-kanser etki ortaya koymaktadırlar (Larson, 1988; Cuvrelier et al., 1992). Başka bir sekonder metabolit olan flavanoidler de fenolik bileşiklerin bir grubudur ve içerisinde anti-tümör aktivite de bulunan bir çok biyolojik etkiye sahiptirler (Morel et al., 1993; Middleton and Kandswami, 1994; Van Acker et al., 1996). Son yıllarda fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri tedavi ajanı olarak çok fazla ilgi çekmektedir.

Çoğu mevcut bitkisel kaynaklardan türevlendirilmiş anti-kanser ilaç, hücreye sitotoksik etki ederek apoptozun aktivasyonuna neden olmakta ve farklı hücresel yollarda rol oynayarak tedavi sağlamaktadır (Kang et. al., 2007; Valadares et al., 2009). Herhangi bir ilaç ya da bitki ekstrelerinin anti-kanser özelliği taşıması için sahip olması gereken ilk özellik, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesini sağlamaktır (Denicourt and Dowdy, 2004; Taşkın et al., 2009). Hücre zarının bütünlüğü korunurken sitoplazmik yoğunlaşma, apoptotik cisimciklerin oluşumu, DNA fragmentasyonu, membran simetrisinde bozulma, kaspaz enzim kaskadının aktivasyonu ve mitokondiyal membran potansiyelinin kaybolması apoptozun en önemli özelliklerindendir. Apoptoz, kanseri engellemek kadar kemoterapiyi de kapsayan kanser tedavisinde en önemli hedeflerden biridir (Hseu et al., 2004; Thippeswamy and Salimath, 2006; Choedon et al., 2011; Horii et al., 2012). Bitkisel kökenli formülasyonlar geliştirilirken dikkat edilmesi gereken önemli etkilerden biri olan apoptozun indüksiyonu, kanser ile mücadelede inovatif gelişmelerden biri olarak sayılabilir. Bu bağlamda polih herbal formülasyonların pro-apoptotik ya da anti-apoptotik etkilerini belirlemek, kanser tedavisine yeni bir ivme kazandıracaktır.

Kanser durumunun yol açtığı patolojik bir durum olan tümörler, büyüebilmek ve metastaz yapabilmek için kan kaynağına ihtiyaç duyarlar. Tümör büyümesinin anjiyogeneze bağlı olduğu kabul edilmektedir. Anjiyogenez ise önceden var olan damarlardan yeni vasküler kapiller kanalların oluşmasıdır. Kanser hücrelerinin, anjiyogenik büyüme faktörleri salgıladıkları bilinmektedir. Özellikle kanser hastalarının serum ve idrarındaki bu faktörlerin seviyesi

hastalığın durumu ile korelasyon göstermektedir (Yabushita et al., 2003). Bu anjiyogenik faktörler arasında VEGF (vascular endothelial growth factor-vasküler endotel büyüme faktörü) en iyi karakterize edilmiş olandır (Ferrara et al., 2003). VEGF, bir endotelial hücre spesifik mitojendir ve anjiyogenez için önemli olayları aktive etmektedir. Ayrıca, yeni damar oluşumunu teşvik ederek kanserin büyümesi ve metastazında önemli rol oynamaktadır (Terman and Stoleto, 2001). Bununla birlikte birçok tümörün anjiyogenezden bağımsız olduğu bilinmektedir. Tümör hücrelerine direkt olarak sitotoksik olmayan anjiyogenez inhibitörlerinin uygulanmasının tümör hücre apoptozunu arttırabilirken VEGF üretimini azaltabildiği gözlenmiştir. Bu inhibitörler ya endotelial hücre proliferasyonunu ve büyüyen tümörü besleyen yeni kılcalların oluşumunu inhibe ederek ya da tümör ve/veya endotelial hücre apoptozunu indükleyerek tümör büyümesini geriletmektedirler (Folkman 2003).

Anti-anjiyogenik tedavi, kanser tedavisinin en aktif olmasa bile aktif alanlarından birini teşkil etmektedir. Konunun çekiciliği, tümörün hipoksiye verdiği tepki sonucunda tümör anjiyogenezinin tetiklenmesinden kaynaklanmaktadır. Anjiyogenezin engellenmesi, oksijen ve besin kaynağının kesilmesi aracılığıyla tümörün büyümesini durdurduğundan, tümör anjiyogenezini kanser terapisi için yeni hedefler sağlamaktadır. Anti-anjiyogenik terapinin, sitotoksik kanser ilaçlarının sık sık görülen ağır yan etkilerini taşımadığı düşünülmektedir. Ayrıca anti-anjiyogenik terapinin, sadece başlıca tümör dokularını yok etmediği aynı zamanda tümör metastazını da durdurduğu düşünülmektedir (Sills et.al., 1998; Lin et al., 2003; Su et al., 2005; Kumar et al., 2009; Kim et al., 2011; Piyaviriyakul et al., 2011).

Bütün bu etkilerin yanı sıra konvensiyonel ilaçların çeşitli klinik araştırmalar ile ortaya çıkan yan etkileri, herbal formülasyonların güvenli kullanımına dikkati çekmektedir. Bitkisel kaynaklı bütün bu ürünlerin etkinliğinin yanı sıra, kısa veya uzun süreli kullanımlarda yol açabileceği etkilerde dikkate alınmalıdır. Bu kapsamda yapılacak pre-klinik çalışmalar ve toksikolojik testler standardize edilmiş ürünlerin kalite kontrolü hakkında da kanıt oluşturacaktır.

Kanser tedavisinin en yeni stratejilerinden birinin tümör hücrelerinde anjiyo-inhibisyon ve apoptozun indüksiyonu olduğu düşünülürse proapoptotik aktiviteye sahip anjiyogenik inhibitörlerin keşfi önemli bir terapötik değer sağlayacaktır. Kuvvetli proapoptotik ve anti-anjiyogenik etkili bitkiler bulunması amacıyla model olarak yirmi bir farklı bitki türünden oluşan KL21 polih herbal formülasyonun anti kanser ajanı olabilecek potansiyeli araştırılmış ayrıca ürünün

güvenli kullanımının ortaya konması amacıyla çeşitli toksikolojik testler gerçekleştirilmiştir.

1.3. Hücre Ölümü ve Kanser

1.3.1. Programlı hücre ölümü

Programlı hücre ölümü, normal hücrelerin hayatta kalmasını sağlarken, bu programdaki herhangi bir aksama, hücrenin kansere dönmesindeki anahtar kilit nokta olarak tanımlanır (Laubenbacher et al., 2009; Khan et al., 2014). Programlı hücre ölümü, apoptoz, otofaji ve programlı nekrozis olmak üzere 3 temel formdan oluşmaktadır. Her bir yolağın kendine özgü hücresel morfolojik farklılıklar oluşturması, bu üç formun birbirlerinden ayırt edilmelerini sağlamaktadır (Ouyang et al., 2012).

Apoptoz diğer adıyla “Tip I programlı hücre ölümü” Kerr et al. tarafından tanımlanan ilk mekanizmadır. Ölen hücredeki özgül morfolojik ve biyokimyasal değişimler ile karakterize edilir. Genel olarak öncelikle hücreler büzüşür, nüklear kondensasyon belirgindir, hücre zarındaki tomurcuklanma ve komşu hücreler ya da hücre dışı matrik ile tutunma kaybı dinamik bir şekilde ayırt edilebilir. Biyokimyasal değişimler olarak da kromozomal DNA’nın içsel nükleosomal fragmentlere ayrılması, fosfatidilserin eksternalizasyonu ve diğer birçok hücre içi substratların proteolizis aracılı parçalanması belirgindir (Cohen et al., 1994; Martin and Green, 1995). Normal doku gelişim ve homeostazisinde esansiyel bir işlem olan apoptoz; hasar görmüş, doku içerisinde tutunamamış, mutant ya da yaşlanmış hücrelerin eliminasyonundan sorumlu fizyolojik bir olgudur. Bu yolla oluşan herhangi bir hasar ise kanser, dejeneratif ve otoimmün ilişkili birçok hastalığın oluşmasına neden olur (Prindull, 1995; Meier et al., 2000). Kaspaz proteinleri, sistein-aspartik asit spesifik proteaz sınıfı enzimler olarak apoptotik yolağın temel bileşenleridir (Wong, 2011). Sistem, hücreyi iki farklı sinyal aktarım yolağı aracılığı ile ölüme götürebilir. Mitokondri aracılı, hücre içi yapısal sinyal yolağı intrinsik apoptotik yolak olarak adlandırılırken, ölüm reseptörleri aracılı gerçekleştirilen sinyal iletim süreci ekstrinsik apoptotik yolak üzerinden yönlendirilir. Sürecin sonunda, ölü hücre bileşenleri apoptotik cisimcikler şeklinde paketlenir ve komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından tanınarak, fagositosiz ile temizlenir (Jin and El-Deiry, 2005).

Hücresel apoptosiz öncül hayatta kalım sinyallerini içeren karmaşık regülatif bir iletişim ağı ile kontrol edilir. Bu apoptotik regülasyonun ortadan

kalkması, gelişim bozuklukları, otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon ve kanser gibi birçok patolojik bozukluklara neden olabilir. Bu nedenle apoptosiz sürecinin ve düzenlenmesindeki araçların belirlenmesi, etkileşim yollarındaki gen regülasyonunun anlaşılması temel araştırma konuları arasında yerini alır. Yapılan çalışmalar ile elde edilen bulgular, kanser gibi immortal hücrelerin etken olduğu patolojik bozuklukların oluşturduğu hastalıklar için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemlidir. Etkili terapötik geliştirme çalışmaları da bu konu üzerine yoğunlaşmıştır (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005; Jin and El-Deiry, 2005; Sankari et al, 2012; Kalimuthu and Se-Kwon, 2013; Khan et al.,2014).

Çeşitli dışsal sinyaller intrinsik ve ekstrinsik olarak adlandırılan iki temel apoptotik yolağı başlatabilir. Ölüm sinyali olarak algılanan ligandların Fas ve Tümör Nekrotik Faktör Reseptörü (TNF-R) gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlanmasını içeren dışsal sinyaller, ekstrinsik yolak aracılı apoptosizin başlatılmasına neden olur. Ölüm ligandlarının reseptörlere bağlanması, reseptör olimerizasyonunun uyarılması ile sonuçlanır. Olimerizasyon ile bir adaptör protein olan FADD (Fas-ilişkili ölüm domaini) ve kaspaz-8 proteini aktive edilerek yolağa katılır ve DISC olarak adlandırılan ölüm-indüklü sinyalleme kompleksi oluşturulur. DISC'deki kaspaz-8'in otoaktivasyon aracılı kendini aktive etmesi sonucu hücre ölüm programının efektörleri olarak görevli kaspaz-3, -6, ve -7 gibi diğer bileşenlerin aktivasyonu gerçekleştirilir (Ashkenazi and Dixit, 1998; Wong 2011).

Radyasyon, kimyasal madde maruziyeti, büyüme faktörlerinin eksikliği ya da oksidatif stres gibi faktörlerle indüklenen DNA hasarı ise içsel sinyaller olarak algılanır ve mitokondri aracılı intrinsik yolağın başlatılmasını tetikler (Green et al., 2004). Mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımı, bir kaspaz kaskadını aktive eder. Sitosolik sitokrom c, APAF1 (Apoptosis Proteaz-Aktive Edici Faktör 1) ve prokaspaz-9'a bağlanarak 'apoptozom' adı verilen, intraselüler DISC benzeri bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'un aktive edilmesi ve aktif kaspaz-3'ün oluşturulmasını sağlayan bir komplekstir (Liu et al.,1996; Zou et al., 1997; Shi, 2002; Wong 2011; Rehman et al., 2013). Apoptozun bu iki yolağı, aktif kaspaz-3 oluşturma noktasında birleşir ve diğer önemli proteaz ve nükleazlar programlı hücre ölümünü sonlandırırlar. Apoptozun son adımında hücre apoptotik cisimciklere ve fagositlere paketlenir. Sürecin bu bölümünde apoptotik hücreler, komşu hücreleri üzerine çekici sinyaller gönderir. Bu sinyallerden bir tanesi fosfatidilserin sinyavidir. Fosfatidilserin normal koşullarda hücre membranının sitoplazmaya bakan kısmında yer alırken, hücre apoptosiz sürecine girdiğinde membranın dış yüzeyinde açığa çıkar. Bu değişim ile fagositosiz reaksiyonu

tetiklenir (Ashkenazi and Dixit, 1998; Savill and Fadok, 2000; Shi, 2002; Wong 2011).

Otofaji ya da Tip II programlı hücre ölümü otofagozomların oluşturulması ile başlayan, evrimsel olarak korunmuş katabolik bir süreçtir. Genel olarak büyüme faktörü eksikliği ya da besinsel kıtlık gibi hücresel stres koşullarında, stres koşullarının hücre içindeki akümüasyonu sonucu otofajik hücrenin kendi infazını sağlaması, otofajiyi diğer hücre ölüm yollarında ayıran bir özelliktir (He and Klionsky, 2009; Eisenberg et al, 2009; Bialik et al., 2010; Huett et al., 2010). Tip III olarak tanımlanan programlı nekrosiz de hücrenin şişmesi, organel disfonksiyonu ve hücre lisiz süreçlerini takip eden diğer bir kontrollü ölüm yolağıdır (Leist and Jaattela, 2001; McCall, 2010).

Programlı hücre ölümünün bu üç formu, malignan neoplastik hücrelerin kaderine yön veren özgüllükleri nedeni ile günümüz anti-kanser çalışmalarının odak noktası haline gelmişlerdir. Hücre içerisindeki ölüm sinyallerinin belirlenebilmesine yönelik moleküler çalışmaların ışığında, bu üç ölüm formunun ayırt edilebilmesi, yeni anti-kanser terapötik stratejilerinin geliştirilmesinde önemlidir (Ouyang et al., 2012). Günümüz anti-kanser fitoterapötik oluşturma girişimlerinde de apoptosiz, öncelikli olarak dikkat çeken programlı hücre ölüm tipidir.

1.3.2. Tümör anjiyogenezi

Tümörler ister primer ister sekonder olsun büyümek için yeni kan damarlarının oluşumuna ihtiyaç duyarlar. Eğer kan sağlanmazsa bir tümör yaklaşık 106 hücre ve 2 mm çapında bir küre halini alıncaya kadar büyüebilir. Bu noktada yeterli besini sağlamak amacı ile tümör yüzeyindeki hücrelerin bölünmesi ve tümörün iç kısmındaki ölümü arasında bir denge kurulur (Lodish et al., 2011-1111 p). Tümörün yayılması kanser hücrelerinin tümör vaskülarizasyonuna yönelik yeni kan hücrelerinin sentezini arttırması ve tümöre oksijen ve besin sağlaması sonucu kolaylaşır. Bu şekilde tümör hücreleri anjiogenez ve büyüme faktörlerini üretirse metastaz kolaylaşır. Fizyolojik bir süreç olan anjiogenez mevcut vasküler oluşumlardan yeni vasküler yapıların oluşması (vaskülogenez) anlamına gelmektedir ve embriyo gelişiminin temel olaylarından birisidir (Durukan ve ark., 2008).

Anjiogenez dinamik ve karışık bir olay olup neovasküler kan akımının sağlanması birbirlerine bağımlı bir seri olay sonucu oluşmaktadır. Süreç, kapilleri

çevreleyen bazal membranda lokal yıkım olayı ile başlamakta ve bunu endotelial hücrelerin anjiyogenik uyarı yönünde etraftaki stromaya invazyonu izlemektedir. Ardından endotelial hücrelerin migrasyonunu, endotel hücre proliferasyonu ve yeni kan damarlarının oluşumu gibi oluşumlar birbirini takip etmektedir (Demirer ve ark.,2012). Vaskülogenez, primitif damar oluşumudur ve endotel hücre prekürsörleri (öncüleri) olan anjiyoblastlardan farklılaşmaktadır. Anjiyoblastlar çoğalıp birleşerek öncül damar yapıları olan primer kapiller pleksusu oluştururlar (Paulo et al., 2012). Birçok tümör anjiogenezi uyarıcı büyüme faktörleri üretir. Diğer tümörler ise etraflarını çevreleyen diğer normal hücrelere benzer faktörleri sentezletir ve salgılatır. Pek çok tümör tarafından salgılanan bazik fibroblast büyüme faktörü (Bfgf), transforme edici büyüme faktörü (TGFalfa) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörler anjiyogenik özelliktedir. Oluşan yeni kan damarları büyüyen tümörü besler, tümör boyutunun artmasını sağlar ve yeni zararlı mutasyonların ortaya çıkma olasılığını arttırır (Lodish et al., 2011-1112 p).

Kanser tedavisinde, anjiyogenez inhibisyonuna sebep olan, anjiyogenez mekanizmasını tetikleyecek ve kemoterapötik ajanların yerine kullanılabilecek bitkisel türevli formülasyonların üretilmesi önem taşımaktadır. Bu formülasyonlar, kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyerek etki göstermekle birlikte hızla büyüyen kapiller yatağının küçülmesi ile tümör hücreleri lizise uğramasına sebep olmaktadır (Ataergin vd., 1999). Ayrıca anti-anjiyogen tedavi, konvansiyonel sitotoksik tedavileri aksine kesintisiz uzun süreli bir tedaviyi gerektirse bile ilaçlara karşı direnç gelişimi ve yan etkilerin görülme sıklığında azalma gibi avantajları da beraberinde getirmektedir (Ataergin vd., 1999).

1.4. KL21 Polih herbal Formülasyonunun İçeriğinde Bulunan Bitkiler ve Özellikleri

Naturin Doğal Ürünler İlaç ve İlaç Hammaddeleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi tarafından standardize edilip çalışma boyunca tarafımıza sağlanan ve KL21 olarak adlandırılan polih herbal karışım, *Achillea millefolium* Linn. (Civanperçemi), *Urtica dioica* Linn. (Isırgan yaprağı), *Equisetum arvense* Linn. (At kuyruğu), *Thymus vulgaris* Linn. (Kekik), *Viscum album* Linn. (Ökse otu), *Acorus calamus* Linn. (Eğir), *Rosmarinus officinalis* Linn. (Biberiye), *Solidago vigaurea* Linn. (Altınbaşak), *Silybum marianum* Linn. (Devedikeni), *Curcuma longa* Val. (Zerdeçal), *Lavandula stoechas* Linn. (Karabaş), *Fumaria officinalis* Linn. (Şahtere), *Taraxacum officinale* Linn. (Karahindibağ), *Cichorium intybus*

Linn. (Mavi hindibağ), *Zingiber officinale* Rosc. (Zencefil), *Peganum harmala* Linn. (Üzerlik), *Juniperus communis* Linn. (Ardıç), *Nigella sativa* Linn. (Çörekotu), *Hypericum perforatum* Linn. (Kantaron), *Valeriana officinalis* Linn. (Kedi otu), *Melissa officinalis* Linn. (Melisa) bitkilerinden oluşmaktadır.

1.4.1. *Achillea millefolium* Linn. (Civanperçemi)

Asteraceae familyasına ait olan civanperçemi, 20-60 cm'ye kadar boylanabilen, çok yıllık, otsu bir bitkidir. Halk arasında bin yaprak otu, kandil çiçeği, akbaşı, barsama otu, marsama otu olarak da bilinmektedir. Yapraklarının çok ince ve kapiler şeklinde dallanmış olmasından dolayı “bin yaprak” ismini almıştır.

Civanperçeminin Latince adının, Aşil'in Troya Savaşı'nda aldığı yararları civanperçemi ile iyileştirdiği efsanesine dayandığı söylenmektedir. Bitki, tarih boyunca savaşta yaralanan askerlerin kanamasını durdurmak için kullanıldığından “herba militaris (asker otu)” olarak da adlandırılmıştır. 60.000 yıllık bir Neandertal mezarında, günümüzde ilaç olarak kullanılan tıbbi bitkilerle birlikte civanperçemi de bulunmuştur. Ayrıca Keltlerin bu bitkiyi hava durumunu tahmin etmek için kullandıkları da bilinmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). En çok kuzey ılıman kuşakta yayılmış olan bu bitki Avrupa orijinlidir ve Avrupa'nın her yerinde bulunmakla birlikte, Kuzey Amerika ve Kuzey Asya'da da yayılış göstermektedir. Türkiye'de bilhassa Kuzey ve Doğu Anadolu'da kuru otlaklarda tarla kenarlarında bulunmaktadır (Baytop, 1999). Civanperçemi bitkisinin çiçeklenme zamanı olan Haziran ve Eylül ayları arasında toplanan toprak üstü kısımları, kurutularak bitkisel ilaç (drog) elde edilmektedir (Özata, 2009). Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı olan droğun aromatik ancak yoğun olmayan bir kokusu ve az çok kinin acılığında bir tadı vardır.

Yapısında seskiterpenler, flavonollar, tokoferol ve askorbik asit bulunması sebebiyle antioksidan özelliğe sahip olan civanperçeminin içeriğinde yer alan başlıca fenolik bileşikler, flavonoidler, apigenin, kuersetin ile fenolik asit, kaffeoilkuinik asit (CQA). Anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, anti-tümöral ve anti-ülserojenik aktiviteye sahip olduğu belirlenen civanperçeminin alkol ekstraktları Avrupa'da sindirim problemi, karaciğer, safra rahatsızlıkları ve diyabet gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Potrich et al., 2010; Dias et al., 2013). Civanperçeminin etken maddeleri arasından yer alan akillein maddesi kanamayı durdurucu (hemostatik) özelliğe sahiptir. Ayrıca yapısında salisilik asit ve kumarin bulunduran bitki, dahilen mide, hemoroit kanamalarında ve haricen

yara, burun kanamalarında kan dindirici olarak kullanılmaktadır (Baretta et al., 2012; Candan et al., 2010; Zeybek ve Haksel, 2011). Bununla birlikte gaz ve spazm sökücü, iştah açıcı ve bilhassa hemoroit tedavisinde olmak üzere yara iyi edici etkilere sahiptir. Özellikle Orta Avrupa ülkelerinde kadın genital sistem hastalıklarından vulva inflamasyonunda halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Yalçın, 2005). Brezilya halk tıbbında kalp ve böbrek rahatsızlıklarını tedavi etmede kullanılan bu bitkinin diüretik etkisi sıçanlarda yapılan çalışma sonucunda ortaya konulmuştur (Souza et al., 2013). Ayrıca VSMCs (primary rat vascular smooth muscle cells, primer sıçan vasküler düz kas hücreleri) hücre hattında yapılan *in vitro* araştırmaya göre civanperçeminin vasküler inflamasyonda etkili olduğu kanıtlanmıştır (Dall'Acqua et al., 2011). Hücre bölünmesi düzenleyen proteinlerden biri olan siklin A'yı regüle eden katisin flavonoidi civanperçeminin yapısında bulunmakta ve tümör hücrelerini ölüme sürükleyen apoptotik mekanizmaları indüklediği bilinmektedir (Haidara et al., 2006).

Şiddetli yan etkileri bulunmayan civanperçemi bitkisi, uzun süreli kullanıma uygun bir tıbbi bitkidir. Astraceae familyasına karşı aşırı duyarlılığı olan kişilerde hafif ya da orta şiddette kontakt dermatit benzeri alerjik reaksiyonlar görülmesi ihtimali söz konusudur (Zeybek ve Haksel, 2011; Özata, 2009).

1.4.2. *Urtica dioica* Linn. (Isırgan Yapağı)

Anavatanı Avrasya olan ısırgan otu, *Urticaceae* familyasına aittir ve Kuzey yarıkürenin ılıman bölgelerinde özellikle duvar, çit ve tarla kenarlarında doğal olarak bulunmaktadır. Ticari materyal olarak kullanılan bitki, Orta ve Doğu Avrupa'dan yabani olarak toplanmakta, Kuzey Amerika'da ise kültürü yapılmaktadır. Tüm ılıman iklimlerde, mahalle aralarında, orman içindeki açıklıklarda, 2400 metre rakıma kadar olan yerlerde rahatlıkla yetişmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011).

60 - 150 cm boylarında, çok yıllık otsu bir bitki olan ısırgan otunun üzerinde dokununca yakan, ince emergenz tüyler yer almaktadır. Azot bakımından zengin toprakta yetişen bu bitki, erkek ve dişi çiçeklerini aynı bireylerde (dioik: iki evcikli) bulundurmaktadır. Gövdeleri dik, 4 köşeli, basit ve tabandan itibaren dallanmıştır. Temmuz'dan Eylül'e kadar koltuk altı demetleri halinde küçük, yeşil çiçekleri açan ısırgan otunun tohumu yağ ihtiva eden bir besli dokuya sahiptir (Lust, 2000). Isırgan otundan çok eski dönemlerden beri farklı tedavi alanlarında faydalanılmıştır. Dioscorides bu bitkiyi, yara tedavisi, idrar yolları hastalıkları,

çeşitli solunum yolları hastalıkları ve burun kanamaları gibi durumlarda kullanmıştır. Ayrıca Hippokrates, Plinius, Hildegard von Bingen ve Paracelsus bu bitkiden tıbbi anlamda yararlanmış ünlü hekimlerdir (Zeybek ve Haksel, 2011).

Hem kimyası hem de biyokimyası değişkenlik gösteren ısırgan otunun içerdiği etken madde kompozisyonu, çevre şartlarına, toprağın kimyasına, mikrobiyolojik florasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yakıcı tüyler düşük miktarlarda asetilkolin, histamin, serotonin ve formik asit içermektedir (Greenberg, 2003; Özata, 2009). HPLC-MS-MS cihazı ile yapılan analizler sonucunda *p*-hidroksibenzoik asit, gentisik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, kamferol, eskuletin, kuersetin ve izorhamnetin gibi fenolik bileşikler ile flavonoidler ve fenilpropanoidler tanımlanmıştır (Dejan et al., 2014). Isırgan otunun geleneksel ve güncel kullanımları idrar söktürücü, süt salgılayıcı, tonik ve kanamayı durdurucu olarak karşımıza çıkmaktadır (Lust, 2000). Diüretik etkisi nedeniyle; zayıflama çaylarının, idrar yollarını yıkamaya ve romatizmal ödemlerin boşaltılmasına yönelik çayların ve bitkisel ilaçların bileşimine girmektedir. Halk arasında ısırgan otunun yaprak ve toprak üstü kısımları, taze sıkılmış bitki suyu ve çay olarak çok sayıda amaç için kullanılmıştır. Safra yolu rahatsızlıklarından korunma, pankreasta enzim üretimini yükseltmesi, diyabet tedavisinde kullanılması ve kan yapma gibi birçok özelliği olmasının yanı sıra saçı güçlendirerek saç dökülmesini önlediği ve kepek oluşumuna karşı etkili olduğu da bilinmektedir (Özata, 2009).

Swiss albino fareleri üzerinde yapılan 14 günlük toksisite denemelerin sonucunda ısırgan otunun ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alan GST (Glutasyon S transferaz) enziminin seviyesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, vücutta normal metabolizma sırasında veya çeşitli dış etkenler yoluyla üretilen serbest radikal türleri başta kanser ve kalp-damar hastalıkları olmak üzere birçok dejeneratif hastalığın oluşmasını engellediğini ortaya koymaktadır (Özen ve Korkmaz, 2003). Bir başka çalışmada ise beslenmelerinde 8 hafta boyunca % 3, % 6, % 12 konsantrasyonda ısırgan otu diyeti uygulanmış beyaz balinaların (*Huso huso*) hematolojik, biyokimyasal ve immünolojik parametrelerin değerlendirilmesi için haftalık olarak kanları toplanmış ve yapılan analizler sonucunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında eritrositlerin ortalama büyüklüğü (MCV), eritrositlerdeki hemoglobin miktarı (MCH), eritrosit hemoglobin konsantrasyonunun yüzde olarak ifadesi (MCHC) ve lökosit sayıları ile albümin, glukoz, AST, ALT, ALP, kolesterol ve trigliserit gibi biyokimyasal parametreler açısından herhangi bir değişiklik tespit edilmemiş ancak eritrosit ve hematokrit miktarlarında artış gözlenmiştir (Binaii et al., 2013).

Bu bilgiler bitkinin kullanımını güvenli hakkında bilgi sağlamaktadır. Ayrıca ısırgan otu kullanımının bildirilmiş herhangi bir yan etkisi bulunmamakla birlikte nadiren da olsa ciltte alerjik reaksiyonlara neden olabilme ihtimali bulunmaktadır (Baumler, 2007).

1.4.3. *Equisetum arvense* Linn. (At Kuyruğu)

Equisetaceae familyasına ait olan at kuyruğu, Kuzey yarımkürenin arktik ve ılıman bölgelerinde yetişen çok yıllık bitki türüdür. Atkuyruğu; zemberek otu, çam otu, kırk boğum, tilkikuyruğu ve katır kuyruğu olarak da tanınmaktadır (Özata, 2009). İlkbahar başlangıcında, derinlere inmiş olan sap kökten, önce spor taşıyıcı kahverengi başak sapları çıkmakta daha sonra düzgün yapılı küçük çam ağaçlarını andıran 40 - 50 cm boyundaki yeşil yaz kuyruğu belirlemektedir. Sulak çayırlar ve su kıyılarında yetişen ve “yaşayan fosil” olarak da nitelendirilen, çok yıllık, otsu ve çiçeksiz bitkilerden olan atkuyruğunun gövdesi silindirik biçiminde, dallı veya dalsız, yeşil veya esmer-yeşil renkli, sert ve içi boştur. Genç sürgünleri ahır hayvanlarında zehirlenmelere neden olabilmektedir (Lust, 2000).

Yapısında fenolik asitlerden apigenin 5-O-glukosid, prototeknik metil esterleri, 5-O-kaffeoil shikimik asit, monokaffeoil mezo-tartarik asit, dikaffeoil mezo-tartarik asit, flavonoidlerden kuersetin, izokuersetin, kuersetin 3-O-glikozit, kuersetin 3-O-(6"-O-malonilglikozid), kamferol 3-O-glikozit, terpenlerden 1,8-sineol, linalool, timol, kamfor bulunmaktadır (Daiana et al., 2012). Kanama durdurucu özelliği ve ağır mesane ve böbrek hastalıklarında sağladığı başarılar sayesinde eski çağlardan beri kullanılan atkuyruğunun, kan kusmada, mesane ve böbrek rahatsızlıklarındaki etkinlikleri son yıllarda yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Lust, 2000). At kuyruğunun idrar söktürücü ve yara iyileştirici özelliklerinin yanı sıra mide ve bacak ülserleri ve sıvı tutulması gibi problemlere de iyi geldiği bilinmektedir (Özata, 2009). Ayrıca sıçanlara kronik atkuyruğu uygulamasının (50 mg/kg, i.p) zihinsel performansı arttırdığı belirlenmiş olup sebebinin ise bitkinin antioksidan kapasitesinden kaynaklandığı ortaya konmuştur (Junior et al., 2005). Hep G2 Hücre hattında yapılan analizler sonucunda atkuyruğunun hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) özelliğinden dolayı hepatit tedavisinde kullanılabileceği belirlenmiştir (Oh et al., 2004). Bitkinin bu özelliklerinin yanı sıra, anti-inflamatuvar ve analjezik etkileri de söz konusudur (Monte et al., 2004).

1.4.4. *Thymus vulgaris* Linn. (Kekik)

Kurak tepe ve sırtlarda kümeler oluşturarak büyüyen, 10-30 cm boylanabilen, kuvvetli kokulu, çok yıllık bir bitki olan kekik, *Lamiaceae* familyasına ait olup Avrupa Farmakopesi'ne göre, drog elde edilen tıbbi bitki olarak kabul edilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). Gövdesi familya özelliği olarak dört köşeli, yaprakları kısa saplı dıştan içe doğru kıvrık olan kekik, Mayıs'tan Eylül'e kadar açmaktadır (Lust, 2000).

Güney Avrupa kökenli bir bitki olan kekiğin, özellikle Orta ve Doğu Akdeniz havzasında, Balkanlar'dan, Anadolu ve Kafkaslar'a kadar olan bölgede yayılış gösterdiği bilinmektedir. Yabanisi olduğu gibi kültürü de yapılan kekik, güneşli yerleri tercih etmesinin yanı sıra, kuralığa ve soğuğa da dayanıklıdır. (Özata, 2009).

Oldukça eski zamanlardan beri hem baharat hem de tıpta ilaç olarak kullanılan kekik, orijinine ve toplama zamanına göre etken madde miktarları değişiklik gösteren temelde bir uçucu yağ bitkisidir. Total fenolik, flavonoid içeriği ve fitokimyasal yapısı belirlenen kekik'te saponinler, steroidler, alkaloidler, triterpenler ve tanenler yer almaktadır (Hossain et al., 2013). Halk tıbbında akne ve diğer cilt bozukluklarında, baş ağrılarında ve kurt düşürücü olarak kullanılmıştır. Ayrıca içermiş olduğu uçucu yağlardan dolayı mide sekresyonunu arttırması nedeniyle tonik ve hazmı kolaylaştırıcı olarak ve gaz söktürücü etkileri nedeniyle de mide-bağırsak hastalıklarında kullanılmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011). Uçucu yağının bileşiminde % 48,9 oranında bulunan timol (Milos et al., 2013) ve karvakrolden dolayı anti bakteriyel ve anti fungal özelliği bulunmasının yanı sıra görmede iyileşme, nezle, anjin, bronşit, zatüre ve zatülcem gibi hastalıklara direnç sağlamada etkili olduğu bilinmektedir (Baydar, 2006). Üst solunum yolu hastalıklarında da kullanılabileceği belirtilen kekiğin diğer etkileri arasında bulunan idrar söktürücü etkisinden flavonoidler sorumludur (Baumler, 2007).

Sprague–Dawley sıçanlarıyla yapılan 2 haftalık bir çalışmada aflatoksin ile indüklenmiş ve oksidatif stres meydana getirilmiş, ardından kekik yağı ile oral olarak beslenen hayvanlar çeşitli biyokimyasal ve histolojik parametreler bakımından incelenmiş özellikle karaciğer dokusunda yenilenme tespit edilmiştir. Ayrıca yükselen kreatinin, ürik asit, nitrik oksit ve lipit peroksidasyonunda azalma meydana geldiği, bunun sebebinin ise kekiğin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (El-Nekeety et. al., 2011). Ayrıca kekiğin insan tümör

hücre hatlarında akciğer kanseri (NCI-H460), göğüs kanseri (MCF-7), kolorektal kanser (HCT-15) ve mide kanseri (AGS) gerçekleştirilen sitotoksikite ve anti tümoral aktivite denemelerinde, hücrelerin büyümesini % 50 oranında inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Mikolic et al., 2014).

Çok nadir olarak bazı hassas kişilerde kekik kullanımının düşük potansiyelli hassasiyet reaksiyonları gösterebilmekte ve alerji yapabilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). Halk arasındaki uygulamalarda, özellikle kurt düşürücü olarak aşırı dozda kullanımlarında vücut ağrıları yapabileceği gözlenmiştir (Baydar, 2006).

1.4.5. *Viscum album* Linn. (Ökse Otu)

Viscaceae familyasına ait olan ökse otu; halka arasında çekem, gökçe, burç, gevele veya gövelek olarak da bilinmektedir. Daha çok Avrupa’da bulunmasına karşılık İngiltere’den İran’a kadar yayılış göstermekte, Türkiye’de ise Ege Bölgesi’nde Manisa, Uşak ve kısmen Afyon olmak üzere Güneydoğu Anadolu’da Siirt ve Mardin yörelerinde de bulunmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011).

Ökse otunun elma, alıç, ıhlamur, çam, söğüt, kavak ve ender olarak da meşe gibi yaprak döken ve odunu yumuşak ağaçlarda yarı parazit olarak bulunmakla birlikte, bazı türlerinin sadece iğne yapraklı ağaçların dalları üzerinde benzer şekilde yaşadığı bilinmektedir. Ökse otunun yumuşak odunlu ağaçlarda yarı parazit olarak yaşaması; ökse otunun üzüksü meyvelerinin, içerdiği lektinden dolayı yapışkan olmaları ve bu meyveyi yiyen kuşların gagalarına yapışan meyveden kurtulmak için gagalarını yukarıdaki yumuşak odunlu ağaçların dallarına ve gövdesine vurmaları suretiyle bir anlamda ağaca çekirdeği çakmasıyla olmaktadır. Ağacın içerisinde yerleştirilen çekirdekler eğer ağacın yumuşak yapılı yerlerine ve iletim demetine yakın ise, geliştirdikleri kök benzeri yapılar yardımıyla konak bitkiden su ve besin maddeleri alarak kolaylıkla çimlenirler. Klorofil içerdiklerinden fotosentez yaparak kendi besinlerini de kendileri üretirler. Bu şekilde yarı parazit olarak yaşarlar. Ökse otu yavaş büyüyen ancak uzun süre yaşayan bitkidir ve genellikle konak bitki öldüğünde yok olurlar. Kış sonunda açan çiçekler kısa sürede tek tohumu bulunan, parlak beyaz renkli yuvarlak, inci tanesi şeklinde meyvelere dönüşür. Meyvelerin içinde tohumları çevreleyen yarı saydam ve yapışkan bir öz bulunur ki bu öz bir sopaya bulanarak kuş yakalamakta kullanılır yani halk deyiimiyle ökse yapılır (Zeybek ve Haksel, 2011).

Ökse otu, glikoprotein yapısında lektin ve oligopolipeptit yapısında viskotoksinler içerir. İçerdiği mislektinler nedeniyle bağışıklık sistemini

düzenleyici, immünmodülatör etkisi bulunmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011). Bunlardan başka tanenler, terpenler, yağ asitleri, vitaminler, tiraminler, kafeik asit türevleri ve flavonidler içerdiği diğer etken maddeler arasındadır (Gaurav et al., 2012). Kullanılan kısımları arasında yaprakları, çiçekleri ve meyveleri olan ökse otunun tansiyon düşürücü, bağışıklık sistemini uyarıcı, idrar arttırıcı etkileri bulunmaktadır. Sara hastalığında, hepatitte, spazmlarda, kalp rahatsızlıklarında ve yaşlılık hastalıklarında kullanılır (Özata, 2009).

In vivo ve *in vitro* prelinik çalışmalar doğrultusunda ökse otunun sitotoksik ve anti tümör etkisi yapılan bir çalışmada hücre döngüsünün inhibisyonu ve apoptoz yolu ile tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir (Bar, 2011). Ribozomal RNA'nın protein sentezini baskılamak suretiyle apoptotik hücre ölümüne neden olan ökse otu, bu etkiyi özellikle tümör hücresinin üzerine yığılarak, hücrenin redüksiyonunu sağlayan mislektinler ile gerçekleştirmektedir. Ökse otunun yapısında yer alan mislektinler, immünolojik mekanizmaların indüklenmesi yoluyla tümör üzerine kademeli olarak uygulanan yüksek dozlarda, sadece doğrudan temas kurarak etki gösterirler. Geniş anlamda bakıldığında, mislektinlerin sitotoksik etkileri direkt intravenöz uygulamayla gerçekleşmekte ve bu durum tümörün gücünü kaybetmesine neden olmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011). Ayrıca fare ve sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen denemeler sonucunda sedatif, anti-psikotik ve anti-epileptik aktiviteleri ortaya konan ökse otunun (Gaurav et al., 2012), kanser kemoterapi tedavisinde kullanılan anti-neoplastik ilaçların sito-genotoksik etkilerini azalttığı fare kemik iliği hücrelerinde yapılan analizlerle belirlenmiştir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2012).

Ökse otunun parental uygulamalarında, titreme, üşüme, ateş, baş ağrısı ve alerjik reaksiyonlar yaptığı bilinmektedir. Ayrıca kalp atım hızının yavaşlamasına, kusma, ishal ve göğüs ağrısına neden olduğu ve tansiyon düşürücü ilaçlar ile birlikte kullanıldığında (ilaç etkileşiminden dolayı), bu ilaçların etkisini arttırdığı bilinen yan etkilerindendir (Özata, 2009). Bununla birlikte ökse otu ekstrelerinin kaşıntı ile beraber ciltte eritem ve ödeme neden olduğu da tespit edilmiştir (Bar, 2011).

1.4.6. *Acorus calamus* Linn. (Eğir Otu)

Azak eğeri, eğil, hazambel, hazanbel ve yel otu olarak da bilinen eğir otu, *Acoraceae* familyasına aittir. Mısır, Britanya, Çin, Yunanistan gibi pek çok ülkede yaygın olan bu bitkinin tedavi edici kısımları olarak genellikle kök ve gövdesi kullanılmaktadır (Lust, 2000). Eğir otu, göl kenarları, bataklıklar, turbalıklar, göl

ve dere boylarında olmak üzere kuzey yarım kürenin her tarafında yaygın olarak yetişen çok yıllık bir bitkidir. 150 santim uzunluğa erişebilen ve sürünen kök gövdesi, 60-180 santim uzunluğunda kılıç biçimli yaprakları ile çok küçük yeşilimsi-sarı çiçekleri bulunmaktadır (Lust, 2000).

Yapısında alkaloidler, flavanoidler, lektinler, musilaj, fenoli bileşikler, saponin, şekerler, taninler ve triterpenler bulunan eğir otunun antioksidan kapasitesi yüksek olduğu ayrıca anti konvülsan (kasılmaya neden olan, spazm nöbetleri, epilepsi nöbetleri) etki gösterdiği de belirlenmiştir (Rajputa et al., 2013). Bunlarla birlikte gaz giderici, terletici, ateş düşürücü ve yatıştırıcı olan eğir otu, özellikle mide üzerindeki faydalı etkileri ile tanınmaktadır. Eğir otunun iştah arttırıcı olduğu bilinmekle birlikte, akut ve kronik hazımsızlık, gastrit ve asit fazlalığının giderilmesine de yardım ettiği bilinmektedir (Lust, 2000).

Eğir otunun hidro alkolik ekstresinin Wistar sıçanlarında toksisite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve LD₅₀ değeri 5.070 mg/kg olarak hesaplanan bitkinin 200-500-1.000 mg/kg'lık dozlarda gerçekleştirilen subakut toksisite denemesi sonucunda vücut ve organ ağırlıklarında herhangi bir değişim tespit edilmemiştir (Singh and Muthuraman, 2012). Çeşitli araştırmacılar tarafından anti-proliferatif etkisi ortaya konan eğir otunun (Gaidhani et al., 2009; Chaitali et al., 2010) içeriğinde yer alan lektinler sebebiyle anti-mitojenik etki gösterdiği, tümör gelişimi inhibe ettiği dolayısıyla anti-kanser etkisinin olduğu da bildirilmiştir (Rajputa et al., 2013). Bir başka çalışmada ise hiperglisemi oluşturulmuş diyabetik farelere 21 gün oral olarak eğir otu diyeti uygulanmış ardından biyokimyasal parametreler (kan şekeri, lipid profili; total kolesterol, LDL, HDL kolesterol, glukoz-6-fosfat, früktoz, fruktoz 1,6 bis fosfataz seviyesi, karaciğer enzimleri) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bitkinin, Glibenclamide'ten (antidiyabetik ilaç) daha etkili bir anti-hiperglisemik olduğu kanıtlanmıştır (Prisilla et al., 2012).

1.4.7. *Rosmarinus officinalis* Linn. (Biberiye)

Lamiaceae familyasına ait olan biberiye, yapraklarını dökmeyen çalı görünüşünde, 1.500 metre rakıma kadar yayılış gösteren, çiçekleri soluk mavi renkli bir bitkidir. Akdeniz havzasında ve bazı Avrupa ülkelerinde yayılış göstermektedir. Güney Afrika, Amerika, Hindistan ve Çin'de kültürü yapılan biberiye, hasalban ve kuşdili olarak da bilinmektedir. Türkiye'de biberiyenin doğal yayılışı Güney Anadolu bölgesinde, Mersin Çiftlik Köyü'nden başlayıp, Tarsus-Adana'dan İskenderun Çamtepe Yumurtalık'a kadar uzanmaktadır (Özata,

2009). Eski çağlarda biberiyenin belleği güçlendirdiği ve hafif uyarıcı özelliği nedeniyle afrodizyak olarak toniklerin bileşimine katıldığı, eski Yunanlıların hafızayı kuvvetlendirmek ve konsantrasyonu arttırmak amacıyla bilginlerin ve sınava giren öğrencilerin başlarına biberiye çelenkleri taktıkları ve daha sonra unutulmayacak olmanın bir simgesi olarak cenaze ile birlikte mezara koydukları bilinmektedir. XV. Yüzyılda vebadan korunmak için evlerde kullanılan biberiye, güve kovucu olarak giysileri korumak için uzun yıllar kullanılmıştır (Zeybek ve Haksel, 2011).

Sert ve keskin aromalı olmasının yanı sıra yoğun bir kokuya sahip olan biberiye, tıbbi bitkisinin çiçeklenme döneminden hemen önce toplanmış ve kurutulmuş yaprakları ve uçucu yağları drog olarak kullanılmaktadır. Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı olan biberiyenin yaprakları ve yapraklarından su buharı distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmektedir. Toplam polifenol içeriği % 37,4 olan biberiyenin yapısında % 28,5 oranında flavonoidler, % 2,4 oranında tanin, rosmarinik asit, triterpenler (oleanolik, ursolik, betulinik asit, steroidler) ve eser miktarda salisilat yer almakta, özellikle yapraklarda % 35,8 oranında 1,8-sineol, gövde de % 16,7 oranında β -karyofilen bulunmaktadır (Yosr et al., 2001; Zeybek ve Haksel, 2011). Sindirim sistemi şikâyetlerinde, baş ağrısı ve migrende, regl düzensizliklerinde, aşırı yorgunluk ve baş dönmesi durumlarında kullanılan biberiyenin safra arttırıcı, idrar söktürücü ve terletici etkileri de bilinmektedir (Özata, 2009). Antioksidan özellik taşıyan biberiye, haricen kan dolaşımını hızlandırmakta, adele ağrıları ile romatizmal ağrılarda ağrı kesici olarak kullanılmaktadır (Özata, 2009). Ayrıca koroner kalp hastalıklarında ve enfeksiyon sonrası dolaşım bozukluğunda kullanımı söz konusudur (Zeybek ve Haksel, 2011).

Biberiyenin etanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada oksidatif stres, enzimatik savunma mekanizması, nitrit ve nitrat seviyeleri incelenmiş ve bitkinin antioksidan, vazodilatör (damar genişlemesi) ve anti-inflamatuvar özelliği olduğu kanıtlanmıştır (Amaral et. al., 2013). Diğer bir çalışmada alloxan ile oluşturulan deneysel diyabetin sonucunda BALB/c farelerde yara iyileşme modelleri üzerinde çalışılmış ve özellikle şeker hastalığına bağlı geç iyileşen yaralarda biberiyenin etkili olduğu ortaya konulmuştur (Abu Al Basal, 2010). Biberiye eksterlerinin anti-proliferatif etkileri çeşitli kanser hücre hatlarında çalışılmış, (Cheung and Tai, 2007) bitkinin yapraklarından elde edilen karnosol ve karnosik asitin, HL-60 (insan promyelositik lösemi hücreleri) hücre hattında anti kanser etki gösterdiği bildirilmiştir (Bai et al., 2010). Pankreatik beta hücre hattında (RINm5F) gerçekleştirilen sitotoksikite testleri sonucunda ise hücre canlılığındaki azalma

nitrik oksit (NO⁻) ile indüklenmiş apoptoz mekanizması ile açıklanmıştır (Kontogianni et al., 2013).

Olağan dozlarda kullanıldığında toksik olmayan biberiyenin tedavi dozları ve uygun alım koşullarında herhangi bir yan etki ya da sağlık riski gözlemlenmemiştir (Zeybek ve Haksel, 2011). Bitki ile temas esnasında kontakt alerjilere neden olabilme ihtimali bulunmaktadır. Biberiyenin veya ekstrelerinin ağız yoluyla aşırı dozda alınması, böbrek iltihabına ve mide-ince bağırsak mukozalarının iltihabına neden olabilir. Hamilelik esnasındaki ve emzirme dönemindeki kullanımıyla ilgili yeterli çalışma bulunmadığından bu süreçte kullanılmaması önerilmektedir (Özata, 2009).

1.4.8. *Solidago virgaurea* Linn. (Altınbaşak)

Yaz ya da sonbaharın sonlarında çiçek açan, *Asteraceae* familyasına ait çok yıllık bir bitki olan altınbaşak, Yahudi çiçeği veya altın asa olarak da bilinir ve kullanılan kısımları arasında çiçekleri bulunmaktadır. Büyük bölümü Amerika kökenli olan altınbaşak cinsi üyeleri, yıldız çiçeğine benzerler; narin ve bazılarında sapsız, bazı türlerde kısa saplı dalsız yaprakları, karmaşık salkımlar içinde doğan küçük, sarımsı çiçek başları vardır. Bazı türlerinin çiçeklerinden sarı renkli boyar madde hazırlanmaktadır. Bazı türleri ise yüksek yoğunlukta nitrat içerdiklerinden zehirlidirler (Yalçın, 2005).

Bileşenleri arasında kokulu yağlar, salisilik asit, tanin ve saponin yer alan bitkinin, artıkların vücuttan atılmasını kolaylaştırıcı, idrar söktürücü, salgı düzenleyici ve karaciğer çalıştırıcı özellikleri bulunmaktadır. Altınbaşağın özellikle yüksek kolesterol, nefrit, sistit, böbrek taşı veya kumu, karaciğer ağrıları ve kronik egzama gibi hastalıklarda kullanılması önerilmektedir (Yalçın, 2005).

İçeriğinde yer alan solidagoik asit, cleroda gibi dipertenlerin yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmış ve *Staphylococcus aureus* karşı etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır (Starks et al., 2010). Antimikrobiyal aktivite özelliği olan bitkinin (Thiem and Goslinska, 2002) anti-inflamatuvar ve analjezik etkileri de ortaya konmuştur (Okpanyi and Arens-Corell, 1990).

1.4.9. *Silybum marianum* Linn. (Devedikeni)

Meryem ana dikenini, deve kengeri, deve kengeli, eşek otu ve sütlü kengel olarak da adlandırılan devedikeni *Astreraceae* familyasına aittir (Yalçın, 2005). Akdeniz ülkeleri, Kuzey Afrika ve Güney Rusya'da ve ülkemizde sahil şeridinde, özellikle Ege ve Marmara bölgelerinde çok yaygın olan ve genellikle yol kenarlarında ve ekili olmayan tarlalarda yetişen deve dikeninin boyu 30 - 100 cm arasında değişmekte; doğal olarak yetiştiği gibi kültürü de yapılmaktadır (Özata, 2009). Devedikeni, köşeli gövdeye sahip, soluk yeşil renkli yapraklı, mor ya da nadiren beyaz renkli çiçeklere sahip, bir yıllık otsu bir bitkidir. Birinci yıl rozet yapraklar çıkmakta, ikinci yılda ise gövde bu yapraklar arasından boyanmaktadır. Rozet yapraklar, CaCO_3 birikmesinden dolayı beyaz lekelidir. Temmuz - Ağustos aylarında çiçek açan devedikeninin çiçeklerinin altında geriye dönük dikenler bulunmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011). Ağustos ayından başlayarak toplanan çiçekler, kuruduktan sonra tohumlar kendiliğinden dökülür. Bileşiminde silimarin bulunan bu tohumlar bitkinin drog olarak kullanılan kısımlarıdır. Algılanabilir bir kokusu olan devedikeninin botanik anlamda meyve olarak tanımlanan droğu yağlı ve acıdır (Özata, 2009).

İçeriğinde çeşitli flavanon türevlerinin karışımlarından olan flavonolignanlar (% 1,5 - 3 oranında silimarin), flavonoidler, % 20 - 30 oranında sabit yağ, tokoferol, steroller, protein, eser miktarda musilaj maddeleri bulunan devedikeni Avrupa tıbbında 2000 yılı aşkın süredir karaciğer ve safra yolları hastalıklarında kullanılmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011). Antik Yunan'da hekim Dioscorides tarafından safra arttırıcı, kusturucu ve yılan zehirlenmelerine karşı kullanılırken, ortaçağdan beri de meyvelerinin karaciğer üzerine özel etkisi olduğu bilinmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). Günümüzde; karaciğer salgı bezlerindeki salgı yapan hücreler üzerine direkt etki etmesi nedeniyle karaciğer iltihabına karşı en etkili ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kimyasal madde zehirlenmelerinde, sıtmaya ve mantar hastalıklarından korunmada etkili olduğu bilinmektedir (Özata, 2009). Alkol ve endüstriyel zehirlerden oluşan toksik-metabolik karaciğer hasarlarından korunma ve tedavisinde, karaciğerin anormal fonksiyonlarında ve karaciğer iltihabı sonrasında, siroz, yağlanmış karaciğer gibi kronik dejeneratif ve maskelenmiş karaciğer hastalıklarında kullanılır. Özellikle toksik alkolik karaciğer sirozunda yaşam beklentilerini yükseltmekte enfeksiyöz hepatitlerde ve karaciğer sirozunda koruyucu olarak tedavide yerini almaktadır. Aktif anti-hepatotoksik kompleks olan silimarin, çok yüksek dozlarda bile toksik değildir. Yirmi dört saat içerisinde ortalama olarak % 20 - 40'ı safra üzerinden, % 3 - 7'si böbreklerden atılmaktadır. *In vivo* ve *in vitro* olarak karbon tetraklorür,

tiyoaset amit ile karaciğer hücreleri ve dokularında geriye dönüşü olmayan hasarlardan kaynaklanan patolojik ölümleri (nekroz) geriye döndürebilir. Ayrıca karaciğer sirozuna neden olan Amanita şapkaklı mantarları'nın toksinleri; falloidin ve α -amanitin alkaloidleri gibi hepatotoksik maddelerinin eksikliklerini azaltır ve baskılar. Etkin maddeleri olan silimarin ve onun izomerleri olan silibininin terapötik etkinlikleri temel olarak üç mekanizmaya ayrılır;

1. Hepatositlerin dış hücre membranında yapısal değişiklikler,
2. Antioksidan ve serbest radikal süpürücü özellikler,
3. Hepatositik yenilenmenin (rejenerasyon) teşvik edilmesidir.

Silimarin ve onun izomerleri olan silibinin, karaciğer hücre membranlarının sinüzoidal taşıma sistemlerini ve toksin bağlanma noktalarını bloke ederler ve bu etki ile karaciğer toksinleri geri emilerek azalır ve engellenmiş olur. Böylelikle karaciğer parankimatik hücrelerinin etrafında bir bariyer oluşturup, toksinlerin karaciğer hücrelerine nüfuz etmesi ve hepatotoksik döngüye götürmesini engellerler. Amanita toksinleri ile oluşan zehirlenmelerde: α -amanitin ve falloidin alkaloidleri üzerine sinüzoidal taşıma sistemlerinin doğrudan baskılanmasının söz konusu olduğu gösterilmiştir (Münter et al., 1986). Aynı zamanda silibinin karaciğerde toksinlere karşı korumayı, intravenöz olarak karaciğer hücrelerindeki RNA polimerazla yarışarak etki ettiği, hepatositlerde ribozomal RNA sentezini etki derecesini ve ribozom sayılarını artırdığı böylece polimerazın aktivitesini stimüle ederek yaptığı bilinmektedir. Tedavi edilmeme durumunda 12 - 24 saat sonunda hücre ölümü gerçekleşir. Silibininin anti-peroksidatif özellikleri ve aynı zamanda serbest radikal süpürücü gibi davranma kapasitesi nedeniyle, çeşitli hepatotoksik maddelerin yol açtığı lipid peroksidasyonuna ve membran hasarlarına karşı koruma sağlar. Bu etki aynı zamanda karaciğer hücrelerinde zararlı maddelerin detoksifikasyonunda önemli olan glutatyon tüketimine karşı da koruyucu rol oynar. Bununla beraber transaminaz ve alkalik fosfataz aktivitelerini artırarak, kan serumunda koruma sağlamış olur. Koruyucu faktör olarak kullanımı, karaciğer harabiyetinden sonra tedavi edici kullanımına göre çok daha etkilidir. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışma, silimarinin karaciğer kolestrol düşürücü etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Krecman et al., 1998). Silibinin ve silimarin LDL oksidasyonu üzerinde pozitif engelleyici etkiye sahiptir.

2000 yılı aşkın bir süredir Avrupa'da karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan devedikeninin yüksek dozlarda bile güvenle kullanılabileceği ortaya konmuştur (Blumental et al., 1998, Braun et al., 1996). Yan etkileri arasında nadiren de olsa gözlemlenen hafif laksatif etkisi olan devedikeninin hamile ve süt emziren kadınlarda kullanılmaması önerilmektedir (Özata, 2009).

1.4.10. *Curcuma longa* Val. (Zerdeçal)

Zerdeçal, *Zingiberaceae* familyasına ait olan; Hindistan, Çin ve Endonezya gibi Asya ve Afrika'da yayılış gösteren kuvvetli aromatik bir bitkidir. Bileşimindeki sarı boyar maddeler nedeniyle Hint safranı, olarak da bilinen zerdaçalın diğer isimleri arasında safran kökü, sarı boya, zerde çöp, turmerik ve kürküma da yer almaktadır (Yalçın, 2005). Biberi andıran hafif baharatlı, yakıcı ve acımsı bir tadı olan zerdeçal, 100 cm'ye kadar büyüeyebilen, kamış görünüşünde, çok yıllık otsu bir bitkidir. Çiçeklenmesi bir sap üzerinde 20 cm boyunda, sarı çiçeklerden oluşan, oldukça büyük, boyuna damarlı, uçları sivri yapraklara sahip olan zerdeçal, kumlu, alüvyonlu toprak ve nemli iklim sevmektedir. Zerdeçal, 3000 yıldan beri baharat olarak bilinmekte ve çok eski zamanlardan beri boyama ve tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Zeybek ve Haksel, 2011).

Yapısındaki bileşenleri zencefile benzeyen zerdeçal, sıklıkla pahalı bir baharat olan safran yerine kullanılmaktadır. Özellikle Doğu Asya'da ipekli kumaşlar ve ince derilerin boyanmasında kullanılması yanı sıra kozmetik ürün olarak cilde de sürülmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). Toprak üstü kısımları kurumaya başladığında hasat edilen zerdeçalın rizomları kullanılan kısımları arasındadır. Etken maddeleri arasında başlıca kürküminoitler yer almaktadır. Bunlar su buharı distilasyonunda uçmayan, alkolde çözünen disinnamoilmetan türevleridir ve sarı boyar maddelerdir. Ayrıca immünolojik aktif maddelerden ukonan A bulunmaktadır. Bunların haricinde kafeik asit ve türevleri de zerdaçalın yapısında yer alan diğer etken maddeler arasındadır. Bunlara ek olarak uçucu yağı, % 2 - 7 oranında diarilheptan ve diarilpentan içermektedir (Zeybek ve Haksel, 2011).

Zerdeçal, romatizmal bölgedeki kızarıklıkları giderici, safra arttırıcı etkilerinin yanı sıra safra kesesi rahatsızlıklarında da kullanılmakta, damar tıkanıklıklarını önlemede yardımcı olmaktadır (Özata, 2009). Ayrıca dalak hastalıkları, karaciğer yetersizliği, mide bağırsak gazı, kansızlık, idrar yolları hastalıkları ve böbrek taşı gibi rahatsızlıklarında da kullanımı söz konusudur (Yalçın, 2005). Zerdeçalın içeriğinde yer alan kürküminoitler sayesinde antioksidan özelliği olduğu, lösemi, kolon, melanoma, renal ve göğüs kanseri hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği bununla birlikte ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Kozics et al., 2013). Ayrıca sıçanlarda karaciğer inflamasyonu ve hiperplazi (bir organ veya dokunun hücre sayısındaki artış nedeniyle büyümesi) durumunda 200 mg/kg ve 600 mg/kg dozlarda

kürkümün (CCM) uygulamasının etkili olduğu histopatolojik araştırmalar ile kanıtlanmıştır. Aynı çalışma kapsamında kürkümünün, sıçanların karaciğer dokularında immünoiblotting yöntemi ile indüklenmiş onkogenik p21ras ve p53 protein genlerinin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Chuang et al., 2000).

İlaç etkileşimi olarak kanda pıhtılaşmayı önleyen ilaçlar ile birlikte kullanıldığında kanama riskini arttırma ihtimali bulunmaktadır. Ayrıca içeriğinde yer alan kürküminoitlerin sitotoksik olmalarından dolayı kromozomlarda değişiklik yapabilme ihtimali de söz konusudur (Özata, 2009). Ayrıca yüksek dozda ve uzun süreli kullanımında mide mukozasını tahriş edebilmekte ve mide bulantısına sebep olabilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). Bu sebeple gastrit, mide ülseri olan kişiler tarafında kullanılmaması önerilmektedir (Yalçın, 2005).

1.4.11. *Lavandula stoechas* Linn. (Karabaş Otu)

45 – 50 cm yükseklikte, tüylü, kuvvetli kokulu, çalı görünüşünde *Laminaceae* familyasına ait çok yıllık bir bitki olan karabaş otu (Özata, 2009). lavantin, yalancı lavanta çiçeği, gargan, keşiş otu, lavandula olarak da isimlendirilmektedir (Yalçın, 2005). Türkiye’de Batı Anadolu’nun makilik alanlarında yaygın olarak bulunur. Yaprakları, uzun, grimsi ipeksi tüylü 1 - 4 cm arasında uzunlukta, çiçekleri, pembe-mordur ve çiçekleri 10 - 30 cm uzunlukta sivri uçlu ince yapraksız saplar üzerinde 2 - 3 cm uzunluğunda görülür. Her bir çiçekte 4 - 8 mm uzunluğunda bir taç yaprak bulunur, sivri ucun üstündeki çiçekler daha büyük, uzun ve parlak lavanta mavisi renklindedir. Kuraklığa dayanıklı olan karabaş otu, orta nemli yerleri ve bazik toprakları tercih etmektedir.

Kullanılan kısımları arasında toprak üstü bölgeleri yer almakta ve bileşiminde uçucu yağ, saponinler ve glikozitler bulunmaktadır. İçeriğinde % 37 oranında fenkon, % 27,3 kafur, fenollerden % 54 karvakrol ve % 30,2 oranında timol bulunan karabaş otunun sitotoksik olmadığı dozlarda anti inflamatuvar etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Zuzarte et al., 2013). Ayrıca farelerde gerçekleştirilen diğer bir çalışma, karabaş otunun anti konvülzan ve anti spazmodik etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (Gilani et al., 2000). Karabaş otu ağrı kesici, antiseptik, idrar yolları iltihaplarını giderici, balgam söktürücü, sinir ve kalp kuvvetlendirici, sara ve astımda yatıştırıcı, yara iyileştirici ve egzama giderici özellikleri olan karabaş otu (Özata, 2009) sinir, solunum, üriner sistem hastalıklarında kullanılabilmektedir (Yalçın, 2005).

Karabaş otunun bilinen yan etkisi bulunmamakla birlikte hamilelik döneminde kullanılması önerilmemektedir (Yalçın, 2005).

1.4.12. *Fumaria officinalis* Linn. (Şahtere)

Papaveraceae familyasına ait olan şahterenin bilinen diğer isimleri arasında, acı tere ve rilki kişnişi yer almaktadır (Yalçın, 2005). Dünya üzerinde yaygın olarak bulunan bir yıllık bir bitki olan şahterenin yarı dik içi boş gövdesi açılı, düz ve mavimsi renkli, yaprakları gri - yeşil ve dar bölümlüdür. Mayıs'tan Eylül ayına kadar sarkık salkımlar halinde açan bitkinin tedavide kullanılan kısmı çiçekleridir (Lust, 2000).

Bileşiminde tanen, şeker, fumarik asit ve bir alkaloit olan fumargin içeren şahterenin yatıştırıcı, analjezik, antiseptik, tansiyon düşürücü ve safra akımını düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Özellikle damar sertliği ve safra kesesi hastalıklarında kullanılması önerilmektedir (Yalçın, 2005).

Karaciğerlerinde karbon tetraklorür (CCl_4) ve N-nitroso dietilamin (NDEA) ile hepatokarsinoma oluşturulan Wistar farelere, şahtere uygulamasının ardından karaciğer kanser markerları, nodül yoğunluğu, AST (Aspartat transaminaz), ALT (Alanin transaminaz), ALP (Alkalın fosfotaz), TBL (Total bilirubin) gibi biyokimyasal parametreler ile birlikte histopatolojik incelemeler yapılmış sonuç olarak şahterenin kemopreservatif etkisinin olduğu ortaya konulmuştur (Hussain et al., 2012).

Bilinen yan etkisi olmamakla birlikte yüksek dozların müshil ve idrara aşırı çıkmaya neden olduğu bilinmekte ve aşırı doz kullanımının ise ishale ve mide ağrılarına neden olacağı belirtilmektedir (Lust, 2000).

1.4.13. *Taraxacum officinale* Linn. (Kara Hindiba)

Aslan dişi ve radika olarak da bilinen *Asteraceae* familyasından olan kara hindibanın ilaç olarak kullanılan kısımları, çiçeklenme zamanından önce toplanmış toprak üstü ve kök kısımdır (Yalçın, 2005). Kuzey Yarımküre 'de yabancı olarak birçok alttürü bulunan kara hindiba, Orta Avrupa'da çok sıcak olmayan bölgelerde yaygın olarak yayılış göstermektedir. Kültürü de yapılan kara hindibanın hem yabanişinden hem de kültüründen bitkisel ilaç yapılabilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). 5 - 50 cm boylanabilen, çok yıllık, süt taşıyan, küçük otsu bir bitki olan kara hindibanın çiçekleri sabah açıp akşam kapanmaktadır.

Etken maddeleri arasında idrar söktürücü etkisi bulunan seskuterpenler, triterpenler, karoten ve ksantofil ile birlikte fenolik yapılar, yaprak ve çiçeklerinde bulunan flavonoidler, fenolik karboksilik asitler kumarinler yer almaktadır. Bitkinin kök kısmında ise torexacin, levulin, sterol, pektin, glikozidler, asparajin, kolin ile birlikte çeşitli vitaminler (A, B, C, D) ve potasyum yer almaktadır (Yalçın, 2005). Etken maddeleri yoğun olarak kökünde bulunduğu için bitkisel ilaç yapımında kök daha çok tercih edilmektedir (Zeybek ve Haksel, 2011). Halk arasında gut, hemoroit, safra yolu tıkanıklıklarında, eklem ağrılarının yanı sıra haricen yaralarda, egzama ve diğer cilt hastalıklarında kullanılır. Yüksek insülin miktarından ve bunun da sonbaharda en yüksek oranda bulunmasından dolayı diyabet hastaları tarafından özellikle sonbaharda yararlanılmaktadır. Vücuttan su atılımını kolaylaştıran ve böbreklerden sodyum atılımını arttıran ya da kolaylaştıran etkisi bulunmaktadır. Ayrıca idrar yolları enfeksiyonları ve böbrek kumlarında etkilidir. Buna ek olarak karaciğer ve böbreklerin fonksiyonlarını arttırıcı özelliği vardır.

BALB/c farelerde 5 gün boyunca 2,5-5-10 mg/kg dozlarda oral kara hindiba uygulamasının lipopolisakkarit ile (LPS) indüklenmiş akut akciğer hasarına karşı koruyucu olduğu kanıtlanmıştır (Liu et al., 2010). Başka bir çalışmada ise, alkol indüklü toksisite oluşturulmuş farelerde karahindibanın karaciğer koruyucu olduğu, antioksidan özellik gösterdiği ve lipid peroksidasyonu düşürerek oksidatif stres hasarını azalttığı *in vivo* ve *in vitro* analizler ile ortaya konulmuştur (You et al., 2010).

Herhangi bir yan etkisi bulunmayan kara hindibanın acı lezzete sahip olan bitkisel ilaçları, asit fazlalığında mide asidi yapabilmekle birlikte, bilinen bir ilaç kullanımı ile etkileşimi söz konusu değildir (Yalçın, 2005).

1.4.14. *Cichorium intybus* Linn. (Hindiba)

Asteraceae familyasına ait olan hindiba, ak hindiba, yabani hindiba, acı gıcı, güneşik olarak da adlandırılmaktadır. Bununla birlikte ilk olarak Belçika'da yetiştirilmesi sebebi ile Belçika hindibasası da denilmektedir. Kullanılan kısımları arasında yaprakları, kökü ve kabukları bulunan hindiba, hem sebze hem de salata olarak tüketilen az kalori içeren besleyici, zengin ve hafif bir besindir (Yalçın, 2005). Kökünde yer alan bileşik türleri olarak intibin, fruktoz, pentosan, tanen, eterik yağlar ve petim sayılabilmektedir. Yapısında ayrıca A, B5, K ve C vitaminleri, β -karoten, demir, fosfor, bakır, manganez ve yüksek miktarda potasyumun yanı sıra yüksek lif ve su bulunmaktadır (Yalçın, 2005). İyileştirici

özellikleri arasından tonik, kuvvetlendirici, hazmettirici, idrar söktürücü ve yara iyileştirici etkileri bulunan hindibanın özellikle idrar tutukluğu, balgam, gut, karaciğer ve safra kesesi ağrılarında kullanılması önerilmektedir (Yalçın, 2005).

Wistar sıçanlarında karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulmuş karaciğer hasarına karşı hindibanın karaciğer koruyucu etkisi çalışılmış, histopatolojik bulgular ve biyokimyasal analizler sonucunda hepatoprotektif etkisi ortaya konulmuştur (Nallamilli et al., 2013). Ayrıca *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* üzerinde gerçekleştirilen aktivite çalışmaları sonucunda hindibanın antimikrobiyal aktivitesi kanıtlanmıştır (Shaikh et al., 2012).

1.4.15. *Zingiber officinale* Rosc. (Zencefil)

Yüzyıllardan beri Hindistan ve Çin'de kültürü yapılan zencefil, *Zingiberaceae* familyasına ait olup anayurdu tropik Güneydoğu Asya'dır. 100 cm kadar yükseklikte, kamyş görünüşünde, çok yıllık otsu bir bitki olan zencefilin yaprakları 20 cm'den daha uzun ve sivri uçludur. Yeşilimsi sarı renkli tüpsü çiçeğin kahverengi mor noktaları, bu tüpsü kısımda belirgindir (Özata, 2009). Kök uzantılarından çoğalan zencefilin toprak altında yatay olarak gelişen, yumru şeklinde etli bir kökü vardır ve her yıl bu kökten yeni sürgünler çıkar. Gelişimini tamamlayan bitkilerin toprakaltı organları sonbaharda hasat edildikten sonra yıkanır ve güneşte kurutularak kullanıma hazır hale getirilir (Zeybek ve Haksel, 2011).

Zencefilin, 1000 yılı aşkın süredir genel bir baharat, besin maddesi ve tıbbi ilaç olarak kullanılmakta olduğu Eski Hint, Çin eski, antik Yunan ve Roma'ya ait metinlerde bahsedilmektedir. M.S. 1. yüzyılda tüccarlar tarafından Akdeniz Bölgesi'ne getirilmiş, Dioscorides, bu bitkiden Tıbbın Materyalleri (Materia Medica) adlı eserinde bahsetmiş, mide rahatsızlıklarında ve aynı zamanda göz kararmasına karşı kullanıldığına değinmiştir. XI. Yüzyılda baharat bitkisi olarak tanınmaya başlamış ve çok kullanılmıştır. Hildegard von Bingen ve Paracelsus, mide üşütmelerinde, mide-bağırsak ağrılarında, kolit tedavisinde ve terletici madde olarak kullanmışlardır. Güney Amerika'nın fethinden sonra da İspanyollarca Batı Hint adaları ve Meksika'ya baharat bitkisi olarak götürülmüş, daha sonraki yüzyıllarda müşhil, afrodizyak ve diş ağrılarında etkili olduğu fark edilmiştir (Zeybek ve Haksel, 2011).

Etken maddeleri arasında % 1,5 - 3 oranında uçucu yağ bulunmaktadır. Ayrıca küçük miktarlarda acı bir madde olan kürküminoit ile % 50 oranında nişasta içermektedir. Bileşiminde yer alan diğer maddeler reçine ve müsilajdır (Özata, 2009). Uyarıcı, balgam söktürücü ve terletici etkilere sahip olan zencefil, gastrit, sindirim sistemi rahatsızlıkları ve iştahsızlıkta, güçlendirici, gaz söktürücü, hazmettirici olarak da etki göstermektedir. Ayrıca mide, safra ve tükürük salgılarını uyardığı gibi bağırsak kaslarının hareketlerini de aktive etmektedir. Kalbin kasılma gücünü çoğaltan ve doğal bir kan inceltici olan zencefilin diğer kullanım alanları arasında idrar yolları ve alt batin bölgesindeki ağrılar, öksürük, bulantı, kan basıncını düşürme ve boğaz ağrıları bulunmaktadır (Özata, 2009; Lust, 2000).

Zencefilin *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*, *Candida albicans* üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösterdiği, çeşitli fungal ve bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği yapılan çalışma ile kanıtlanmıştır (Bellik, 2014). Bununla birlikte özellikle bebekler ve çocuklarda bronşiolitin sebeplerinden biri olan respiratuar (solunum) sinsityal virüsü (HRSV)'ne karşı yapılan etkinlik çalışmasında zencefilin anti viral özelliği de ortaya konulmuştur (Chang et al., 2013).

Bu etkilerinin yanı sıra, safra taşı olan kişilerin zencefil kullanmaları önerilmemektedir. Ayrıca doğal bir kan inceltici olduğundan anti koagülinlerle ve tansiyon ilaçlarıyla birlikte kullanımı kanama riskini arttırabilme ihtimali bulunmaktadır. Şeker düşürücü ilaçlarla birlikte kullanımı ise kan şekeri düşüşünü arttırabilmektedir (Özata, 2009).

1.4.16. *Peganum harmala* Linn. (Üzerlik)

Nazar otu, yabani sedef otu olarak da isimlendirilen üzerlik, *Nitrariaceae* familyasına ait olup Asya, Afrika ve Amerika'nın sıcak bölgelerinde yetişen bir bitki türüdür (Yalçın, 2005). Üzerlik, tek tek yeşilimsi beyaz çiçekli, çok dallı, 35 cm kadar boyunda, çok yıllık, otsu bir step bitkisidir. Basık küre şeklinde kapsül meyveleri olan üzerliğin tohumlarının içeriğinde kütlece % 4,3 – 5,6 harmalin, harmin, (w/w) harmalol, peganin adlı glikozitler, kırmızı boya maddesi ile 93,39 g/kg fenolik bileşikler ve 1,60 g/kg flavonoit bulunur. Üzerliğin bütün kısımları drog elde etmek amacıyla kullanılabilmekle birlikte, özellikle uyuz ve cilt hastalıklarının tedavisinde kurutulmuş formu kullanılmaktadır (Yalçın, 2005).

Anti-oksidant ve anti-inflamatuar etkileri kanıtlanmış olan üzerliğin lösemi, mesane ve larinks kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar sonucunda anti kanser potansiyeli de ortaya konmuştur (Khlifi et al., 2013). Bir başka çalışma ise, üzerlikten izole edilen peganin hidroklorürün gastroprotektif (mide koruyucu) etkisi üzerinde gerçekleştirilmiş ve anti-ülser etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Singh et al., 2013). Üzerik kökleri % 0,2 harmin, % 1,4 harmol içeriğinden dolayı insan monoamin oksidaz (MAO-A) genini inhibe ettiği üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiş, dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi amin nörotransmitterlerini parçalayan enzim olan MAO-A'nın inhibe etmesi, üzerliğin iyi bir antidepresan özellik gösterdiğini ortaya konmuştur (Herraiz et al., 2010).

1.4.17. *Juniperus communis* Linn. (Ardıç)

Cupressaceae familyasından olan ve genellikle 60 ile 180 cm boyunda olan ancak 15 m'ye kadar boylanabilen ardıç, çoğu kez de çalı halinde olan ağaçtır. Kuzey Amerika'da Arktik dairesinden Meksika'ya kadar olan bölgelerde olduğu gibi Avrupa ve Asya'da da kuru, taşlı topraklarda yetişen bir bitkidir. Uçları sivri ve batıcı olan iğne yaprakları 1,5 cm uzunluğunda dipleri geniş, uçlara doğru daralmaktadır ve çiçekleri çoğunlukla iki evciklidir. Çiçek açma zamanı Nisan ile Haziran ayları arası olan ardıç meyveleri 5 - 6 mm çapında üzüksü kozalak saplı olup ilk sene yeşil ikinci yılda ise mavimsi siyahtır ve 2 - 3 yılda olgunlaşır (Lust, 2000).

Yumuşak meyvelerinden, odunundan ve iğne yapraklarından su buharı distilasyonu ile elde edilen, su gibi renksiz ya da uçuk sarı renkli, taze, odunsu, balsamik kokulu akışkan bir sıvı olan uçucu yağının bileşiminde terpen, pinen, limonen, sedrol ve sabinen yer bulunmaktadır (Özata, 2009). Ayrıca içeriğinde bulunan ve biyolojik aktiviteye sahip olan kommunik asit, izokupresik asit ve deoksipodofilotoksin maddeleri ile yapılan çalışma sonucunda, ardıcın antibakteriyel özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır (Carpenter et al., 2012). Hep2G (Hepatoselüler kanser hücre hattı), MCF-7/AZ (göğüs kanseri hücre hattı) ve HGC27 (mide kanseri hücre hattı) ile yapılan sitotoksikite analizleri doğrultusunda bu hücrelerin canlılığında % 50'den daha fazla azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Taviano et. al., 2013). Bu etkilerinin yanı sıra, gaz giderici ve idrar söktürücü etkisi olan ardıcın, bünneyi yıpratıcı ürünlerin zararlı etkisi altındaki vücudun toksinlerden temizlenmesine yardım ettiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lust, 2000). Genital ve üriner sistemler üzerine etkili olan ardıç uçucu yağının, güçlendirici, antiseptik ve doku sıkıştırıcı özellikleri ile akne sulu egzama gibi cilt sorunlarına karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bunlara

ek olarak, hemoroit tedavisi ile saç dökülme problemlerinde kullanılan ardıc aynı zamanda yaraların iyileşmesine yardımcı olan çok iyi bir dezenfektandır (Özata, 2009). Yukarıda sayılan durumların dışında, böbrek - mesane kum ve taşı, idrar yolları iltihabı, mesane iltihabı, soğuk algınlığı, gut, romatizma, damar sertliği, şeker hastalığı, ruhsal ve bedensel çöküntü gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedir (Yalçın, 2005).

Hamilelerde ve böbrek rahatsızlığı olan kişilerde kullanılmaması önerilmemektedir (Özata, 2009, Yalçın, 2005).

1.4.18. *Nigella sativa* Linn. (Çörek Otu)

Ranunculaceae familyasına ait olan bitki, siyah kimyon, siyah susam, kara çörek, şevkerak olarak da bilinen çörek otu, güney ve güney batı Asya'da doğal olarak yetişmekte ve boyu 20-30 cm'ye kadar ulaşabilmektedir (Yalçın, 2005). Kullanılan kısımları arasında özellikle tohumları yer almaktadır ve tohumlarının bileşiminde uçucu yağlar, tanen, linoleik asit, saponinler, nigellin, melantin ve connigellin gibi alkaloitleri içermektedir. Melantin yüksek doz kullanımı toksik olmakla birlikte nigellin de paralitik (felç etkisi) etkisi söz konusudur. Mide ve bağırsak gaz rahatsızlıklarında, bağırsak parazitleri gibi hastalıkların tedavinde etkilidir. Ayrıca aperatif, iştah açıcı, uyarıcı, süt arttırıcı ve idrar söktürücü özellikleri de bulunmaktadır (Yalçın 2005).

Sıçanlar üzerinde çörek otu ile yapılan toksisite çalışma sonucunda, akut etki olarak davranışlarda değişiklik ve ishal tespit edilmiş olup LD₅₀ değeri 28,8 mg/kg olarak hesaplanan bitkinin, kronik toksisite çalışmasının sonucunda çeşitli biyokimyasal ve hematolojik değişimler incelenmiştir. Serum kolesterol seviyesi, trigliseritler ve glukoz seviyesinde düşüş, HDL, hematokrit ve hemoglobin seviyesinde ise artış ayrıca lökosit ve kan platelet miktarlarında da azalma belirlenmiştir (Zaoui et al., 2002). Merkezi sinir sistemi üzerine nörofarmasötik bir çalışma sonucunda çörek otunun, özellikle metanol ekstresinde sedatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Farelerde üzerinde yapılan analizler ile spontan motor ve kas aktivitelerinde azalma görülmüş bununla birlikte çörek otunun analjezik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Naggar et al., 2003).

Bitkinin diğer etkileri arasında astım tedavisinde kullanımı ile (Boskabady and Takaloo, 2010), anti tümoral (Nair et al., 1991; Salomi et al.,1992; El-Daly, 1998) ve antibakteriyal aktiviteleri (El-Kamali et al., 1998; Mouhajir et al., 1999) bulunmaktadır.

1.4.19. *Hypericum perforatum* Linn. (Kantaron)

Kılıç otu, mayasıl otu, püren, bin bir delik otu ve koyun kıran olarak da bilinen kantaron, *Hypericaceae* familyasına dahil bir bitki türüdür (Yalçın, 2005). Kuzey Amerika'nın doğusu ve Pasifik kıyıları da dahil dünyanın kuru, taşlı topraklar, tarlalar ve güneşli olan her yerde yaygın olarak bulunan çalimsı, çok yıllık bir bitkidir. Odunsu, dallı bir kök, tabandan bir sürü sürgünler veren pek çok yuvarlak gövde üreten kantaron, Haziran ayından Eylül ayına kadar çiçek açmaktadır (Lust, 2000). Kantaronun Hristiyan mistiziminde önemli bir yeri vardır. Yaklaşık 1300 yıldan beri Hristiyan geleneğinin sembolik bir bitkisi olarak kabul görmekte ve Avrupa ülkelerinde St. John Wort olarak bilinen bu bitkinin rivayetlere göre ismi Yahya (Johannas) peygamberden gelmektedir. İncil'de geçen bir olayda, Yahya peygamber, Hristiyanlar için mucizevi bir bitki getirmiş olup bu bitki *H. perforatum*'dur. Diğer bir rivayet ise haçlı seferleri sırasında yaralanan St. John şövalyelerinin yaralarının tedavisi bu bitki ile yapıldığından bu ismi aldığı şeklindedir (Üstün, 1998).

Kullanılan kısımları arasında sapları ve çiçekleri bulunan kantaron, terebentin benzeri bir kokuya sahiptir. Çiçeklenme döneminde, bitkinin çiçek ve tomurcukları veya tüm toprak üstü kısımları toplanarak hemen kurutulduktan sonra kullanılır. Bileşiminde reçine, pektin, kolin, zamk, hiperisin, hiperforin, gensiopikri, eritramin, eterik yağ ve nikotin asidi bulunan bitkinin, kuvvet verici, iştah açıcı, ateş düşürücü, mide bağırsak spazmlarını çözücü, yatıştırıcı ve kanama durdurucu özelliği bulunmaktadır. Çeşitli cilt problemlerinde, yaralarda, eziklerde sürülerek kullanılmaktadır. Ayrıca gastrit, mide ülseri, damar sertliği, bronşit ve gece beynin pineal bezinden melatonin salınımını arttırdığı için uykusuzluk gibi rahatsızlıklarda da kullanımı söz konusudur (Yalçın, 2005). Kantaronun diğer etkileri arasında spazm çözücü, kansızlık, baş ağrısı ve nezle durumları sayılabilmektedir. Yapısında yer alan hiperisin ve pseudohiperisin bitkiyi böcek ve zararlı hayvanlara karşı koruyan bileşiklerdir. Ayrıca hiperisin tümör hücreleri ve virüsler üzerine güçlü bir fotodinamik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Yücel, 2006).

Kantaron, hafif ve orta şiddete depresyonlarda, melankoli durumunda alternatif bir antidepresan ilaç olarak önerilmektedir. Bitkinin antidepresan özelliği hayvan deneylerinde ve çeşitli klinik deneylerde kanıtlanmıştır (Rodríguez-Landa and Contreras, 2003). Bununla birlikte lipit peroksidasyonunu inhibe ederek (Hadjur et al., 2006) antioksidan özellik gösterdiği (Sánchez-Muniz et al., 2012), ayrıca antimikrobiyal aktiviteye de sahip olduğu ortaya konulmuştur

(Saddiqe et al., 2010). Son yıllarda yapılan araştırmalar sayesinde bu tıbbi bitkinin antitümör (Colasanti et al., 2000), antiviral (Tang et al., 1990) ve hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Bilinen yan etkileri arasında, aşırı kullanımı deriyi ışığa karşı duyarlı hale getirdiği ve çiftlik hayvanlarında zehirlenmeye yol açabileceği bulunmaktadır. Ayrıca hamileler tarafından kullanılması önerilmemektedir (Lust, 2000).

1.4.20. *Valeriana officinalis* Linn. (Kedi Otu)

Kedi otu, *Valerianaceae* familyasına ait olup yabani kedi otu olarak da bilinmektedir. 1,5 metre yüksekliğe kadar erişebilen, beyaz çiçekli, çok yıllık otsu bir bitki olan kedi otu, Türkiye’de yaygın olmakla birlikte, ayrıca Avrupa, Amerika ve Japonya’da da kültüre edilmektedir. Tedavi edici kısmı olan kökleri, sonbaharda topraktan çıkartılarak temizlenir ve küçük parçalar halinde kurutularak saklanmaktadır (Özata, 2009). İçeriğinde uçucu yağ olarak valerianik asit, iridoitler, nişasta, tanen, bronil, isovalerat, kumarin, pinen, terpinen, terpinol, hesperidin ve karvakol gibi maddeler yer alan kedi otunun yatıştırıcı, spazm çözücü ve stres giderici özelliği bulunmaktadır (Yalçın, 2005). Diğer etkileri arasında gaz giderici, uyuşturucu özelliği bulunan kedi otu, her türlü sinirsel durumda, migren ve uykusuzluk gibi sorunlarda etkilidir. Histeri, sinir zafiyeti, yorgunluk gibi rahatsızlarda kullanılmasının yanı sıra tansiyon düşürücü olarak ve romatizma ağrılarında da kullanılmaktadır (Lust, 2000).

Kedi otunun yapısında bulunan mononorseskiterpen olan volvalerenone A’nın, sinaptik aralıktaki asetilkolini inaktive eden enzim olan asetilkolinesteraz (AChE) üzerine zayıfta olsa inhibitör etkisi bulunmaktadır (Wang et al., 2010). Son yıllarda deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda kedi otunun, anksiyolitik (anksiyete tedavisinde kullanılan bir başka deyişler kaygı ve korku giderici etkiye sahip ilaçlar) etkisi ortaya konmuştur (Murphy et al., 2010). İnsan lökosit hücrelerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda herhangi bir genotoksik veya sitotoksik etkisinin olmadığı kanıtlanan kedi otunun, antioksidan kapasitesi nedeniyle oksidatif stres hasarını indirgeyen ve beyin hasarına karşı koruyucu nöroterapötik özelliğinin olduğu belirlenmiştir (Kandem et al., 2013).

Bilinen yan etkisi olmamakla birlikte yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımı zehirlenmelere neden olabilmektedir (Lust, 2000).

1.4.21. *Melissa officinalis* Linn. (Melisa)

Lamiaceae familyasına ait olan melisa; oğul otu, kovan otu, temre otu, limon otu, turunç otu olarak da bilinmektedir (Yalçın, 2005). Kullanılan kısımları arasında çiçeklerin tepe kısmı, yaprakları ve yağı bulunan melisanın anayurdu Akdeniz ve çevresi olmakla birlikte; Macaristan, Mısır ve İtalya'da kültürü yapılmaktadır. (Özata, 2009).

Headspace solid-phase mikro ekstraksiyon (HS-SPME) Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile gerçekleştirilen analizler sonucunda melisanın % 57,8 ile % 78,5 oranında monoterpen, % 14,9 ile % 29,7 oranında seskiterpen içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca % 31,1 sitronellal, % 18,3 sitronellol, % 12 β -karyofilen, % 11,9 (*E*)-sitral, % 9,6 (*Z*)-sitral ve % 3,6 oranında geraniol yapısında bulunmaktadır (Rehman et al., 2013). Bunlarda birlikte, içeriğinde fenolik asitler; hidroksisinamik asit (% 6 rosmarinik asit, *p*-kumarik ve kafeik asit, gallik asit, klorojenik asit, ferulik asit), flavonodiler; kemferol, luteolin, kuersetin, apigenin, taninler ve asidik triterpenler (ursulik ve oleanolik asit gibi) yer almaktadır. Rosmarinik asit sebebiyle anti inflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral özelliği bulunan melisa, içeriğinde yer alan ferulik ve klorojenik asit sebebiyle de güçlü antioksidan, anti trombotik ve anti kanser aktiviteye sahiptir (Arceusz ve Wesolowski, 2013). Üç ay süre boyunca mangan ile oksidatif stres oluşturulmuş fare beyinlerinde melisanın etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, beyin hipokampus ve striatum bölgelerinde TBARs (Tiyobarbiturik asit) seviyeleri ölçülmüş, artan mangan indüklü oksidatif stresin melisa uygulaması ile azaldığı, bunun sebebinin de bitkinin antioksidan özelliğinden dolayı gerçekleştiği belirtilmiştir (Martinsa et al., 2012). Özellikleri arasında beyin, kalp, rahim ve sindirim sistemi üzerinde koruyucu-kuvvetlendirici, spazm çözücü, ruhsal ve fiziksel sakinleştirici, hazmı kolaylaştırıcı, bağırsak parazitlerini düşürücü etkileri bulunan melisanın, hazımsızlık, depresyon, anksiyete, kulak çınlaması, baş dönmesi, histeri ve melankoli gibi durumlarda da kullanılması önerilmektedir. Ayrıca canlandırıcı, yara iyileştirici ve mikrop öldürücü özelliği de bulunmaktadır (Yalçın, 2005). Uçucu yağının, zihin ve beden üstüne genel güçlendirici etkisi olduğu bilinmekte olan melisa ayrıca yüksek kan basıncını düşürmeye yardım etmekte, hızlı soluk alıp vermeyi ve çarpıntıları yatıştırmakta ve migreni hafifletmekte yararlıdır (Özata, 2009).

Mide ülseri ve mide iltihabı olan kişilerde kullanılması önerilmeyen melisanın bilinen bir yan etkisi bulunmamaktadır (Yalçın, 2005).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Polih herbal formülasyon

Standardize edilmiş KL21 polih herbal formülasyonu, Naturin Doğal Ürünler İlaç ve İlaç Hammaddeleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi (Gaziemir, İzmir) tarafından hazırlanarak, çalışma süresince tarafımıza sağlanmıştır. Formülasyon, havadar ve gölge bir alanda kurutularak, mekanik öğütücüde toz edilmistir. Kurutulmuş toz kısımları (20 g), sırası ile, 200 mL Etanol (EtOH) ve 200 mL Metanol (MeOH) ile yaklaşık oda sıcaklığında, ultrasonik su banyosunda 3 saat süre ile 2 defa ekstre edilmiştir (Kenny et al., 2014). Ekstreler süzülerek birleştirilmiş, 40 °C’de vakum altında evaporatörde kuruyana kadar yoğunlaştırılmıştır. Etanolik ekstre miktarı 32 mg ve metanolik ekstrenin miktarı 27 mg olarak hesaplanmıştır.

2.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar ve kitler

KL21 polih herbal formülasyonunun olası mutajenik potansiyelini tespit etmek amacıyla Ames MPF Penta I kiti (Cat No: 10512, 10512S1P) Xenometrix firmasından, RNA izolasyon ve Apoptoz kitleri içeriğinde yer alan Tripure Isolation Reagent (Cat No: 11667157001), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No: 04379012001), LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Cat No: 03003230001), RealTime ready Human Apoptosis Panel’i (Cat No: 05392063001) Roche’dan, Hücre migrasyon denemesi kiti Cellbiolabs Inc.’tan, DMSO (Cas No: 67685) ve Giemsa Boya (Cas No: 51811826) Sigma firmasından satın alınmıştır. Histolojik incelemeler sırasında kullanılan tripsin (Chemical Co.St.Loıs, MO) Sigma’dan, Biotinylated secondary antibody ve streptavidin konjuge horse radish peroxidase (Cas No: 85-9043, San Francisco, CA) Zymed’dan satın alınmıştır.

2.1.3. Deney hayvanları

Bu çalışma, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Biriminde, Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ nun, 24.02.2012 tarih ve 2012 - 032 no’lu onayı ile gerçekleştirilmiştir.

İzmir Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş 8-10 haftalık, ağırlıkları 20-25 g arasında değişen $n= 20$ adet erkek ve $n= 20$ adet dişi Swiss albino deney fareleri subakut toksisite çalışmasında, $n= 5$ adet fare ise akut toksisite çalışmalarında kullanılmıştır. Erhlich ascites tümör modeli çalışmaları için 35 adet Balb-c albino fare Kobay Deney Hayvanları Labratuvarı A.Ş. (Ankara)' den; HET-CAM denemesinde kullanılacak Leghron tavuk yumurtaları da Abalıoğlu A.Ş.'den satın alınmıştır. Hayvanlar çalışmaya başlamadan 15 gün önce deney ortamına alınarak deneye hazırlanmıştır. Fareler kontrol ve deney grupları için tesadüfi olarak seçilmiş ve 5'erli gruplar şeklinde kafeslere yerleştirilmiştir. Çalışma süresince hayvanlar, Tecniplast firmasından satın alınan, her biri bireysel havalandırmaya sahip ve mikrobiyolojik kontaminasyonu önlemek adına 0,2 mikron por çapında filtreli kafeslerde tutulmuşlardır (Şekil 2.1). Laboratuvar sıcaklığı 20-24 °C ve nispi nem % 45-65 olarak düzenlenmiş ve günde 3 defa kontrol edilmiştir. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu uygulanmıştır. Deney hayvanlarının beslenmeleri için yeteri kadar standart laboratuvar yemi (pellet) ve su kullanılmıştır. Yem ve su günlük olarak değiştirilmiştir.



Şekil 2.1 Deney Hayvanlarının Tutulduğu Kafesler

2.2. Metot

2.2.1. Total fenolik ve flavonoid içeriğın belirlenmesi

2.2.1.1. Spektrofotometrik Yöntem

Total fenolik içerik Folin-Ciocalteu metodu ile belirlenmiştir. (Meda et al, 2005). Öncelikle, miktarları 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL çözünmüş 0,1 mL ekstre, 28 mL deiyonize su ile karıştırılmıştır. Bu çözelti, 2 mL % 2'lik sodyum karbonat ve 0,1 mL 0,1 N Folin-Ciocalteu ajanı ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında karışımın absorbansı, deiyonize su içeren köre karşılık 750 nm'de UNICAM 8625 UV/Vis spektrofotometre ile standart olarak Gallik asit (GA) (Fluka Cas No: 149917) kullanılarak ölçümler yapılmış ve veriler mg gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Total flavonoid içerik Chang et al. (2002) tarafından tanımlanan alüminyum klorür kolorimetrik metoduna göre belirlenmiştir. 0,5 mL ekstre (0,5 mg/mL ve 1 mg/mL) 1,5 mL etanol, 0,1 mL % 10'luk alüminyum klorür ve 2,8 mL distile su ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika tutulduktan sonra, absorbans 450 nm'de UNICAM 8625 UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Quercetin (QE) standart olarak kullanılmıştır. Flavonoid miktarı quercetin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

2.2.1.2. Kromatografik Yöntem - GC-MS Cihazı ile İçerik Analizi

Gaz kromatografisi (GC), fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklardan yararlanarak bir karışımı oluşturan bileşiklerin birbirinden ayrılmasıdır. Kütle spektroskopisi (MS) ise halen bulunan tüm analitik yöntemlerin en geniş uygulama alanına sahip olanıdır ve maddelerin elementsel bileşimlerinin belirlenmesinde; inorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında; karmaşık karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde; katı yüzeylerinin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında, bir numunedeki atomların izotopik oranlarının bulunmasında oldukça yararlı bir yöntemdir (You et al., 2003). Çalışmamızda KL21 polihırbal formülasyonunun etanolik ve metanolik ekstralarının içeriklerinin belirlenmesi için ekstralardan 1'er mg örnek alınmış 10 mL asetonda çözöndürölmüştür. Homojenize edilen örnekler Çizelge 2.1'de özellikleri verilen GC-MS cihazına verilmiş ve içerik analizi gerçekleştirilmiş, elde edilen veriler Wiley 7 Lib.'de taranmıştır.

Çizelge 2.1 GC-MS Cihazının Özellikleri

Cihaz	Shimadzu QP 2010 plus GCMS
Kolon	Rtx-CL
Kolon Uzunluğu	20 m
Kolon Çapı	0,18 mm
Kolon Film Kalınlığı	0,14 µm
Başlangıç Basıncı	350 kPa
Taşıyıcı Gaz	He
Başlangıç Akış Hızı	1 mL/dakika ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı	250 °C
Başlangıç Sıcaklığı	70 °C
Başlangıç Bekleme Süresi	3,00 dakika
Isıtma Hızı	15.00 °C/dakika
Final Sıcaklığı	300 °C
Final Bekleme Süresi	6,00 dak.

2.2.2. Biyolojik aktivitenin belirlenmesi

2.2.2.1. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

2.2.2.1.1. DPPH radikalini süpürme kapasitesi

Bitki ekstresinin DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikalini süpürme kapasitesi Blois yöntemine göre ölçülmüştür (Turkoglu et al., 2006). 100 µL ekstre (0,5 mg/mL ve 1 mg/mL), 4 mL DPPH'nin % 0,004'lük metanol çözeltisine eklenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığındaki 30 dakika inkübasyondan sonra absorbans karşılaştırma amacıyla standart olarak Tocopherol (TOC) (Fluka Cas No: 10191410) kullanılarak 517 nm'de köre karşı UNICAM 8625 UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüş ve inhibisyon (I) yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$I (\%) = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

(A_{blank} : kontrol reaksiyonun absorbansı ve A_{sample} : test edilen maddenin absorbansıdır)

2.2.2.1.2. ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi

Ekstrelerin total antioksidan aktivitesi ABTS⁺ renksizleştirme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. ABTS, her sülfat başına potasyum ile mavi/yeşil ABTS⁺ üretir. Oluşan radikal 734 nm'de maksimum absorbans gösterir. Antioksidanlar, katyon radikale bir hidrojen atomu transferi ile renksizleştirmeye neden olur. Bu yöntemde, 5 mL, 7 mM ABTS ve 88 µL, 140 mM K₂S₂O₈ karıştırılmış ve oda sıcaklığında 12-16 saat boyunca karanlıkta radikal oluşumu tamamlanması için bekletilmiştir. Stok solüsyonu 734 nm'de 0,75 absorbans veren PBS (fosfat tampon çözeltisi) (pH: 7,4) ile seyreltilmiştir. Ekstrelerin 1 mL'sine seyreltilmiş stok solüsyonundan 2 mL eklenmiş ve kör olarak PBS kullanılmıştır. 5 dakika sonra başlangıçtaki karışımın 734 nm'de absorbansı ölçülmüş ve deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Total antioksidan aktivite yüzdesi aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmış ayrıca trolox pozitif kontrol olarak (0,5 µg/mL) hazırlanmış ve ekstrelerin "Relatif Antioksidan Aktivitesi" (RAA) hesaplanmıştır.

$$\text{TAA \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c : Stok solüsyonun absorbansı

A_s : Ekstrelerin absorbansı

$$\text{RAA} = \frac{\text{TAA \% ekstre}}{\text{TAA \% standart antioksidan bileşiği}} \times 100 \quad (0,5 \mu\text{g/mL trolox})$$

2.2.2.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

2.2.2.2.1. Minimum inhibitör konsantrasyonu yöntemi (MIC)

KL21 polih herbal formülasyonun etanol ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ölçümü ile değerlendirilmiştir. MIC değerleri, National Committee of Clinical Laboratory Standards tarafından geliştirilen prosedürlere göre mikrodilüsyon denemesi ile belirlenmiştir (NCCLS 2003). *In vitro* antimikrobiyal çalışmalar, American Type Culture Collection (ATCC) ve Biomeriuex BTF ve Microbiologics firmalarından ticari olarak satın alınan gram negatif, gram pozitif bakteri suşları, küf ve maya'ya

karşı gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 MIC Metodunda Kullanılan Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar ve Suşlar	
Gram Pozitif Bakteriler	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228
	<i>Bacillus cereus</i> , ATCC 7064
	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212
Gram Negatif Bakteriler	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 8739
	<i>Salmonella typhimurium</i> , ATCC 14028
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , ATCC 13883
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853
Maya	<i>Candida albicans</i> , ATCC 10231
Küf	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , ATCC 16404

Bakteri suşları Mueller-Hinton Broth’a (Difco, Cas: 221275) inokule edilmiş ve 24 saat $37 \pm 0,1$ °C’ de, Funguslar ise Sabouraud milieu liquide (Biomerieux, Lot: 100960600) inkübe edilmişlerdir. Bakteri suşlarının inokulumları 24 saatlik broth kültürden hazırlanmış ve süspansiyonlar 0,5 McFarland standart turbiditeye göre ayarlanmıştır.

Steril 96’lık mikrolaka kuyucukları, bakteriler için Mueller-Hinton broth, funguslar için Sabroud dekstroz broth’a inokulum ($1,5 \times 10^8$ kob/mL) ve KL21 polihherbal formülasyonu eklenerek hazırlanmıştır. Son kuyucuk negatif kontrol olarak kullanılmış ve plakaların üzeri steril kapaklarıyla örtülmüştür. Bakteriler 37 °C’de 24 saat, Funguslar ise 25 °C’de 72 saat inkübe edilmişlerdir. KL21 polihherbal formülasyonunun metanol ve etanol ekstraktları her organizmaya karşı 2’şer kez test edilmiştir. MIC değeri, ekstrenin mikroorganizmaları öldüren en düşük konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Standart antibiotik Gentamisin (Sigma, Cas: 1405-41-0) ve Nystatin (Sigma, Cas: 1400-61-9) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca üreme olduğu tespit edilen kuyucuklardan alınan örnekler Mueller-Hinton Agar (Difco, Cat No: 221275) ve SDC (sabouraud dextrose chloramphenicol, Biomerieux, Ref No: 43596) içeren petri kaplarına nokta ekim yapılarak kontrol edilmiştir (Kajaria et al., 2012).

2.2.3. Toksisite testleri

2.2.3.1. In vitro sitotoksisite testi

Hücre Hatları: MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-22), A549 (İnsan Akciğer karsinom hücre hattı, ATCC-CCL-185), CaCo-2 (İnsan kolon kolektoral adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-37), HEK (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573) ve HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı, ATCC-CCL-2) sitotoksisite testlerinde kullanılmıştır. Hücre hatları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü hücre kültür koleksiyonundan temin edilmiş olup çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim laboratuvarından (AREL) gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültürü: Hücreler, % 10 Fetal Sığır Serum (FBS, Biological Industries, Cat: 04-121-1), %1 L-glutamin (Biological Industries, Cat: 41-218-100), % 1 gentamisin (Biological Industries, Cat: 03-035-1C), % 2 NaHCO₃ (% 5,5) (Sigma, CAS Number 144-55-8), 1 mM HEPES (Biological Industries, Cat: 03-025-1B), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Ham's F12 besiyeri ortamı (Biological Industries, Cat: 01-170-1B) içerisinde 37°C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması kültür kabını % 80 kapladıktan sonra flasklarda pasajlama yapılarak sağlanmıştır.

Pasajlama ve Hücre Sayımı: DMEM F12 besi ortamı içerisinde aktif olarak çoğalan hücreler, Inverted Research Mikroskop (Olympus Ix71, Japan) altında incelenerek, sitotoksisite testi için istenilen hücre sayısına ulaşıp ulaşılmadığı belirlenmiştir. Logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler sitotoksiste testlerinde kullanılmıştır.

Hücrelerin hemositometrik sayımı için tüm hücre hatlarının besiyeri ortamı uzaklaştırılmış ve hücre hatlarının flaks içerisindeki çoğalma yüzeyine Trypsin (Biological Industries, Cat: 03-051-5C) (75 cm²'lik flask yüzeyi için 1 mL, 25 cm²'lik flask yüzeyi için 0,5 mL) eklenerek, 37°C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Her hücre hattının inkübasyon süresi, tripsin uygulanmış flasklardaki hücrelerin çoğalma yüzeyinden kalkması ve eklenen tripsin içerisinde süspanse hale gelmesi ile orantılı olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler süspanse hale geçtikten sonra her flaska uygun konsantrasyonlarda DMEM F12 besi ortamı eklenerek, flask içeriği 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika (Eppendorf, 5810 R, Hamburg, Germany) santrifüjlenmişlerdir. Tüplerdeki üst faz uzaklaştırıldıktan

sonra hücre sayımı yapabilmek için % 10'luk bir dilüsyonda 100 µL hücre/ 900 µL DMEM olacak şekilde 0,2 mL'lik falkon tüplerine aktarım yapılmıştır. Hemositometrik lama (Neubauer) % 10 dilüsyonda 50 µL'lik hücresel süspansiyon eklenerek mikroskop altında, kullanılan hemositometrik metota uygun olarak mL'de ki hücre sayısı hesaplanmıştır. Sayımı yapılan hücrelerden hazırlanan stok hücre solüsyonları sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Hücre Canlılığı ve Sitotoksite Testi: MTT testi, hücre canlılığını, büyümesini ve hücrelerin aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik testtir. Test, yaşayan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim kapasitesine bağlı suda çözünen sarı renkli MTT substratının, suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazan substratına dönüştürülmesi esasına dayanır. Üretilen formazan miktarı direk olarak canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi bölünmeyen ancak hala aktif olan hücrelerin belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Fatokis, 2006).

1×10^5 hücre/mL konsantrasyondaki hücreler 96 gözlü hücre kültürü kaplarına 100'er µL'lik hacimlerde ekilmiştir (1×10^4 hücre/kuyucuk). Bu hücreler, 24 saat 37 °C'de, % 85 nem ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek 24 saat sonra üzerlerindeki ortamlar uzaklaştırılmış, yerlerine farklı konsantrasyonda hücre kültürü ortamında dilüe edilmiş KL21 ekstresi eklenmiştir (Çizelge 2.3). Hücre canlılığı, inkübasyonun 48. saatinde 5 mg/mL konsantrasyonda MTT (30 µL/kuyucuk) (Ambresco, CAS Number: 298-93-1) solüsyonu eklenerek 4 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra formozan kristalleri DMSO (200 mL) ile çözülüp 570 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada Thermo Scientific, Multiskan Spectrum' dan (Waltham, USA) yararlanılarak her bir 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarında hücre canlılığı belirlenmiştir. Her bir hücre hattı için uygulanan dozda, kontrol ile karşılaştırılarak, hücre canlılığı ve maddelerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.3 KL21 Poliherbal Formülasyonunun Maruziyet Dozları

Ana Stok Konsantrasyon	10 mg/mL		
Uygulama Dozları	I. Doz (mg/mL)	II. Doz (mg/mL)	III. Doz (mg/mL)
	10	1	0,1

Çizelge 2.4 Maruziyet Dozuna Bağlı Hücre Canlılığının Hesaplanması

% Canlılık	$\frac{\text{Uygulanan dozdaki ortalama absorbens}}{\text{Kontrol hücre absorbens}} \times 100$
------------	---

Morfolojik İnceleme: Farklı konsantrasyonlarda ekstraktlara maruz bırakılmış hücrelerin 48. saatteki morfolojik incelemeleri Olympus Ix71 Inverted Research mikroskop altında yapılarak, DP71 Camera Instruction aracılığı ile fotoğraflanmıştır.

Veri Analizi: Sitotoksosite, herhangi bir ajana maruz bırakılmamış kontrol $\pm$ SD'e bağlı olarak yüzde artış şeklinde belirlenmiştir. Kontrol değeri % 0 sitotoksik olarak alınmıştır. Sitotoksosite verileri sigmoidal eğriye oturturulmuş ve herhangi bir madde uygulaması yapılmamış kontrol grubuna kıyasla % 50 inhibisyona neden olan madde konsantrasyon değeri olan IC₅₀ değerinin hesaplanmasında 4 parametrelili lojistik model kullanılmıştır. IC₅₀, deneysel koşullar altında hücre büyümesini % 50 azaltan konsantrasyon değeridir. Bu değer en az üç tane birbirinden bağımsız tekrarlanabilir ve istatistiksel olarak anlamlı hesaplamanın ortalamasıdır. IC₅₀ değeri % $\pm$ 95 güven aralığında belirlenmiştir. Bu analiz GraphPad Prism (San Diego, CA) ile yapılmıştır.

2.2.3.2. In vitro genotoksik etkinin belirlenmesi

2.2.3.2.1. Salmonella / mikrozom (AMES) mutajenite testi

Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan Ames Testi “*Salmonella*-mikrozom test sistemi” olarak da bilinmektedir. Ames testi mutajen-karsinojen etkisi bilinen kimyasallar ile geçerliliği açıkça kabul edilmiş, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Organizasyonu (Organisation for Economic Co-operation Development) tarafından standardize edilmiş bir testtir (OECD 471).

Bu test, yapay olarak mutasyona uğratarak histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş (*His*⁻, oksotrofik, His gerektiren) *Salmonella typhimurium* suşlarının test edilen kimyasal madde ile maruziyetinden sonra ikinci bir mutasyon geçirip yabanıl tip (*His*⁺, prototrofik, His üreten) hale geri dönüşmeleri temeline dayanır.

Çalışmamızda *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılmıştır. Bu bakterilerin genotipleri ve özellikleri Çizelge 2.5'te görülmektedir.

Çizelge 2.5 *Salmonella typhimurium* Suşlarının Genotipleri ve Özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	Mutasyon Tipi	Hedef	Hücre Duvarı	Onarım	pKm1 01	R-faktör
98	His D3052	Çerçeve kayması	GCGCGCGC GC yanından-1	Rfa	Δ uvr B	+	+
100	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	+	+
1535	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	-	+
1537	His C3076	Çerçeve kayması	C-C-C yanına +1	Rfa	Δ uvr B	-	+

His D 3052: His D⁺ geni histidinol dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır. his D 3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup nükleotid eksikliği his D⁻ geni içinde 8 kere tekrarlanan –GCGCGCGC- bölgesindedir. Bu nedenle suş daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülmektedir.

His G 46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lösin kodunu (GAG) yerine prolin kodunu (GGG) gelmesine neden olmaktadır.

His C 3076: +1 çerçeve kayması (near C-C-C run) tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülmektedir.

Rfa: Bu mutasyon hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit örtüsünü zayıflatarak normal hücrelere giremeyen benzopiren gibi büyük moleküllerin test bakterilerine girebilmelerini sağlamaktadır.

Δ : Delesyon, Uvr B geni “excision repair” de görevi olan bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas yapmaktadır.

+R: pKM101, Ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmittir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan ve hata frekansı yüksek olan “error-prone” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve bu nedenle de kimyasalların etkisiyle veya spontan olan mutasyonların artmasına neden olmaktadır.

Test Organizma ve Genotip Özelliklerinin Kontrol Edilmesi: Çalışma, Xenometrix firmasından temin edilen Ames MPF™ 98/100/1535/1537 kiti ile yapılmıştır. *Salmonella typhimurium* test bakterilerinin stok kültürleri de kit içeriği olarak Xenometrix firmasından temin edilmiştir. Testin güvenilirliği açısından test suşlarının genetik yapılarındaki mutasyon durumları Maron ve Ames (1983) tarafından geliştirilen yönteme uygun olarak Xenometrix tarafından yapılmış ve sertifikalandırılmıştır.

Metabolik Aktivasyon Sağlayıcı Sistemin (S9 Karışımı) Hazırlanması: Tüm bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik, unsur memelilerdeki detoksifikasyon/biyoaktivasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin bakterilerde olmayışıdır. Bu amaçla en yaygın kullanılan enzim preparatı, sıçanların enzim aktivasyonunun kimyasal ile uyarılmış haldeki karaciğer dokularından homojenize edilen ve S9 fraksiyonu olarak isimlendirilen mikrozomal enzim fraksiyonudur. Hücre homojenize edilirken endoplazmik retikulum membranı “mikrozom” denilen kürecikler haline dönüşür. Bu kürecikler biyotransformasyonda görev alan enzimlerin oldukça önemli bir kısmını içerir.

Çeşitli maddelerin biyoaktivasyonunu etkili bir şekilde arttırmak için, insan karaciğerine oranla daha kolay elde edilmelerinden dolayı, aroclor 1254 ile muamele edilmiş fare karaciğerlerinden elde edilen S9 fraksiyonu kullanılmaktadır ve bu çalışmada Xenometrix firmasından temin edilen % 30'luk S9 karışımı kullanılmıştır. S9 karışımının hazırlanması için gerekli kofaktör çözeltilerinin hazırlanışları ve saklama koşulları çizelge 2.6' da verilmiştir.

Çizelge 2.6 Kofaktör Çözeltilerinin Hazırlanışları

Stok Konsantrasyon	Kimyasal Madde	Toplam Hacim	Miktar	Saklama Koşulu	Ames için kullanılan miktarlar
1,00 M	KCl	50 mL	3,728 g	4°C	0,083 mL
0,25 M	MgCl ₂ ·6H ₂ O	50 mL	2,541 g	4°C	0,080 mL
0,20 M	Glukoz-6-fosfat	10 mL	0,564 g	-20°C	0,063 mL
0,04 M	NADP	10 mL	0,306 g	-20°C	0,250 mL
0,20 M	NaH ₂ PO ₄	100 mL	3,120 g	4°C	1,270 mL
-	S9 Fraksiyonu	-	-	-	0,750 mL

Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı: Bakterilere karşı mutajenik etkileri bilinen standart maddeler pozitif olarak her deneyde yapılmalıdır. Test ortamına S9 karışı ilave edilmesi veya edilmemesi durumları için farklı pozitif

kontroller kullanılmıştır. Her suş için kullanılan pozitif kontroller ve miktarları Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7 Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Suşlar	-S9’lu testler için kullanılan kimyasallar	Konsantrasyon	+S9’lu testler için kullanılan kimyasallar	Konsantrasyon
TA 98	2-nitrofluoren (2-NF)	2 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	25 µg/mL
TA 100	4-nitroquinolin N-oksit (4-NQO)	0,1 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	62,5 µg/mL
TA 1535	N ⁴ -aminositidin (N ⁴ -ACT)	100 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	125 µg/mL
TA 1537	9-aminoakridin (9-AA)	15 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	125 µg/mL

KL21 Poliherbal Formülasyonunun Uygulama Konsantrasyonlarının belirlenmesinde; test maddesinin seyreltilmesi işlemi sırasında 1 adet 96’lık seyreltme mikropakası, bakterilerin test maddelerine maruziyeti için 24’lük maruziyet mikropakası kullanılmıştır.

Ames Testinde; test maddesinin seyreltilmesi ve pozitif kontrol ilavesi için 96’lık seyreltme mikropakası, bakterilerin test maddesine maruziyeti için 24’lük mikropakası, maruziyet kültürlerinin mutajenik aktivitelerinin tespiti için 384’lük mikropakası kullanılmıştır.

Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması: Bakteriler, ayrı ayrı 50 mL’lik steril falkon tüplere 10’ar mL büyüme besiyeri içerecek şekilde konulmuştur. “Negatif kontrol” olarak etiketlenen 50 mL’lik steril falkon tüpüne de 5 mL büyüme besiyeri eklenmiştir. -20 °C’den çıkarılan bakteri tüpleri oda sıcaklığına çözünmeye bırakılmış ve ampsilin çözeltisinden % 0,1 oranında (10 µL) eklenmiştir. -80 °C’de saklanan bakteri kültürleri oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve üzerlerine 200 µL büyüme besiyeri ilave edilmiştir. Yarı katı pellet halindeki bakteriler steril pipet ucu ile mekanik olarak homojen hale getirilip bu karışımların 25 µL’si ampsilinli büyüme besiyeri içeren etiketlenmiş falkon tüplere ilave edilmiştir. Falkon tüpler inkübatörde 37 °C’de ve 250 rpm’de 14 - 16 saat çalkalanarak inkübe edildikten sonra bir gecelik kültürlerin OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunun en az 2,0 ve negatif kontrolün ise $\leq 0,05$ olması gerekmektedir.

Bakteri Kültürlerinin Test Maddesine Maruziyeti:

Test maddesinin sitotoksik konsantrasyonunun belirlenmesi: Ames testine başlamadan önce, tayin edilecek örneğin test ortamındaki       rl ğ  ve çalışılacak konsantrasyon aralığının bakteri suşu üzerine sitotoksik etkisi  n deneyle incelenmiştir. Test prosedürün de olduğu gibi, öncelikle 96 kuyucuklu mikropalakada test maddesi için seyreltme işlemi yapılmıştır ve 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakasına aktarılmıştır. Maruziyet besiyeri ve bir gecelik bakteri kültürü eklendikten sonra 37  C ve 250 rpm’de 90 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında kuyucuklar incelendiğinde bulanık olan kuyucuklar sitotoksik etkisi olmayan dozları berrak olan kuyucuklar ise yüksek sitotoksik etkili olan dozları göstermiştir. Buna göre yapılan inceleme sonrasında sitotoksisite gösteren en düşük doz, testte kullanılan en yüksek konsantrasyon olarak seçilmiştir.

Test maddesinin stok çözeltilerden gerekli seyreltilmelerin yapılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda mikropalaka kuyucuğundaki test maddesi 25 kat oranında seyrelceğinden test maddesinin deneydeki en yüksek konsantrasyonunun 25 kat konsantre çözeltisi hazırlanmıştır. Test maddesinin 96 kuyucuklu seyreltme mikropalakasından 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakasına aktarılması işlemi gerçekleştirilmiş ve hazırlanan tüm 24 kuyucuklu maruziyet plakaları 37 C ve 250 rpm’de 90 dakika çalkanarak inkübasyona bırakılmışlardır.

Mutajenik Aktivitenin Tespiti: 90 dakikalık inkübasyonun ardından inkübatörden çıkarılan 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakalarının her bir kuyucuğuna 2,8 mL indikatör besiyeri eklenmiştir. 24 kuyucuklu maruziyet mikropalakasındaki maruziyet kültürlerinin 384 kuyucuklu mikropalakaya aktarılması işlemi yapılmış ve bu plakalar kilitlenebilir plastik poşet içerisine dikkatlice yerleştirilmiş ve 37  C’lik inkübatörde 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2. günün sonunda inkübatörden çıkartılan mikropalakalar sayım için hazırlanmıştır.

2.2.3.3. In vivo akut toksisite testi

Akut Toksisite Testinde OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) Guideline No: 425 “Up and Down” referans alınarak “Limit Test” gerçekleştirilmiştir. Limit Test kapsamında 5 hayvan kullanılmıştır ve öncelikli olarak 1 hayvana tek doz uygulaması yapılmıştır. Eğer hayvan ölürse LD₅₀ değerinin belirlenmesi yoluna gidilir. Eğer hayvan 48 saat yaşarsa diğer 4 hayvan ek olarak kullanılır. Bununla birlikte 3 hayvan ölürse limit test

sonlandırılır ve “Ana/Esas Test”e geçilir. 3 ya da daha fazla hayvanın hayatta kalması durumunda LD₅₀ değeri 2000 mg/kg’dan büyüktür şeklinde sonuç elde edilmiş olur.

KL21 polihherbal formülasyonu, 175 mg/kg (1 fare), 550 mg/kg (1 fare) ve 2000 mg/kg (3 adet fare) konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hayvanlar, uygulamadan sonra 14 gün gözlem altında tutulmuşlardır.

2.2.3.4. In vivo subakut toksisite testi

Subakut toksisite denemesinde, deneysel dizayn olarak OECD Guideline 407 kullanılmıştır. Çalışmada, 6-8 haftalık (15-25 g ağırlığında) dişi (n= 15) ve erkek (n= 15) albino fareler (*Mus musculus*) kullanılmıştır. Deneme grupları, 2 doz grubu (her bir grupta 10 fare; 5 erkek ve 5 dişi) ve bir kontrol grubundan oluşmuştur.

Uygulamadan 1 hafta önce E.Ü. Argefar Faz Öncesi Araştırmalar Birim’e getirilen hayvanlar ilgili yönetmelik gereğince önce karantinaya alınmış sağlık taramaları gerçekleştirilmiştir. 1 haftalık karantina süresinin ardından ortama alışmalarını sağlamak amacıyla fare odasına alınıp ortalama ağırlıkları birbirlerine yakın ve her kafeste 5’er fare olacak şekilde düzenlenmişlerdir. Toksisite çalışmasına başlamadan önce her hayvandan anestezi altında (% 2 Alfazyne ve % 10 Alfamine i.p.) 200 - 250 µL kan alınmıştır. Toplanan kanlar, biyokimyasal ve hematolojik parametreler bakımından incelenmişlerdir. Daha sonra, KL21 polihherbal formülasyonunun uygulama dozları 900 mg/kg, orta doz 600 mg/kg ve düşük doz 300 mg/kg olacak şekilde belirlenmiştir. KL21 polihherbal formülasyonu, 28 gün boyunca her gün aynı saatte farelere oral olarak uygulanmış, kontrol grubuna ise, 28 gün boyunca serum fizyolojik oral uygulaması yapılmıştır (0,1 mL serum fizyolojik/ fare). Hayvanlara standart laboratuvar pellet yemi ile birlikte yeteri kadar su verilmiştir.

KL21 polihherbal formülasyonunun uygulaması yapılırken haftalık olarak ve uygulama tamamlandıktan sonra fareler tartılmış, uygulama tamamlandıktan sonra anestezi altında yaklaşık her fareden 0,7 - 1,0 mL kan alınmıştır. Toplanan kanlarda başlangıç değerleri ile farklılık olup olmadığını görmek amacıyla biyokimyasal ve hematolojik parametreler incelenmiştir. Kan alınımı sonrasında iç organları çıkarılıp tartılmış ve organların ortalamaları, standart sapmaları ile rölatif organ ağırlıkları hesaplanmıştır. Hedef organ olarak karaciğer tespit edilmiş, kesitleri alınmış, hematoksilen & eosin ile boyama yapılarak histolojik kesitler toksik bir etki varlığı açısından incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra çıkarılmış dokuların incelenmesi Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.4.1. Biyokimyasal analizler

Farelerden alınan heparinize tam kan örneklerinin biyokimyasal parametreleri ve karaciğer profilleri tek kullanımlık reagent rotolar ile Vetscan VS 2 cihazı kullanılarak incelenmiştir. Vetscan, biyokimyasal analiz cihazı, kan biyokimyasallarının, elektrolitlerinin ve T4 ölçümünün lityum heparinli tam kan, plazma veya serumdan kalitatif değerlendirmesini yapan taşınabilir *in vitro* analiz cihazıdır. Cihaz, kimyasal cihazı heparinize tam kan örneği işlemek ve dilüsyon edilmiş plazmayı reagent rotorlarına iletmek için merkezi ve kapiler güç kullanmaktadır. Ayrıca kimyasal reaksiyonları optik olarak ölçmekte bu ölçümlerden ve rotor üzerindeki barkod halkasındaki kalibrasyon faktörlerinden analiz konsantrasyonlarını hesaplamaktadır.

Tam kan, rotor içinde plazma ve hücrelerine ayrılır, plazma ve dilüent karıştırılır ve ölçüm haznelere dağıtılır. Böylece seyreltilmiş edilmiş plazma reagent boncukları ile reaksiyona girmiş olur. Cihaz kendini kalibre eden bir sisteme sahip olmakla birlikte reagent rotorlarındaki barkodlar kalibrasyon için gerekli veriye sahiptir ve her rotor çalıştırıldığında cihaz kendini kalibre etmektedir.

Farelerden alınan kanlar hem çalışmanın başında hemde çalışma sona erdiğinde analiz edilmiştir. “Comprehensive Diagnostic Kit” ve “Mammalian Liver Profile Kit” ile 16 parametre (Albümin-ALB, Alkalen fosfataz-ALP, Alanin aminotransferaz-ALT, Amilaz-AMY, Total bilirbin-TBIL, Kan üre azotu-BUN, Kalsiyum-Ca, Fosfat-Phos, Kreatinin-CRE, Glukoz-GLU, Sodyum-Na, Potasyum-K, Total protein-TP, Globulin-GLOB, Bazofil-Ba, Kolestrol-CHOL) incelenmiş olup sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3.4.2. Hematolojik analizler

Çalışmanın hem başında hem de sonunda farelerden alınan kan örnekleri potasyum EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) içeren tüpler içinde Vetscan HM 5 cihazına verilmiş ve 100 µL tam kandan 15 hematoloji parametresini (Lökosit-WBC, Lenfosit-LYM, Monosit-MON, Nötrofil-NEU, Eritrosit-RBC, Hemoglobin-HGB, Hemotokrit-HCT, Eritrositlerin ortalama büyüklüğü-MCV, Hemoglobin miktarı-MCH, Hemoglobin konsantrasyonun yüzde ifadesi-MCHC,

Eritrositlerin dağılım genişliği-RDWc, Trombosit-PLT, Trombositlerin kana oranı-PCT, Trombosit ortalama büyüklüğü-MPV, Trombositlerin dağılım genişliği-PDWc) kalitatif değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

Kan örnekleri cihaza verilmiş, tüm sonuçlar ve histogramlar otomatik olarak cihaz belleğine kaydedilmiş ve çıktıları alınmıştır.

2.2.3.4.3. Histokimyasal boyama prosedürü

Hematoksilen Eosin Boyama

Alınan örneklerde hematoksilin-eosin boyama prosedürü sırasında aşağıdaki işlem basamakları gerçekleştirilmiştir;

- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Ksilol III 10 dakika
- Kuruduktan sonra alkolden geçirildi.
- % 100 Alkol ve 2. % 100 Alkolde 2'şer dakika
- % 95 Alkol ve % 80 alkolde 2'şer dakika
- Distile suda 5 dakika yıkandı.
- Hematoksilende 2,5 dakika tutuldu.
- Akarsu 5 dakika
- Asit alkol (Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarılır.)
- Akarsuda yıkandı.
- Amonyaklı su (Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akarsu
- Distile su 5 dakika yıkandı.
- Eozin 2,5 dakika
- % 95 Alkol , % 100 Alkol ve 2. % 100 Alkolde 2'şer dakika bekletildi.
- Dışarıda kurutuldu.
- Ksilolle muamele edildi.
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.
- Nükleus: Mavi, Sitoplazma: Pembe boyanacak şekilde sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.2.4. Antikanser etkinin değerlendirilmesi

2.2.4.1. In vitro apoptotik etkinin belirlenmesi

Sitotoksosite denemesi sonrasında hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre 24 saat 25 cm²'de inkübe edilen hücreler (10⁵ hücre/mL) belirlenen IC₅₀ değerindeki konsantrasyon ile muamele edilerek, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, bu hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmış, ardından cDNA hazırlanmıştır. Her hücre hattından elde edilen cDNA'lar RealTime ready Human Apoptosis Panel'ine (Roche, 05392063001, Basel, Switzerland) yüklenerek, her hücre hattında apoptoz ile ilişkili yaklaşık 84 genin ekspresyon profilleri ortaya konulmuştur. Çalışma GENMAR Teşhis Ürünleri, ARGE Laboratuvar Hizmetleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirket'inde bulunan Roche Light Cycler® 480 sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.1.1. Apoptoz paneli için hücrelerin hazırlanması

Elde edilen sitotoksosite verileri ışığında, etkin madde ile etkileşim içerisinde olan kanser ve normal hücre hatları seçilmiş ve apoptoz paneli için hazırlanmıştır. Belirlenen hücre hatları 25 cm²'lik flakslara, her bir hücre hattı için 1x10⁵ hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi yapılarak, yeni bir test düzeneği kurulmuştur. Flasklara eklenen hücreler 24 saat 37 °C' de, % 85 nem ve % 5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası her 3 test maddesi için hesaplanan IC₅₀ değerindeki dozlar hücre hattına uygulanarak 48 saatlik madde maruziyeti için inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında 25 cm²'lik flasklardaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve hücrelerin çoğalma yüzeyi 5 mL PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ile yıkanmıştır. Flasklara eklenen PBS uzaklaştırılarak yine hücre çoğalma yüzeyine 0,5 mL tripsin eklenmiş ve tüm flasklar inkübatöre kaldırılmıştır. Flask içerisindeki hücrelerin süspanse forma geçmeleri sağlandıktan sonra 5 mL PBS ile homojenize edilen flask içeriği, 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve 1000 rpm'de 7 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüpte üst fazda PBS ve alt fazda ise hücre pelleti gözlemlenmiştir. Üst faz dikkatlice uzaklaştırılmış ve alt fazda yer alan hücre pelletinden total RNA izolasyonu yapılmıştır.

2.2.4.1.2. Kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu prosedürü

Kanser ve normal hücre hatlarından total RNA izolasyonu, TriPure Isolation Reagent (Roche, 11667157001, Basel, Switzerland) ile yapılmıştır. Elde edilen total RNA'ların miktarı Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Waltham, USA) cihazı ile ölçülmüştür.

Kültür hücrelerinden total RNA (1×10^6 hücre) izolasyon prosedürü:

1. Steril polipropilen santrifüj tüpüne 0,8 mL TriPure Isolation Reagent (fenol ve guanidin tiyosiyanat monobazik çözeltisi) ve hücre pelleti eklenmiştir.
2. Şırınga yardımı ile TriPure Isolation Reagent içindeki hücreler homojenize edilmiştir.
3. Nükleoprotein kompleksinin ayrılması için homojenatlar 15-25 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
4. Her örneğe 0,8 mL TriPure reagent'ına 0,16 mL olacak şekilde kloroform eklenmiştir. Tüplerin kapağı kapatılmış ve 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalanmıştır.
5. Örnekler 15-25 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
6. Faz ayırımı yapmak için + 4 °C'de 12000 g'de (15000 rpm) 15 dakika santrifüj yapılmıştır.
7. Santrifüj sonrasında 3 faz oluştuğu gözlenmiştir. (Renksiz üst sulu faz RNA izolasyonu için kullanılmıştır)
8. Renksiz üst faz polipropilen santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
9. Bu fazdan RNA' nın çöktürülmesi için 0,8 mL TriPure reagent'ına 0,4 mL olacak şekilde izopropanol eklenmiştir. Tüplerin kapağı kapatılmış ve birkaç kez ters-yüz edilmiştir.
10. Örnekler 15-25 °C'de 5-10 dakika inkübe edilmiştir.
11. +4 °C'de 12000 g'de (15000 rpm) 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır.

12. Tüplere 0,8 mL TriPure reagent'ına 0,8 mL olacak şekilde % 75 etanol eklenmiştir. Örnekler vortekslenerek etanolde yıkanmıştır.

13. +4 °C'de 7500 g'de (15000 rpm) 5 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır.

14. Vakum ya da hava akımı ile RNA'dan etanol uzaklaştırılmıştır.

15. RNA pelleti Dietilpirokarbonat (DEPC)-uygulanmış 20 µL'lik RNaz-free su ile resüspande edilmiştir.

16. RNA bir pipet yardımı ile çözülmüş, 10-15 dakika 55-60 °C'de inkübe edildikten sonra kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.4.1.3. Total RNA'dan cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, elde edilen total RNA'lardan cDNA hazırlanmıştır. cDNA sentezi için kullanılan Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, 05081955001, Basel, Switzerland) solüsyonları çalışma öncesinde çözündürülmüş ve birkaç saniye santrifüjlenmiştir. Tüm işlem buz kaseti üzerinde gerçekleştirilmiştir. Buz kaseti üzerindeki steril PCR tüplerinde, Çizelge 2.8'de içeriği yer alan template-primer karışımı 96 reaksiyonluk master mix şeklinde hazırlanmıştır.

Template-primer karışımını denatüre etmek için tüpler 10 dakika 65 °C'de bekletilmiş. Bu adımda RNA'nın ikincil yapılarının denatürasyonu sağlanmıştır. 10 dakikanın sonunda tüpler hemen buz üzerine alınmıştır ve denatüre RNA formlarının korunması sağlanmıştır. Template-primer karışımını içeren tüpler içerisine her bir reaksiyon için son hacim 20 µL olacak şekilde revers transkriptaz (RT) karışımı bileşenleri eklenmiştir.

Çizelge 2.8 Template-Primer Karışımının Hazırlanması

Kit Bileşenleri (1 Örnek için)	Hacim	Master-Mix TP (96 reaksiyon)
Total RNA	4 µL	348 µL
Random Hexamer primer, 600 pmol/µL	2 µL	192 µL
dH ₂ O (PCR Grade)	5,4 µL	518,4 µL
Son Hacim	11,4 µL	1058,4 µL

RT karışımı bileşenlerini içeren tüpler 25 °C’de 10 dakikayı takiben 55 °C’de 30 dakikalık inkübasyonun gerçekleşeceği termal cycler cihazına verilmiştir. 85 °C’de 5 dakika bekletilerek revers transkriptaz enziminin inaktivasyonu sağlanmış ve tüpler soğuk buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulmuştur. cDNA içeren tüpler kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Template-primer karışımını içeren tüpler içerisine son hacim 20 µL olacak şekilde Çizelge 2.9’da yer alan Revers transkriptaz (RT) Mix bileşenleri eklenmiştir.

Çizelge 2.9 Revers Transkriptaz (RT) Karışımının Hazırlanması

Kit Bileşenleri (1 örnek)	Her Bileşenin Son Konsantrasyonu	Aktarım Hacmi (1 reaksiyon)	Master Mix (96 reaksiyon)
Reaksiyon tamponu (5x conc.)	1 x (8 mM MgCl ₂)	4 µL	348 µL
RNaz inhibitörü (40 U/ µL)	20 U	0,5 µL	486 µL
Deoks nükleotid karışımı (dNTP)	1 mM	2 µL	192 µL
DDT	5 mM	1 µL	96 µL
Revers Transkriptaz	10 U	1,1 µL	105,6 µL
Son Hacim	-	20 µL	1920 µL

2.2.4.1.4. Real time PCR array

İnsan apoptotik panel (Roche, 0539206300, Basel, Switzerland) apoptoz ile ilişkili gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde kullanıma hazır bir üründür. Apoptotik yolda yer alan genlerin ekspresyon profillerinin belirlenebilmesi için dizayn edilmiştir. Bu dizayn ile 84 adet insan apoptosiz ilişkili genin yanında, 7 adet housekeeping gen ve 5 adet kontrol içeren bir qPCR analizi yapılmakta ve hedef gen ekspresyonunun rölatif kantifikasyonu belirlenmektedir. Çizelge 2.10’da ise analizlenen hedef genlerle ilişkili bilgiler ve Çizelge 2.11’de ise panel için kullanılan plaka şablonu yer almaktadır.

Çizelge 2.10 İnsan Apoptotik Panel Analizinde Kullanılan Plaka Şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AKT	APAF	AVEN	BAD	BAG1	BAK1	BAX	BBC3	BCL2	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11
B	BCL2L13	BCL2L2	BID	BIK	BIRC2	BIRC3	BIRC5	BOK	CAD	CASP1	CASP10	CASP12
C	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7	CASP8	CASP8AP2	CASP9	CFLAR	CRADD
D	DFFA	DIALO	endoG	FADD	FAM96A	FAM96B	FAM96B	FASLG	HMGBl	HRK	HSP90B1	HTRA2
E	LRDD	MCL	NFKB1	NFKB2	NGFR	PMAIP1	PMAIP1	REL	RELA	RELB	SOCS2	SOCS3
F	STAT1	STAT5A	STAT5B	TNF	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF10C	TNFRSF10D	TNFRSF11D	TNFRSF10D	TNFRSF10D	TNFRSF10D
G	TNFRSF25	TNFSF8	TNFSF10	TNFSF11	TP53	TP53I3	TP53I3	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6	TRAF7
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT	RPL13A	18S	YWHAZ	RT+	RT+	RT+	RT-	RT-
	REFERANS GENLER							POZİTİF KONTROLLER		NEGATİF KONTROLLER		

Çizelge 2.11 İnsan Apoptotik Panel İçerik Detayı

Pos.	Sembol	Tanım
A01	AKT ₁	RAC-alfa serin/treonin- protein kinaz
A02	APAF ₁	Apoptotik proteaz-aktif edici faktör 1 (Apaf-1)
A03	AVEN	Hücre ölümü regülatörü Aven
A04	BAD	BCL ₂ antagonisti (BAD)
A05	BAG ₁	BAG ailesinin moleküler şaperon regülatörü 1
A06	BAK ₁	BCL ₂ homolog antagonisti/ öldürücü (Regülatör BAK)
A07	BAX	Apoptoz regülatör BAX
A08	BBC ₃	BCL ₂ bağlanma elemanı 3 (p53 up-regülatör modülatörü)
A09	BCL ₂	Apoptoz regülatör BCL ₂
A10	BCL ₂ L ₁	Apoptoz regülatör Bcl-xL (BCL ₂ benzeri 1 protein)
A11	BCL ₂ L ₁₀	Apoptoz regülatör BCL ₂ B (BCL ₂ benzeri 10 protein)
A12	BCL ₂ L ₁₁	BCL ₂ benzeri protein 11 (BCL ₂ interaksiyon mediyatörü, Bim)
B01	BCL ₂ L ₁₃	BCL ₂ benzeri 13 protein (Protein Mil ₁)
B02	BCL ₂ L ₂	Apoptoz regülatör Bcl-W (Bcl-2 benzeri 2 protein)
B03	BID	BH3 interaksiyon domaini ölüm antagonisti (BID)
B04	BIK	BCL ₂ interaksiyon öldürücü (İndükleyici NBK)
B05	BIRC ₂	Baculoviral IAP tekrarları içeren protein 2 (IAP ₁)
B06	BIRC ₃	Baculoviral IAP tekrarları içeren protein 3 (IAP ₂)
B07	BIRC ₅	Baculoviral IAP tekrarları içeren protein 5 (Survivin; IAP ₄)
B08	BOK	BCL ₂ ilişkili ovaryan öldürücü protein (Hbok)
B09	CAD	CAD protein
B10	CASP ₁	Kaspaz-1 prokürsör
B11	CASP ₁₀	Kaspaz-10 prokürsör
B12	CASP ₁₂	İnaktif kaspaz
C01	CASP ₁₄	Kaspaz-14 prokürsör
Pos.	Sembol	Tanım
C02	CASP ₂	Kaspaz-2 prokürsör
C03	CASP ₃	Kaspaz-3 prokürsör
C04	CASP ₄	Kaspaz-4 prokürsör

C05	CASP ₃	Kaspaz-5 prokürsör
C06	CASP ₆	Kaspaz-6 prokürsör
C07	CASP ₇	Kaspaz-7 prokürsör
C08	CASP ₈	Kaspaz-8 prokürsör
C09	CASP ₈ AP ₂	CASP ₈ - ilişkili protein 2 (FLICE ilişkili büyük protein)
C10	CASP ₉	Kaspaz-9 prokürsör
C11	CFLAR	CASP ₈ ve FADD-benzeri apoptosiz regülatör prokürsörü (c-FLIP)
C12	CRADD	Ölüm domaini içeren protein CRADD
D01	DFFA	DNA fragmentasyon faktörü alt-ünite α (ICAD)
D02	DIABLO	DIABLO homologu, mitokondrial prokürsör (mitokondrial aktivatörü)
D03	endoG	Endonükleaz G, mitokondrial prokürsör
D04	FADD	Protein FADD (Fas ilişkili ölüm domain proteini)
D05	FAM _{96A}	UPF ₀₁₉₅ protein FAM _{96A}
D06	FAM _{96B}	UPF ₀₁₉₅ protein FAM _{96B}
D07	FAS	TNF-reseptör süperaile üyesi 6 (FASLG reseptörü)
D08	FASLG	TNF- ligand süperaile üyesi 6 (Fas antijen ligandı) (TNFSF ₆)
D09	HMGB ₁	Hareketliliği yüksek grup proteini B1
D10	HRK	Apoptoz harakiri aktivatörü (Nöral ölüm proteini DP5)
D11	HSP _{90B1}	Endoplazmin prokürsörü (Isı şok proteini β üyesi 1)
D12	HTRA ₂	Serin proteaz HTRA ₂ , mitokondrial prokürsör
E01	LRDD	Lösence zengin tekrarlı ve ölüm domaini içeren protein
E02	MCL ₁	İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini MCL ₁
E03	NFKB ₁	Nüklear faktör NF-kappa-B p105 alt-ünitesi
E04	NFKB ₂	Nüklear faktör NF-kappa-B p100 alt-ünitesi
E05	NGFR	TNF-reseptör süperaile üyesi 16 prokürsörü
E06	PMAIP ₁	Phorbol-12-myristate-13-acetate indüklü protein 1
E07	PTEN	Phosphatidylinositol- 3,4,5-trisphosphate3-fosfataz
E08	REL	C-Rel proto- onkogen protein (C-Rel protein)
E09	RELA	Transkripsiyon faktör p65 (NF-kappa-B p65 alt-ünitesi)
E10	RELB	Transkripsiyon faktör RelB (I-Rel)
E11	SOCS ₂	Sitokin sinyali 2 baskılayıcısı (SOCS-2)
E12	SOCS ₃	Sitokin sinyali 3 baskılayıcısı (SOCS-3)
F01	STAT ₁	Transkripsiyon 1- α/β 'nın sinyal transdüker ve aktivatörü
F02	STAT _{5A}	Transkripsiyon 5A'nın sinyal transdüker ve aktivatörü
F03	STAT _{5B}	Transkripsiyon 5B'nin sinyal transdüker ve aktivatörü
F04	TNF	Tümör nekrotik faktör prokürsörü (TNF- α)
F05	TNFRSF _{10A}	TNF- reseptör süperaile üyesi 10A prokürsörü (TRAILR ₁ ; DR ₄)
F06	TNFRSF _{10B}	TNF- reseptör süperaile üyesi 10B prokürsörü (TRAILR ₂ ; DR ₅)
F07	TNFRSF _{10C}	TNF-reseptör süperaile üyesi 10C prokürsörü (TuzakR ₁ ; TRAILR ₃)
F08	TNFRSF _{10D}	TNF-reseptör süperaile üyesi 10D prokürsörü (TuzakR ₂ ; TRAILR ₄)
F09	TNFRSF _{11B}	TNF- reseptör süperaile üyesi 11B (Osteoprotegrin)
F10	TNFRSF _{1A}	TNF- reseptör süperaile üyesi 1A prokürsörü (p60) (TNFR ₁)
F11	TNFRSF _{1B}	TNF- reseptör süperaile üyesi 1B prokürsörü (TNFR ₂)
F12	TNFRSF ₂₁	TNF-reseptör süperaile üyesi 21 prokürsörü (TNF-ölüm reseptörü 6)
G01	TNFRSF ₂₅	TNF-reseptör süperaile üyesi 25 prokürsörü (WSL-1)
G02	TNFSF ₈	TNF- ligand süperaile üyesi 8 (CD ₃₀ ligandı)
G03	TNFSF ₁₀	TNF- ligand süperaile üyesi 10 (apoptosiz-indükleyen L) (TRAIL)
G04	TNFSF ₁₁	TNF-ligand süperaile üyesi 11 (NFKB-R aktivatörü)
Pos.	Sembol	Tanım
G05	TP ₅₃	Hüresel tümör antijen p53 (Tümör baskılayıcı p53)
G06	TP _{53I3}	Varsayılan quinone oksidoredüktaz
G07	TRAF ₁	TNF-reseptör- ilişkili faktör 1

G08	TRAF ₂	TNF-reseptör- ilişkili faktör 2
G09	TRAF ₃	TNF-reseptör- ilişkili faktör 3 (CD ₄₀ reseptör ilişkili faktör 1)
G10	TRAF ₅	TNF-reseptör- ilişkili faktör 5 (RING parmak protein 84)
G11	TRAF ₆	TNF-reseptör- ilişkili faktör 6 (İnterlökin- 1 sinyal transdüker)
G12	TRAF ₇	E ₃ ubiquitin-protein ligaz TRAF ₇
H01	ACTB	Aktin, sitoplazmik 1 (β-aktin)
H02	B ₂ M	β-2-mikroglobulin prokürsörü
H03	GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
H04	HPRT ₁	Hipoksatin-guanin fosforibosil transferaz
H05	RPL _{13A}	⁶⁰ S ribozomal protein L _{13a} (23 kDa yüksek bazik protein)
H06	¹⁸ S	¹⁶ S ribozomal RNA
H07	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinaz C inhibitör protein 1)
H08	RT+	RT-pozitif kontrol 5'
H09	RT+	RT-pozitif kontrol orta
H10	RT+	RT-pozitif kontrol 3'
H11	RT-	RT- negatif kontrol 1 cDNA
H12	RT-	RT- negatif kontrol 2 RNA

Toplamda 5 adet kontrol ile elde edilen RNA'nın kalitesi belirlenmektedir. Bunlardan 3 tanesi RT pozitif kontrol (RT+) olarak revers transkripsiyon adımını, diğer 2 tanesi de RT negatif kontrol (RT-) olarak rezidüel genomik DNA'nın denetimini sağlamaktadır. Ayrıca 7 adet housekeeping gen kontrol kullanımı, hedef gen ifadesinin normalizasyonunda ve ifadesindeki değişimin belirlenmesinde önemlidir. Hazırlanan PCR karışımları ve hücre hatlarından elde edilen cDNA örnekleri plakaya yüklenmiştir. Böylece hedef gen ekspresyonunun görece miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir. PCR analizine başlamadan önce her bir reaksiyon için PCR karışımı yine 96 reaksiyonluk PCR master mix şeklinde hazırlanmıştır (Çizelge 2.12).

Çizelge 2.12 PCR Karışımının Hazırlanması

PCR Karışımı Bileşenleri	Hacim (1 reaksiyon)	PCR Master Mix (96 reaksiyon)
dH ₂ O (PCR Grade)	9,8 µL	940,8 µL
LightCycler® 480 Probes Master	10 µL	960 µL
cDNA	0,2 µL	19,2 µL
Son Hacim	20 µL	1920 µL

Çizelge 2.12'deki tek bir reaksiyonluk konsantrasyonlar, 96 reaksiyonluk panele uygun olacak şekilde PCR master mix olarak buz kaseti üzerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan tek örneklik PCR master mix bileşenleri pipetle karıştırılmış ve akabinde her bir plaka kuyucuğunda, son hacim 20 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Her bir kuyucuğunda PCR master mix içeren plaka 2 dakika,

1500 g'de santrifüjlendikten sonra LightCycler® 480 cihazında, Çizelge 2.13'te verilen program ayarlaması ile çalışılmıştır.

Çizelge 2.13 LightCycler® 480 Cihaz Çalışma Protokolü

Dedektör Formatı		Blok Ölçüsü	Reaksiyon Hacmi
Monocolor Hydrolysis Prob / UPL Probu		96 Kuyucuk	20 µL
Filtre Kombinasyonu: Dinamik mod			
FAM 483 – 533 or 465 – 510 sırasıyla, LightCycler 480 Instrument Version I or II			
Program Adı		Döngüler	Analiz Modu
Pre-İnkübasyon		1	-
Ampfilikasyon		45	Miktar Ölçümü
Soğutma		1	-
Sıcaklık Hedefleri (°C)	Acquisition Modu	Bekleme (ss:dd:ss)	Ramp Oranı
Pre-İnkübasyon			
95	Yok	00:10:00	4.4
Ampfilikasyon			
95	Yok	00:00:10	4.4
60	Yok	00:00:30	2.2
72	Tek	00:00:01	4.4
Soğutma			
40	Yok	00:00:30	2.2

2.2.4.1.5. Apoptotik gen ekspresyonunun rölatif kantifikasyonu

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi iki method aracılığı ile gerçekleştirilebilir. Bunlar kesin ve rölatif kantifikasyon olarak adlandırılır (Livak and Schmittgen, 2001). Kesin kantifikasyonda, reaksiyona giren kopya sayısının oluşturduğu PCR sinyalinin standart eğim yardımı ile hesaplanması baz alınırken, rölatif kantifikasyonda, çalışma grubunun hedef transkriptinin oluşturduğu PCR sinyalinin kontrol grubu ile göreceli olarak karşılaştırılması temelinde bir hesaplama yapılır. Çalışmada 84 adet insan apoptozisi ilişkili hedef gen ekspresyonunun rölatif kantifikasyonunda, 'Karşılaştırmalı CT Methodu' kullanılmıştır (Schmittgen and Livak, 2008). Bu yöntem ile hedef gen ekspresyonunun görece miktarı, analizde kullanılan 7 adet housekeeping gen ekspresyonu ile karşılaştırılma esası baz alınarak, fold change (kat artışı) şeklinde saptanmıştır. İnternal kontrol olarak kullanılan housekeeping genler ve apoptotik hedef genler Çizelge 2.10 ve 2.11'de gösterilmiştir.

Karşılaştırmada kullanılan kantitatif değer, CT değeri, sabit bir eşik değere ulaşan amplifiye edilmiş hedef gen miktarındaki fraksiyonel döngü sayısını ifade eden bir değerdir. 84 adet hedef gen ve 7 adet housekeeping gen için bu CT

değerleri, ‘Delta CT (ΔC_T)’ değeri olarak her bir hedef gen için 7 adet housekeeping gen CT değeri ortalaması ile normalize edilmiş formda LightCycler tarafından hesaplanmıştır. Elde edilen bu ham ΔC_T değerlerinden ise analizdeki her bir hücre hattındaki hedef gen için Delta-Delta CT ($\Delta\Delta C_T$) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 2.14).

Çizelge 2.14 $\Delta\Delta C_T$ Değerinin Belirlenmesi

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(SFO)} - \Delta C_{T(Kont)}$	$\Delta\Delta C_T$: Hedef genin Delta C_T değeri
	$\Delta C_{T(KL21)}$: KL21 polihherbal formülasyonu maruz edilmiş hücre hatlarındaki normalize edilmiş hedef gen C_T değeri
	$\Delta C_{T(Kont)}$: Kontrol hücre hattındaki normalize edilmiş hedef gen C_T değeri

Çizelge 2.14’te belirtilen formülle HEK-293 ve MCF-7 hücre hatlarındaki her bir hedef gen için hesaplanan bu $\Delta\Delta C_T$ değerlerinden yararlanılarak, yine her bir hücre hattına özgü hedef genin kontrole göre ne kadar değiştiğinin yorumlanması amacı ile ‘Karşılaştırmalı CT Methodu’ temelinde “Kat Değişimi” (Fold Change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 2.15).

Çizelge 2.15 Karşılaştırmalı CT Metodu ile Kat Değişimi Hesaplanması

$\Delta\Delta C_T$ değeri ≤ 0 ise;	$Fc = 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
$\Delta\Delta C_T$ değeri > 0 ise;	$Fc = (-1) / 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$

2.2.4.2. Anti-anjiyogenik etkinin belirlenmesi

2.2.4.2.1. *In vitro* hücre migrasyon denemesi

Yara iyileşmesi; inflamasyon, hücre migrasyonu, anjiyogenezis, geçici matriks sentezi ve kollajen birikimi gibi karmaşık bir süreçtir (Kapan vd., 2008). Bu süreçte, anjiyogenik faktörler tarafından uyarılmış vaskülarizasyon ve hücre poliferasyonunda artış meydana gelmektedir. Yara iyileşme prosedüründe hücreler, yara oluşan bölgeye doğru kutuplaşarak göç ederler.

Çalışmada “CytoSelect 24 –Well Wound Healing Assay Kit” (Cell Biolabs, INC.) kullanılmıştır.

KL21 polihherbal formülasyonun etanol ekstresi ile fibroblast hücrelerinde çalışma gerçekleştirilmiş ve 2 mg / 400 µL konsantrasyonlarda uygulanmış ve çalışma 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Steril koşullar altında Laminar Air Flow içinde gerçekleştirilen çalışma prosedürü Çizelge 2.16’da verilmiştir.

Çizelge 2.16 Yara İyileşme Modeli İşlem Basamakları

No	Hücre Migrasyonu
1	Fibroblast hücreleri için kullanılacak 4 kit (FBS, rhFGF-B, GA-100, insülin) ortam bulunan flakslara ekip etüve bırakılır.
2	+4°C’de muhafaza edilen 24 kuyucuklu CytoSelect™ Yara İyileşme Insert’leri oda sıcaklığında (25 ± 1 °C) 10 dakika bekletilir.
3	Steril pens yardımı ile insertler 24 kuyucuklu plakaların içine yerleştirilir.
4	% 10 Fetal Bovin Serum (FBS) içinde $0,5-1,0 \times 10^6$ hücre/mL olacak şekilde süspansiyon hazırlanır.
5	Her kuyucuğa 500 µL hücre süspansiyonundan eklenir.
6	Hücreler 37 ± 1 °C’de 24- 48 saat inkübe edilirler.
8	Dikkatli bir şekilde steril pens yardımı ile insertler kaldırılır ve 0,9 mm alana sahip yara modelini oluşturulmuş olur.
9	Kuyucuklardaki besiyeri yavaşça aspire edilir. Yıkama işlemi ile ölü hücreler uzaklaştırılır. Hücrelerin nemli kalması için biraz besiyeri kuyucuklarda bırakılır.
10	Işık mikroskopu altında görüntü alınır ve ölü hücre veya tutunamayan hücre var ise yıkama işlemine devam edilir.
11	Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra FBS eklenir.
12	KL21 polihherbal formülasyonu etanol ekstresi 5 mg/mL miktarında eklenir ve inkübasyon gerçekleştirilir.
13	Yara iyileşme süreci yapılan ölçümler ile takip edilir.
DAPI Floresan İşaretleme / Giemsa Boyama	
14	Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp hücrelerin üzerine 0,5 mL fiksasyon çözeltisi eklenir.
15	10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra çözelti uzaklaştırılır.
16	PBS ile hücreler 3 defa yıkanır.
17	6,5 mL fizyolojik suya 6,5 µL DAPI olacak şekilde hazırlanır.
18	Her kuyucuğa 250 µL DAPI eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
19	PBS ile hücreler 3 defa yıkanır ve 1 mL PBS eklenir ve hücreler inverted mikroskopta incelenerek fotoğraflanır.
20	Giemsa (Sigma, Cas No: 51811-82-6) boyama için, DAPI incelemesinden sonra ortamdaki uzaklaştırılır.
21	250 µL giemsa ortama eklenir ve 15 dakika beklenir.
22	Süre sonunda giemsa uzaklaştırılır ve mikroskopta fotoğraf çekimi gerçekleştirilir.
Hesaplamalar	
Yara İyileşme Yüzdesi	
23	Yara alanı olarak belirlenen yüzey ölçülür. Total Yüzey Alanı = $0,9 \text{ mm} \times \text{uzunluk}$
24	Yara yüzeyinde göç eden hücrelerin alanı hesaplanır. Migrasyona uğramış Hücre Yüzey Alanı = hücre göçünün uzunluğu (mm) x 2 x

	uzunluk
25	Kapanma Yüzdesi (%) = Migrasyona uğramış Hücre Yüzey Alanı / Toplam Yüzey Alanı x 100
Migrasyon Oranı	
26	Migrasyon Oranı = Hücre Migrasyon uzunluğu (mm) / migrasyon zamanı (Saat)

2.2.4.2.2. *In vivo* koryoallantoik membran yöntemi (HET-CAM)

KL21 polihierbal formülasyonun anti-anjiogenik ve olası anjiyogenez inhibitörü etkilerini ortaya koymak amacıyla döllenmiş tavuk yumurtaları üzerinde, koryoallantoik membran modeli uygulaması gerçekleştirilmiştir (Krenn and Paper, 2009).

50 - 60 gr ağırlığında, temiz beyaz Leghron tavuk yumurtalarında analiz gerçekleştirilmiştir. Döllenmiş yumurtalar, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de, % 58 ± 2 nem oranında 5 gün kuluçka makinasında inkübasyona bırakılmışlardır. 5. günde yumurtalar çıkartılmış, hava boşluğu (künt) olan yerden işaretleme yapılmış ve o bölgeden 25 mm'lik disk şeklinde yumurta kabuğu kaldırılmıştır. Bu aşamada zarın yırtılmamasına özen gösterilmiştir. Membran % 9'luk NaCl ile nemlendirildikten sonra yumurtalar tekrar inkübatöre yerleştirilmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. Koryoallantoik Membran, yaklaşık 2 cm çapa ulaştığında 0,3 mL KL21 polihierbal formülasyonu direkt olarak uygulanmıştır. Pozitif ve negatif kontrol maddeleri de aynı miktarda uygulanmıştır. Kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatılmıştır. Her bir test bileşiğinin her bir konsantrasyonu için 15 yumurtaya uygulama yapılmıştır ve tüm testler iki kez tekrarlanmıştır.

Sonuçlar hemoraji, vasküler lizis ve koagülasyon bakımından Çizelge 2.17'ye göre değerlendirildikten sonra embriyolar hızlı bir şekilde sakrifiye edilmişlerdir.

Çizelge 2.17 HET-CAM Değerlendirilmesinde Kullanılan Skor Değerleri

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
0	Yok	✓ Normal embriyo oluşumu gözlenmektedir. ✓ Çevre kapillerlere göre değişiklik yoktur. ✓ Hemoraji, lizis veya koagülasyon durumu tespit edilmemiştir.
0,5	Zayıf	✓ Kapiller damarsız alan yoktur. ✓ Kapillerlerin yoğunluğu azalmıştır
1	Orta	✓ Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmıştır. Etkiler madde alanının 2 katından fazla değil.
2	Kuvvetli	✓ Kapillersiz alan mevcuttur. ✓ Normal embriyo oluşumu gözlenmemektedir.

Ortalama skor = [Yumurta sayısı (Skor 2) x 2 + Yumurta sayısı (Skor 1) x 1] / [Toplam Yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)].

Bu ortalama skor sistemine göre;

skor < 0,5: antianjiyogenik etki yok

skor = 0,5-1: zayıf /orta düzeyde antianjiyogenik etki

skor > 1: Kuvvetli antianjiyogenik etki olarak değerlendirilmektedir.

2.2.4.3. In vivo Ehrlich Ascites tümör modelinde etkinlik belirlenmesi

Ehrlich ascites hücreleri (EAC) İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi' nden temin edilmiştir. EAC hücreleri Neubauer lamında sayılmış ve $2,5 \times 10^6$ /mL olacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltilmiştir. Hücreler solid tümör oluşturmak üzere hayvanlara subkutan (sc) olarak 0,3 mL enjekte edilmiştir (Gothoskar and Ranadive, 1971; Ulukaya vd., 2011).

Çalışmada 22-25 gr ağırlığında, 8-10 haftalık yetişkin Balb-c albino fareler kullanılmıştır. Denemenin başında hayvanlar tartılmış ve her grupta 7 fare olacak şekilde 5 deney grubu oluşturulmuştur.

1. Grup: Negatif Kontrol grubu (n=7): 7 gün boyunca 0,5 mL %0,9 NaCl çözeltisi (kg/bw) uygulanmıştır.

2. Grup: Tümör Kontrol grubu (n=7): Farelere yalnızca EAC hücreleri sc. enjekte edilmiştir.

3. Grup: Pozitif Kontrol grubu (n=7): EAC hücreleri sc. enjekte edildikten 3 gün sonra başlayacak şekilde 7 gün boyunca anti-kanser etkisi belirlenmiş olan 10 mg/kg dozda Süramin (Suramine sodium salt, Sigma-Aldrich, Cas: 129-46-4) ip. olarak uygulanmıştır.

4. Grup: Pre-implantasyon grubu (n=7): EAC hücreleri sc. enjekte edilmeden önceki 7 gün boyunca 900 mg/kg dozda KL21 polihherbal formülasyonu oral olarak uygulanmıştır.

5. Grup: Post-implantasyon grubu (n=7): EAC hücreleri sc. enjekte edildikten 3 gün sonra başlayacak şekilde 7 gün boyunca 900 mg/kg dozda KL21 polih herbal formülasyonu oral olarak uygulanmıştır.

Deneme gruplarındaki hayvanlarda tümör gelişimi palpasyon metodu ile değerlendirilmiştir (Taşkın vd., 2009). Denemenin 14.gününde hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmişlerdir. Hayvanlardan çıkartılan tümörlerin ölçümleri kumpas (vernier caliper) kullanılarak ölçülmüş ve hacmi çizelge 2.18’de verilen formüle göre hesaplanmıştır (Abdin et al., 2014). Ölçümler tamamlandıktan sonra çıkarılan tümör örnekleri %4’lük paraformaldehit çözeltisine alınmış histopatolojik incelemeler yapılmış, immünohistokimyasal incelemeler kapsamında ise TUNEL ekspresyonu, VEGF markeri ile çalışılmıştır.

Ayrıca çalışmanın hem başında hem de sonunda farelerden alınan kan örneklerinin hematolojik analizleri ile “Mamalian Liver Profile” kiti kullanılarak biyokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.18 Tümör Hacminin Hesaplanması

$V (mm^3) : a \times b/2$	
V	Tümör Hacmi
a	Tümör Uzunluk (küçük çap)
b	Tümör Genişliği (büyük çap)

2.2.4.3.1. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri

TUNEL boyama yöntemi DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlayan bir metottur (Gavrieli et al., 1992). Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan *in situ* işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (Elmore, 2007). Tümör dokularında ki apoptozu belirlemek amacıyla “Promega DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (TUNEL)” (Promega Corp. Madison; Cat No: G7130) sistem kullanılmıştır. TUNEL boyama metodu ile hücrelerde meydana gelen apoptozu belirlemek amacıyla aşağıdaki işlem basamakları gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Kesitler 1 gün önceden deparafinizasyon için Ksilole yerleştirilmiştir.
- ✓ Ardından, % 100 alkol, % 95 alkol, % 80 alkol serilerinden geçirilmiştir. % 1 Triton X-100'lü PBS ile yıkama (pH:7,4) işleminin ardından dokuların etrafı sınırlayıcı kalem ile çizilmiştir.
- ✓ Proteinaz K eklenmiş, (3,9 µL proteinaz K + 35 µL distile su) lamaların üzeri cover slip ile kapatılarak 15 dakika beklenmiştir.
- ✓ PBS (Phosphate Buffered Saline) çözeltisi ile yıkama 2 kez 5'er dakika işleminin ardından 5 dakika H₂O₂ ile yıkama (63 mL PBS + 7mL H₂O₂) yapılmıştır.
- ✓ PBS ile yıkama 3 kez 1'er dakika, "equilibration tamponu" 5 dakika muamelenin ardından tampon lamalardan uzaklaştırılmıştır.
- ✓ TdT enzimi eklenmiştir (77 µL Reaksiyon tamponu + 33 µL TdT enzimi).
- ✓ Lamaların üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C inkübatöre konulmuştur.
- ✓ 10 dakika Stop/Wash tampon ile yıkama (2 mL stop/wash tamponu + 68 mL distile su) yapılmıştır.
- ✓ 4 kez 2'şer dakika PBS ile yıkama işleminin ardından "Anti-Dioksijenin Peroksidaz" eklenmiştir (Lamaların üzeri kapatılmış, 30 dakika nemli oda sıcaklığında bekletilmiştir).
- ✓ 4 kez 2'şer dakika PBS ile yıkama ve hemen ardından DAB eklenmiştir (735 µL DAB Dilution buffer + 15 µL DAB substrat).
- ✓ 3 dakika boyunca distile su ile yıkama işleminin ardından 10 dakika % 0,5 "metil green" eklenmiş ve 3 dakika boyunca distile su ile yıkanmıştır.
- ✓ % 100 *n*-Butanol ile yıkama işleminin ardından % 80 alkol, % 95 alkol, % 100 alkol serilerinden geçirilmiş, Ksilen I, Ksilen II, Ksilen III serileri ile muamele yapılmış ve son olarak entalen ile preparatlar kapatılmıştır (Millipore, Apoptag, Germany).

İmmünohistokimyasal prosedürlerinden VEGF markerı ile işaretleme çalışması kapsamında sırasıyla aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir;

- ✓ Kesitler, bir gece 60 °C etüvde ve soğuduktan sonra 2×30 dakika ksilolde tutulmuştur. Sırasıyla % 95, % 80, % 70 ve % 60'lık etil alkolde 2'şer dakika bekletilmiştir.
- ✓ Kesitler distile su ile 10 dakika yıkanmış ve çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilmiştir.
- ✓ PBS çözeltisi ile 3×5 dakika yıkanmıştır.
- ✓ Kullanılacak antikor için önerilen antijen "retrival" yöntemi uygulanmıştır.
- ✓ PBS çözeltisi ile 3×5 dakika yıkanmış ve endojen peroksit blokajı yapılmıştır (% 3 H₂O₂, 5 dakika).
- ✓ PBS çözeltisi ile 3×5 dakika yıkandıktan sonra kesitler üzerine Blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenmiştir.
- ✓ Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırılmış ve uygun şekilde dilüsyon yapılarak 50 µL primer antikor damlatılmıştır.
- ✓ Kapalı nemli kutuda bir gece 4 °C'de bekletilmiştir.
- ✓ PBS solüsyonu ile 3×5 dakika yıkanmıştır. Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor monoklonal antikor damlatılmış, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
- ✓ PBS çözeltisi ile 3×5 dakika yıkanmıştır. Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılmış, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir. PBS çözeltisi ile 3×5 dakika yıkanmıştır.
- ✓ DAB (3,3-diaminobenzidine) çözeltisi damlatılmış, 10 dakika kapalı nemli kutuda bekletilmiş ve tekrar PBS çözeltisi ile 3×5 dakika ve distile su ile yıkanmıştır.
- ✓ Mayers'in hematoksileni ile nükleus boyanması kontrol edilerek 5 dakika boyama yapılmıştır. Distile su ile yıkanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Sırasıyla % 80, % 95 ve % 100'lük etil alkolde 1'er dakika bekletilmiştir.
- ✓ Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilolde şeffaflaştırılmıştır. Kapama mediumu ile lamel ile kesitler kapatılmıştır.

2.2.5. İstatiksel değerlendirme

Çalışmadaki istatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows 10.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Deney sonunda bütün gruptaki farelere ait total ağırlık, organ ağırlıklarının ortalamaları ve organ ağırlığı/total vücut ağırlığı oranları hesaplanarak, sonuçlar varyans analizi (One-Way ANOVA) ile kontrole göre karşılaştırılmıştır. İstatistiksel açıdan önem kontrolü $p < 0,05$ seviyelerinde, kontrol grubu ile uygulama grupları arasında yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Total Fenolik ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

3.1.1. Spektrofotometrik yöntem

KL21 polih herbal formülasyonunun etanol ekstresindeki toplam fenolik madde miktarı (258,58 mg), metanol ekstresine kıyasla (86,42 mg) daha fazla oranla tespit edilmiştir. Benzer şekilde, toplam flavonoid miktarı etanol ekstresinde (11,09 mg), metanol ekstresine (3,58 mg) oranla daha fazladır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Total Fenolik ve Flavonoid Sonuçları

KL21 Polih herbal Formülasyonu	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g ekstre)	Toplam Flavonoid (mg QE/g ekstre)
Etanol	258,58 ± 0,02	11,09 ± 0,02
Metanol	86,42 ± 0,03	3,58 ± 0,02

3.1.2. Kromatografik yöntem - GC-MS ile içerik analizi

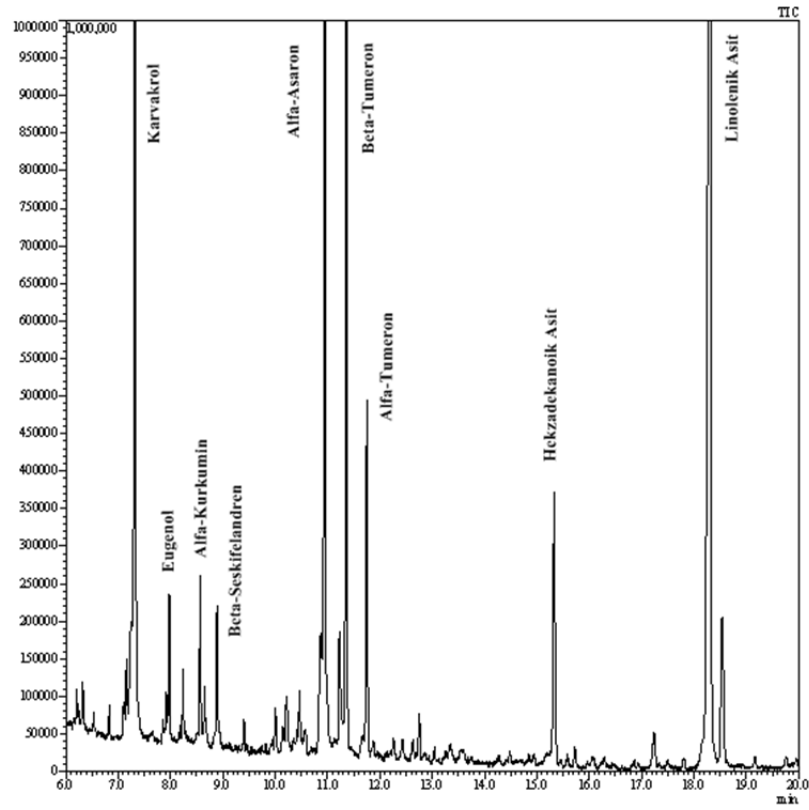
KL21 polih herbal formülasyonunun etanolik ve metanolik ekstrelerinden gerçekleştirilen ve Wiley 7. Lib’de taraması yapılan içerik analizine ilişkin sonuçlar Çizelge 3.2 ve 3.3’te, kromatogramlar ise Şekil 3.1 ve 3.2’ de verilmiştir. Her iki ekstrede de en fazla bulunana bileşik karvakrol olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2 Etanol Ekstresinin İçeriğinde Yer Alan Başlıca Bileşikler

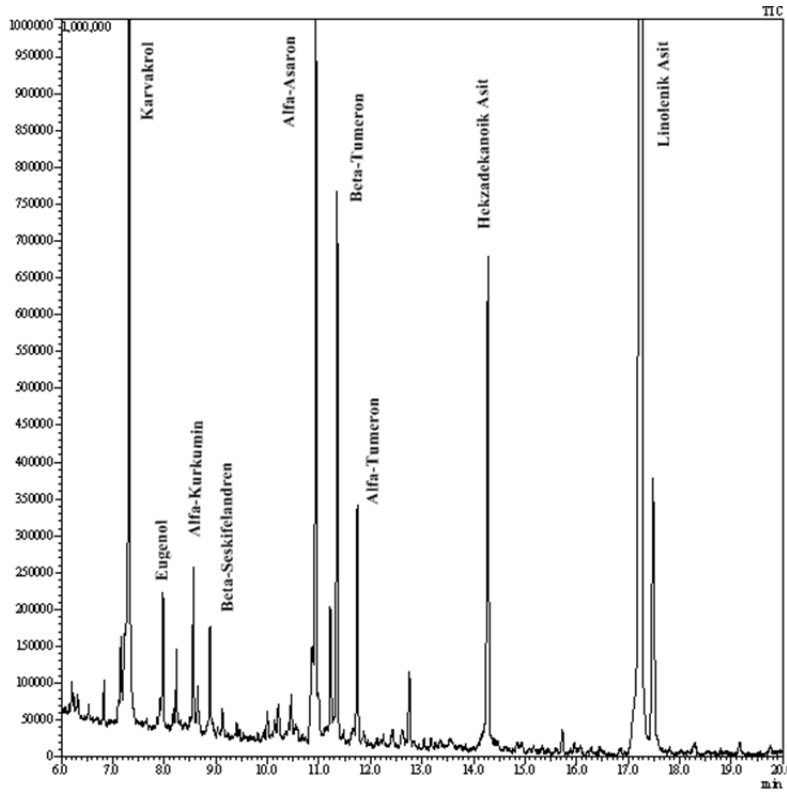
Ablonma Zamanı (dakika)	İçerikte Yer Alan Bazı Bileşikler	Alan (%)
7,322	Karvakrol	45,091
7,978	Eugenol	0,954
8,569	α-Kurkumin	1,495
8,893	β-Seskefelandren	0,615
10,946	α-Asaron	8,665
11,361	β-Tumeron	17,721
11,751	α-Tumeron	9,143
15,330	Hekzadekanoik Asit	6,056
18,304	Linolenik Asit	10,259

Çizelge 3.3 Metanol Ekstresinin İçeriğinde Yer Alan Başlıca Bileşikler

Alıkonma Zamanı (dakika)	İçerikte Yer Alan Bazı Bileşikler	Alan (%)
7,318	Karvakrol	42,414
7,977	Eugenol	0,974
8,567	α -Kurkumin	1,479
8,890	β -Seskifelandren	0,508
10,942	α -Asaron	6,230
11,357	β - Tumeron	11,780
11,747	α -Tumeron	6,398
14,278	Hekzadekanoik Asit	12,409
17,251	Linolenik Asit	17,807



Şekil 3.1 KL21 Polihıbal Formülasyonun Etanol Ekstresinin GC-MS Kromotogramı



Şekil 3.2 KL21 Poliherbal Formülasyonun Metanol Ekstresinin GC-MS Kromotogramı

3.2. Biyolojik Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.1. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

3.2.1.1. DPPH radikalini süpürme kapasitesi

Sonuçlara göre DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemine göre en aktif ekstre, KL21 poliherbal formülasyonun metanol ekstresidir (Çizelge 3.4). Formülasyonun 0,25 mg/mL konsantrasyondaki metanol ekstresi % 40,82 inhibisyon göstermiştir yani bu ekstre, 36,89 µg/mL konsantrasyonda α -tokoferolün yaptığı antioksidan aktiviteye eşdeğer bir aktivitedir. Metanol ekstresinin IC₅₀ değeri 0,294 mg/mL olarak tespit edilirken, etanol ekstresinin IC₅₀ değeri ise 14,173 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.4 DPPH İnhibisyon Sonuçları

KL 21 Ekstresi (mg/mL)		%DPPH inhibisyon	α -tokoferol ekivalen değeri (μ g/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)
Metanol Ekstresi	0,25	40,82 $\pm$ 0,04	36,89 $\pm$ 0,01	0,294
	0,50	74,86 $\pm$ 0,03	67,66 $\pm$ 0,01	
	1	90,66 $\pm$ 0,04	81,94 $\pm$ 0,03	
Etanol Ekstresi	0,25	0,41 $\pm$ 0,05	22,31 $\pm$ 0,04	14,173
	0,50	2,92 $\pm$ 0,01	32,22 $\pm$ 0,02	
	1	4,67 $\pm$ 0,02	42,16 $\pm$ 0,03	

3.2.1.2. ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi

KL21 Polihierbal formülasyonunun etanol ekstresi ve metanol ekstresi çok aktif olduğu için daha düşük konsantrasyonda çalışılmıştır. Metanol ekstresi için 0,125 mg/mL konsantrasyonda % 71,70 inhibisyon; aynı konsantrasyonda etanol ekstresi için ise % 72,80 inhibisyon tespit edilmiştir. Her iki ekstrede % ABTS inhibisyonuna göre, yaklaşık olarak eşdeğer aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 % ABTS⁺ İnhibisyonu Sonuçları

KL 21 Polihierbal Formülasyonu (0,125 mg/mL)	% ABTS İnhibisyonu (TAA)	Relatif Antioksidan Aktivitesi (RRA)
Etanol Ekstresi	72,80 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02
Metanol Ekstresi	71,70 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,02

3.2.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

3.2.2.1. Minimum inhibitör konsantrasyonu yöntemi (MIC)

Minimum inhibitör konsantrasyonuna göre antimikrobiyal aktivitesi ortaya konan KL21 polihierbal formülasyonunun metanol ekstresinin, etanol ekstresine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu ortaya konmuştur. Etanol ekstresi, denenen konsantrasyon aralığında herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmazken, metanol ekstresi 32 ve 64 μ g/mL konsantrasyonlarda etkili bulunmuştur (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Minimum İnhibisyon Sonuçları

Mikroorganizmalar	MIC (µg/mL)			
	Ekstreler		Gentamisin	Nystatin
	Metanol	Etanol		
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	128	1	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	128	1	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	32	128	1	-
<i>Escherichia coli</i>	32	256	1	-
<i>Bacillus cereus</i>	64	256	4	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	256	4	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	256	16	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	128	2	-
<i>Candida albicans</i>	64	256	-	4
<i>Aspergillus niger</i>	64	256	-	8

3.3. Toksisite Testleri Sonuçları

3.3.1. *In vitro* sitotoksisite testi sonuçları

3.3.1.1. Hücre canlılığı ve sitotoksisite testi sonuçları

Çalışmada KL21 Polih herbal formülasyonunun MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-22), A549 (İnsan Akciğer karsinom hücre hattı, ATCC-CCL-185), CaCo-2 (İnsan kolon kolektal adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-37), Hek (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573) ve HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı, ATCC-CCL-2) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC₅₀ değeri (hücrelerin % 50'sinin çoğalmasını inhibe eden konsantrasyon) belirlenmiştir.

KL21 polih herbal formülasyonun etanol ve metanol ekstraterinden 10 mg madde tartılıp 1000 µL DMSO'da çözündürülmüştür. Buradan farklı konsantrasyonlarda (10, 1 ve 0,1 mg/mL) hücre kültürüne uygulanmış, uygulama yapılan hücreler 24., 48. ve 72. saatlerde gözlenmiş ve hücrelere MTT testi yapılmıştır. MTT testi sonucunda, formülasyonun doz artışına bağlı olarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği belirlenmiş ve 72. saatte elde edilen IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Hücre Çoğalmasının İnhibe Olduğu IC₅₀ Değerleri

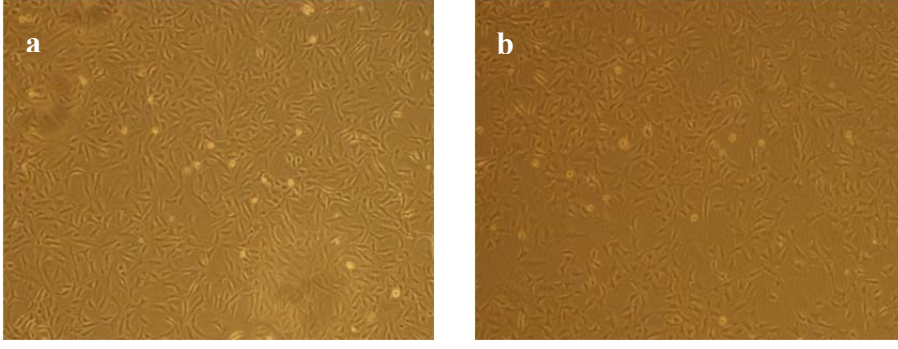
Ekstreler	Hücre Hatları IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)				
	MCF-7	A549	He-La	Caco-2	HEK-293
Etanol Ekstresi	92,09	-	95,47	-	44
Metanol Ekstresi	-	-	-	-	49

KL21 polih herbal formülasyonu etanol ekstresi A549 ve Caco-2 hücre hatlarında, metanol ekstresi ise A549, MCF-7, HeLa ve Caco-2 insan orjinli kanser hücre hatlarında çalışılan konsantrasyonlarda hesaplanabilir bir IC₅₀ değeri oluşturmamıştır. MCF-7 hücre hattında 92,09 µg/mL etki gösteren etanol ekstresi ile He-La hücre hattında 92,09 µg/mL IC₅₀ değerinde sitotoksite tespit edilmiştir. Bununla birlikte HEK-293 kontrol hücrelerinde ise KL21 polih herbal formülasyonu etanol ekstresinin 44 µg/mL, metanol ekstresinin ise 49 µg/mL IC₅₀ değerinde bir sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

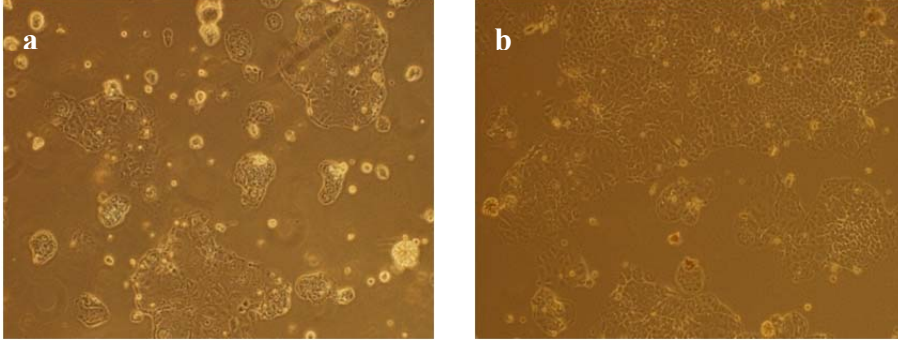
3.3.1.2. Morfolojik inceleme sonuçları

Morfolojik incelemeler, kullanılan hücre hatları hücre kontrol grubu, DMSO kontrol grubu ve test maddesi maruziyet grubu olacak şekilde üç gruba ayrılarak gerçekleştirilmiştir. Hücresel morfolojinin gözlemlenmesi amacıyla ilk incelemeler, herhangi bir madde maruziyetinin yapılmadığı hücre hatları kontrol grubunda yapılmıştır.

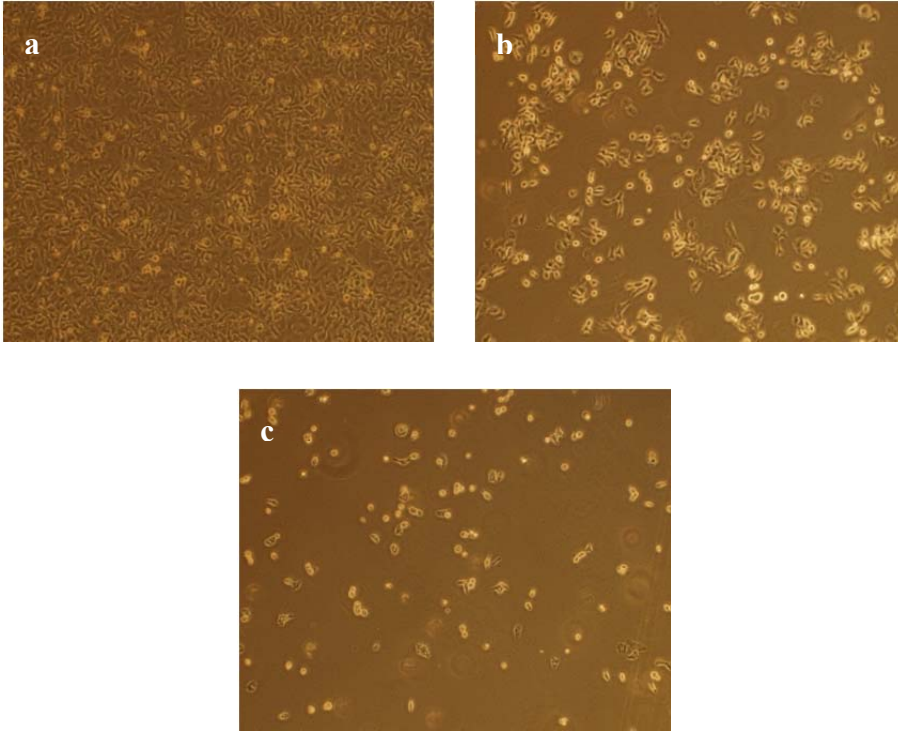
Test maddeleri için çözügen olarak kullanılan DMSO (% 0,05) ikinci grup olarak gözlemlenmiş ve DMSO kontrol (% 0,05) grubu olarak adlandırılmıştır. DMSO kullanılan bu konsantrasyonda hücre hatları üzerinde herhangi bir toksik etkiye sahip değildir. Sitotoksik etkinin gözlemlendiği hücre hatları KL21 polih herbal formülasyonun farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılmış ve hücrelerde oluşturdukları morfolojik değişimler inverted mikroskop ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7).



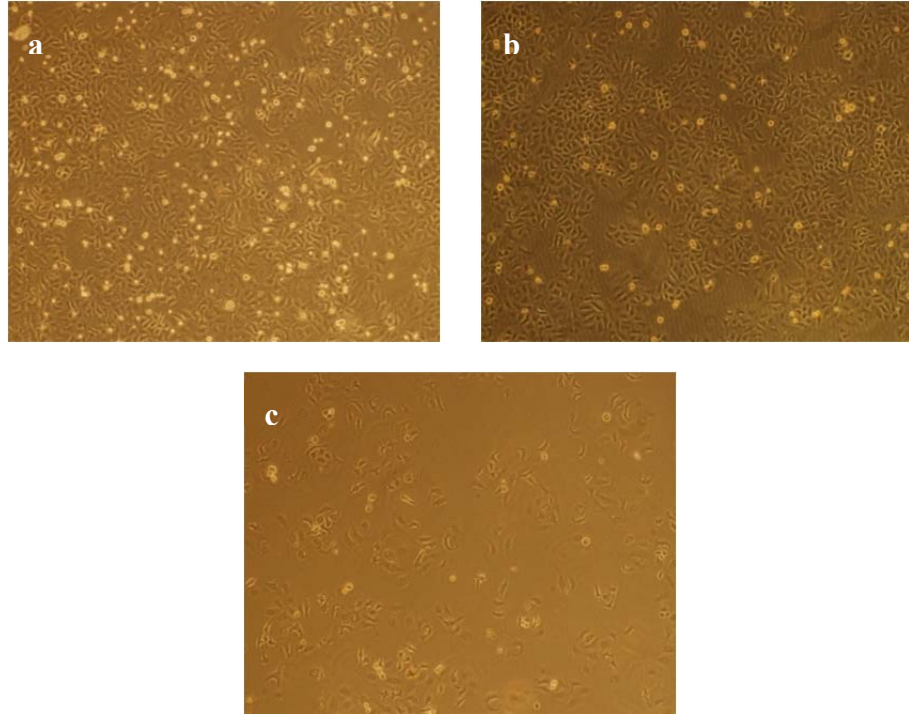
Şekil 3.3 A549 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme **a.** Hücre Kontrol **b.** DMSO



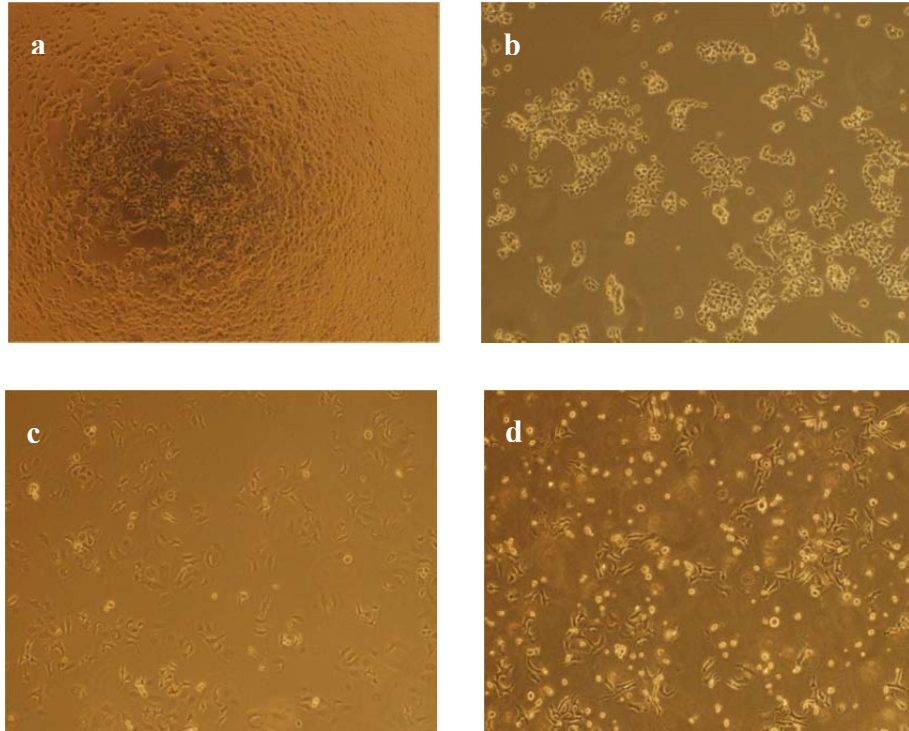
Şekil 3.4 Caco-2 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme **a.** Hücre Kontrol **b.** DMSO



Şekil 3.5 MCF-7 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme **a.** Hücre Kontrol **b.** DMSO **c.** KL21 Polihherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi Maruziyeti



Şekil 3.6 HeLa Hücre Hattı Morfolojik İnceleme **a.** Hücre kontrol **b.** DMSO **c.** KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi Maruziyeti



Şekil 3.7 HEK-293 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme **a.** Hücre kontrol **b.** DMSO **c.** KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi Maruziyeti **d.** Metanol Ekstresi Maruziyeti

3.3.2. *In vitro* genotoksik etkinin belirlenmesi

3.3.2.1. *Salmonella*/mikrozom (AMES) testi sonuçları

Çalışma, Xenometrix firmasından temin edilen Ames MPFtm kiti, *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 15357 suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Test organizma ve genotip özelliklerinin kontrol edilmesi Xenometrix tarafından yapılmış ve sertifikalandırılmıştır. Sıçan karaciğerlerinden elde edilen S9 fraksiyonu KL21 polih herbal formülasyonunun biyoaktivasyonunu arttırmak amacıyla kullanılmış, test ortamına S9 karışı ilave edilmesi veya edilmemesi durumları için farklı pozitif kontroller ile analiz gerçekleştirilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilirken, KL21 polih herbal formülasyonunun mutajen olup olmadığının belirlenmesinde 2 kriter göz önünde bulundurulmuştur;

- KL21 polih herbal formülasyonunun oluşturduğu revertant koloni sayısında çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2 kattan fazla artış meydana gelmesi durumu.
- KL21 polih herbal formülasyonunun oluşturduğu revertant koloni sayısında doza bağlı bir artış meydana geliyorsa ve bu dozların oluşturduğu revertant koloni sayıları çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en az 1 doz için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmesi durumu.

Karşılaştırma “Student-T Testi” ile yapılmış ve $p \leq 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilerek değerlendirilmiştir. Test sonunda elde edilen veriler Xenometrix firması tarafından düzenlenen excel formatına aktarılıp değerlendirilmiştir.

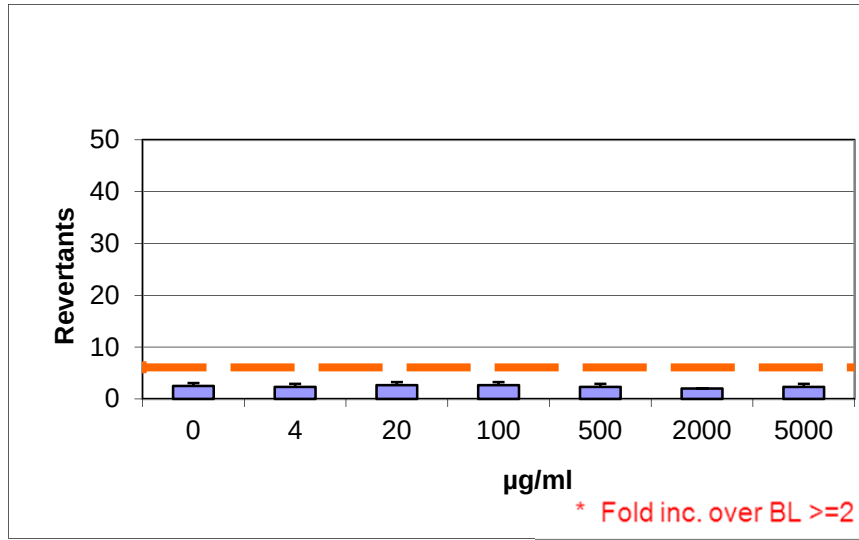
Bu sonuçlara göre KL21 polih herbal formülasyonunun, 5000 µg/mL konsantrasyonda bile *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 15357 suşları üzerinde mutasyona neden olabilecek herhangi bir etki göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15; Şekil 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.21, 3.22, 3.23).

Çizelge 3.8 Revertant Koloni Sayıları (*S.typhimurium* TA 98)

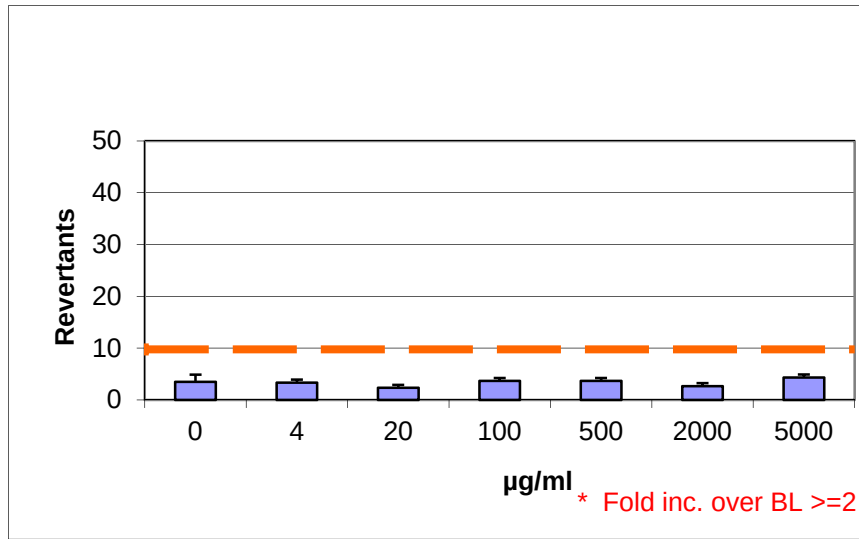
Konsantrasyon (µg/mL)	Etanol Ekstresi						Metanol Ekstresi					
	TA 98 -S9			TA 98 +S9			TA 98 -S9			TA 98 + S9		
	Tekrar											
4	2	3	2	4	3	3	1	2	1	3	3	4
20	3	3	2	2	2	3	1	1	1	1	1	1
100	3	2	3	4	3	4	7	7	6	3	2	2
500	2	3	2	4	4	3	2	3	3	2	2	1
2000	2	2	2	3	3	2	1	1	1	1	1	1
5000	2	2	3	5	4	4	2	3	5	1	1	2
Pozitif Kontrol	48	47	48	47	44	45	45	46	46	46	45	48

Çizelge 3.9 *S. typhimurium* TA 98 Mutajenite Denemesinin Sonuçları

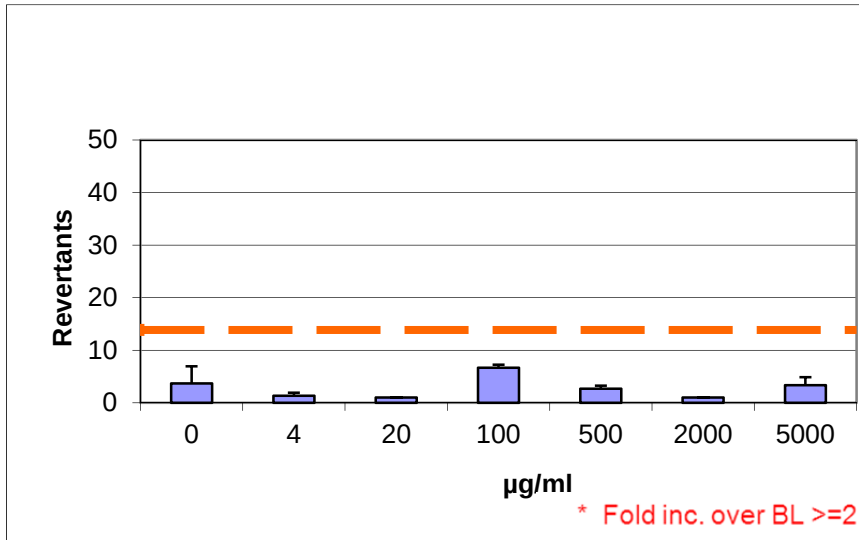
KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	2,50	3,50	0,55	1,38				
4	3	2,33	3,33	0,58	0,58	0,77	0,68	0,3423	0,4252
20	3	2,67	2,33	0,58	0,58	0,87	0,48	0,3423	0,1066
100	3	2,67	3,67	0,58	0,58	0,87	0,75	0,3423	0,4252
500	3	2,33	3,67	0,58	0,58	0,77	0,75	0,3423	0,4252
2000	3	2,00	2,67	0,00	0,58	0,66	0,55	0,0852	0,1804
5000	3	2,33	4,33	0,58	0,58	0,77	0,89	0,3423	0,1804
Pozitif Kontrol	3	47,67	45,33	0,58	1,53				
KL21 Poliherbal Formülasyonu Metanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	3,67	2,83	3,27	2,32				
4	3	1,33	3,33	0,58	0,58	0,19	0,65	0,1368	0,3659
20	3	1,00	1,00	0,00	0,00	0,14	0,19	0,1071	0,1135
100	3	6,67	2,33	0,58	0,58	0,96	0,45	0,0852	0,3659
500	3	2,67	1,67	0,58	0,58	0,38	0,32	0,3131	0,2163
2000	3	1,00	1,00	0,00	0,00	0,14	0,19	0,1071	0,1135
5000	3	3,33	1,33	1,53	0,58	0,48	0,26	0,4373	0,1600
Pozitif Kontrol	3	45,67	46,33	0,58	1,53				



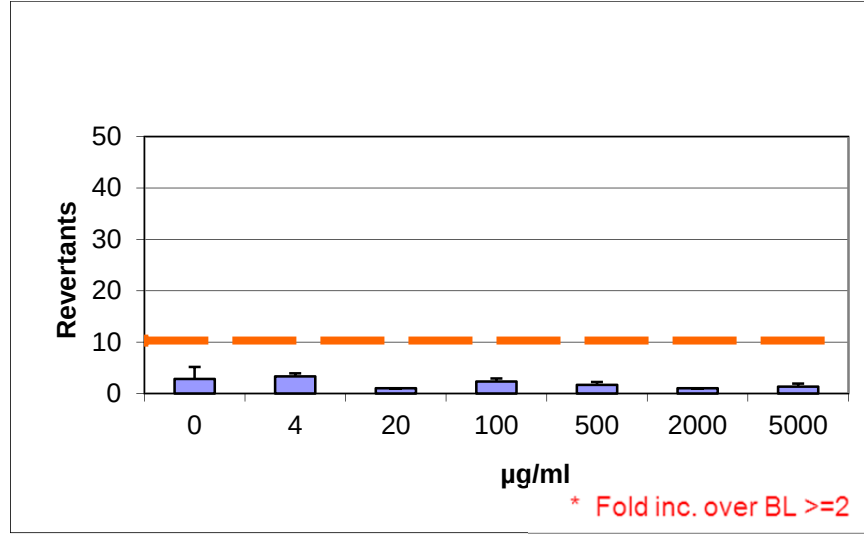
Şekil 3.8 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 98 Suşu (-S9)



Şekil 3.9 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 98 Suşu (+S9)



Şekil 3.10 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 98 Suşu (-S9)



Şekil 3.11 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 98 Suşu (+S9)

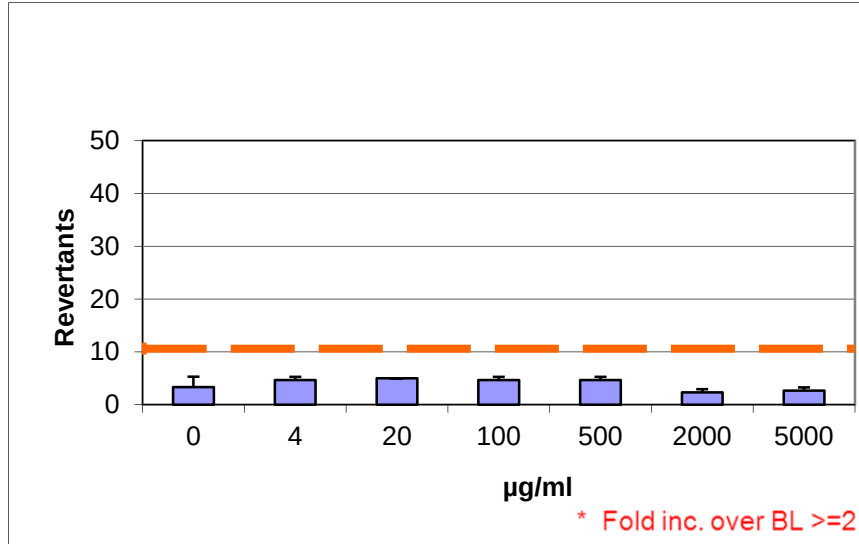
Çizelge 3.10 Revertant Koloni Sayıları (*S. typhimurium* TA 100)

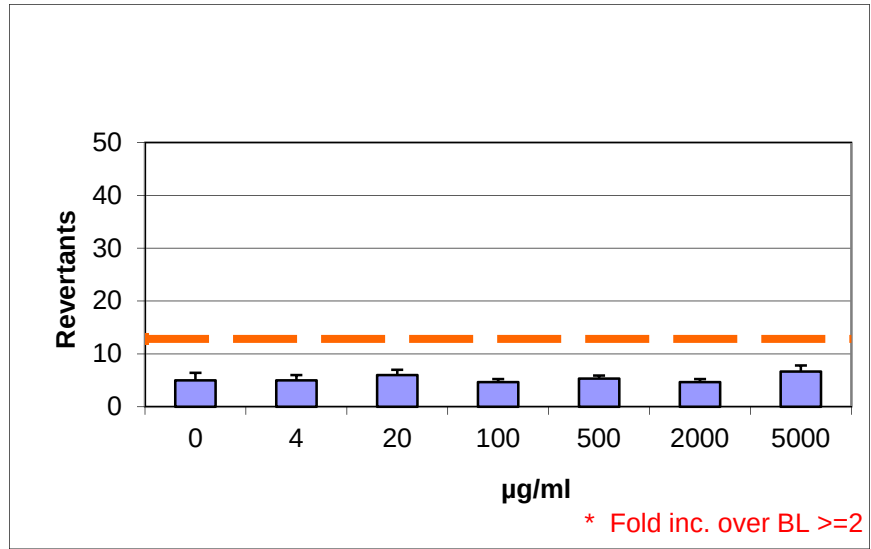
Konsantrasyon (µg/mL)	Etanol Ekstresi						Metanol Ekstresi					
	TA 100 -S9			TA 100 +S9			TA 100 -S9			TA 100 +S9		
	Tekrar											
4	4	5	5	4	5	6	4	5	5	4	3	4
20	5	5	5	6	7	5	6	5	5	6	7	6
100	4	5	5	5	4	5	5	5	6	5	5	4
500	5	4	5	6	5	5	5	4	5	5	6	5
2000	2	2	3	5	5	4	5	5	6	5	5	6
5000	3	2	3	6	8	6	1	2	6	6	7	7
Pozitif Kontrol	48	46	48	47	44	45	48	47	48	47	44	45

Çizelge 3.11 *S. typhimurium* TA 100 Mutajenite Denemesinin Sonuçları

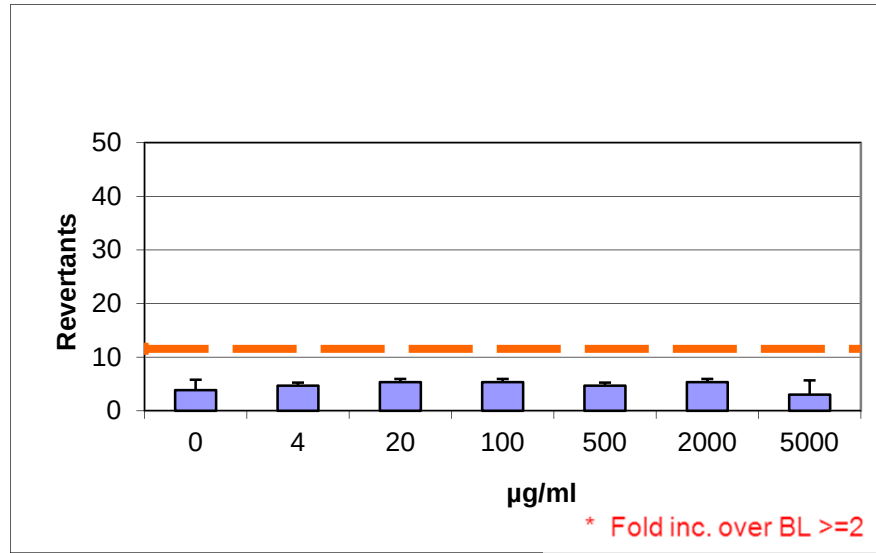
KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	3,33	5,00	1,97	1,41				
4	3	4,67	5,00	0,58	1,00	0,88	0,78	0,1507	0,5000
20	3	5,00	6,00	0,00	1,00	0,94	0,94	0,0995	0,1579
100	3	4,67	4,67	0,58	0,58	0,88	0,73	0,1507	0,3569
500	3	4,67	5,33	0,58	0,58	0,88	0,83	0,1507	0,3569
2000	3	2,33	4,67	0,58	0,58	0,44	0,73	0,2152	0,3569
5000	3	2,67	6,67	0,58	1,15	0,50	1,04	0,2972	0,0616
Pozitif Kontrol	3	47,33	45,33	1,15	1,53				

KL21 Poliherbal Formülasyonu Metanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	3,83	5,33	1,94	1,75				
4	3	4,67	3,67	0,58	0,58	0,81	0,52	0,2515	0,0815
20	3	5,33	6,33	0,58	0,58	0,92	0,89	0,1222	0,1904
100	3	5,33	4,67	0,58	0,58	0,92	0,66	0,1222	0,2763
500	3	4,67	5,33	0,58	0,58	0,81	0,75	0,2515	0,5000
2000	3	5,33	5,33	0,58	0,58	0,92	0,75	0,1222	0,5000
5000	3	3,00	6,67	2,65	0,58	0,52	0,94	0,3016	0,1262
Pozitif Kontrol	3	47,67	45,33	0,58	1,53				

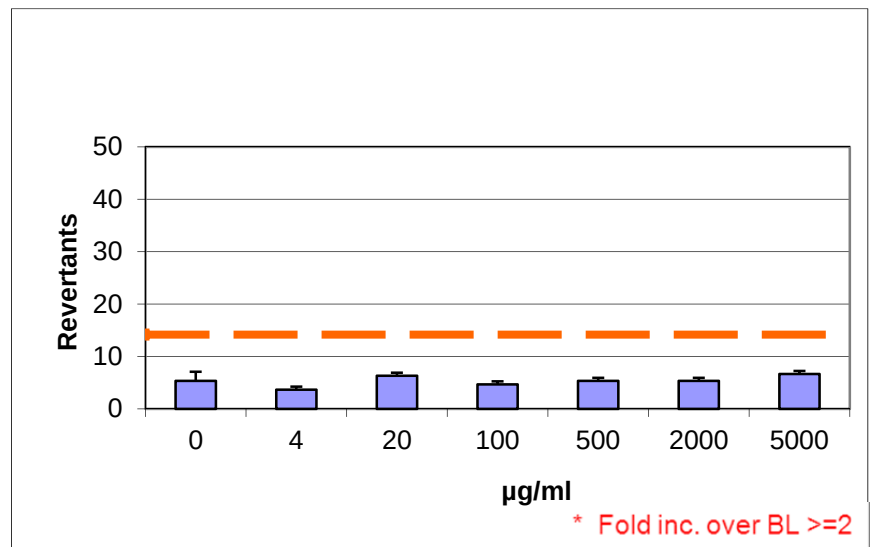
Şekil 3.12 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 100 Suşu (-S9)



Şekil 3.13 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 100 Suşu (+S9)



Şekil 3.14 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 100 Suşu (-S9)



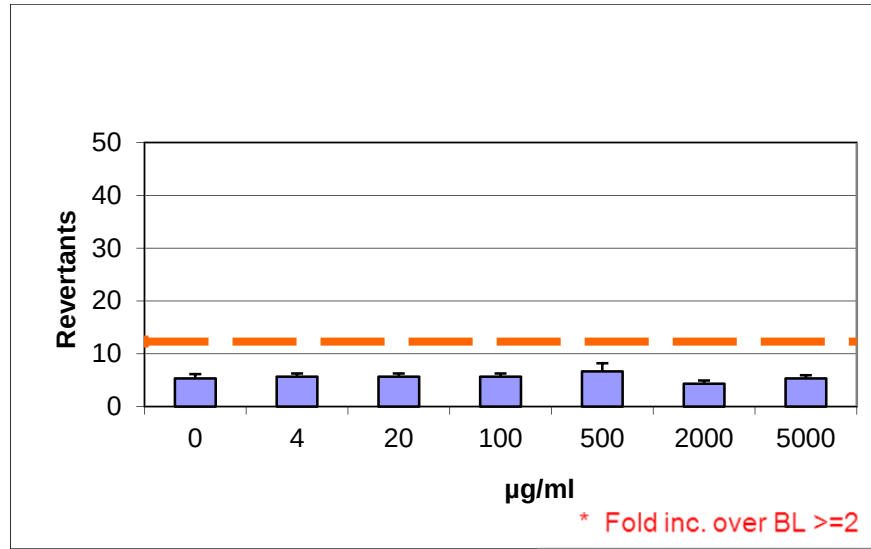
Şekil 3.15 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA100 Suşu (+S9)

Çizelge 3.12 Revertant Koloni Sayıları (*S.typhimurium* TA 1535)

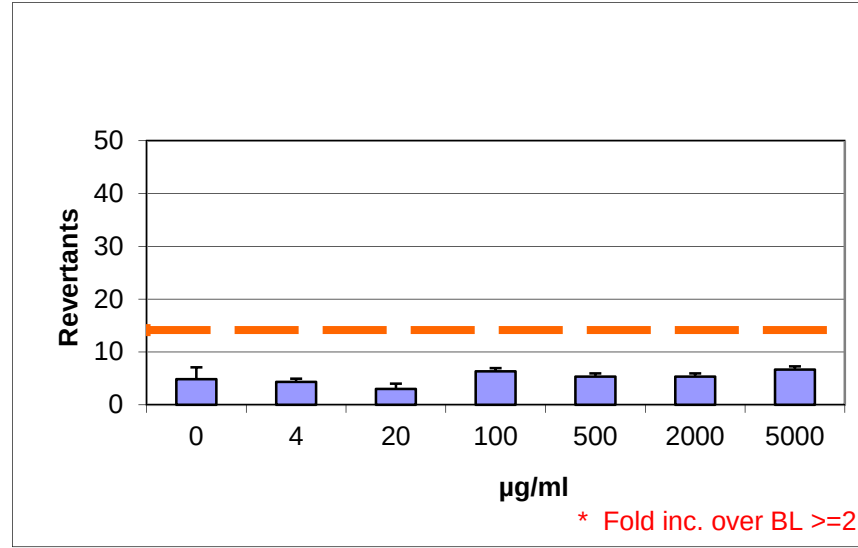
Konsantrasyon (µg/mL)	Etanol Ekstresi						Metanol Ekstresi					
	TA 1535 -S9			TA 1535 +S9			TA 1535 -S9			TA 1535 +S9		
	Tekrar											
4	5	6	6	4	4	5	4	5	5	3	3	4
20	5	6	6	4	3	2	6	5	5	3	3	2
100	5	6	6	6	6	7	5	5	5	5	5	4
500	5	8	7	5	5	6	5	4	5	5	6	5
2000	4	4	5	5	5	6	4	4	3	4	5	4
5000	5	5	6	6	7	7	5	5	6	3	3	4
Pozitif Kontrol	47	44	45	48	47	48	47	47	48	47	47	48

Çizelge 3.13 *S. typhimurium* TA 1535 Mutajenite Denemesinin Sonuçları

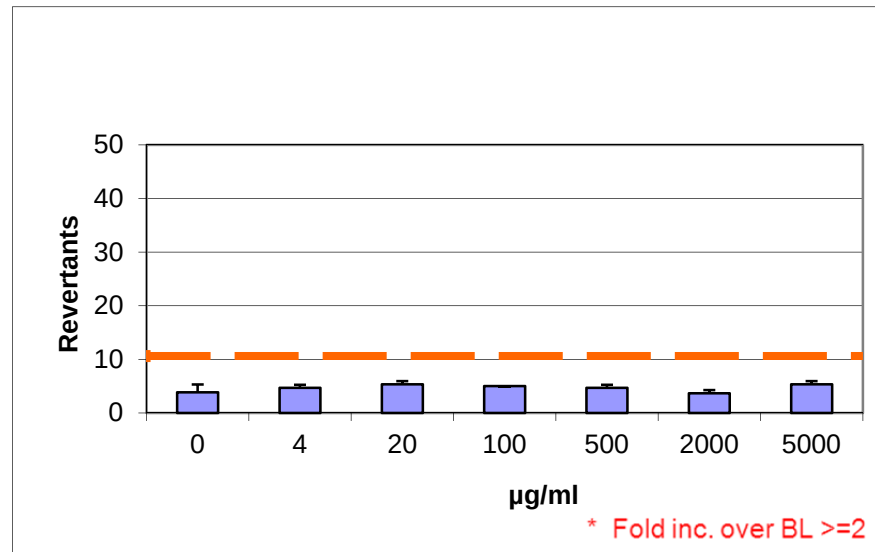
KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	5,33	4,83	0,82	2,23				
4	3	5,67	4,33	0,58	0,58	0,92	0,61	0,2763	0,3610
20	3	5,67	3,00	0,58	1,00	0,92	0,42	0,2763	0,1135
100	3	5,67	6,33	0,58	0,58	0,92	0,90	0,2763	0,1515
500	3	6,67	5,33	1,53	0,58	1,08	0,76	0,0606	0,3610
2000	3	4,33	5,33	0,58	0,58	0,70	0,76	0,0518	0,3610
5000	3	5,33	6,67	0,58	0,58	0,87	0,94	0,5000	0,1082
Pozitif Kontrol	3	45,33	47,67	1,53	0,58				
KL21 Poliherbal Formülasyonu Metanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	3,83	3,33	1,47	1,97				
4	3	4,67	3,33	0,58	0,58	0,88	0,63	0,1942	0,5000
20	3	5,33	2,67	0,58	0,58	1,01	0,50	0,0709	0,2972
100	3	5,00	4,67	0,00	0,58	0,94	0,88	0,1132	0,1507
500	3	4,67	5,33	0,58	0,58	0,88	1,01	0,1942	0,0691
2000	3	3,67	4,33	0,58	0,58	0,69	0,82	0,4297	0,2152
5000	3	5,33	3,33	0,58	0,58	1,01	0,63	0,0709	0,5000
Pozitif Kontrol	3	47,33	47,33	0,58	0,58				



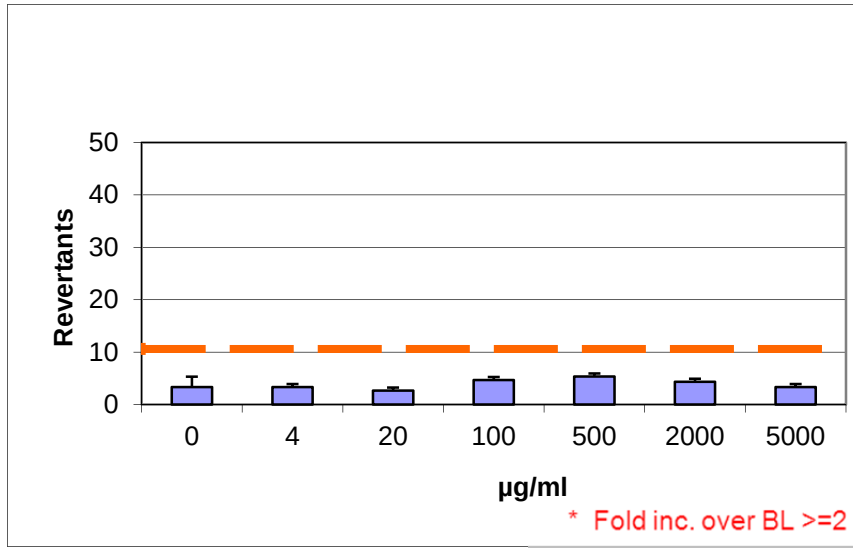
Şekil 3.16 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 1535 Suşu (-S9)



Şekil 3.17 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 1535 Suşu (+S9)



Şekil 3.18 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 1535 Suşu (-S9)



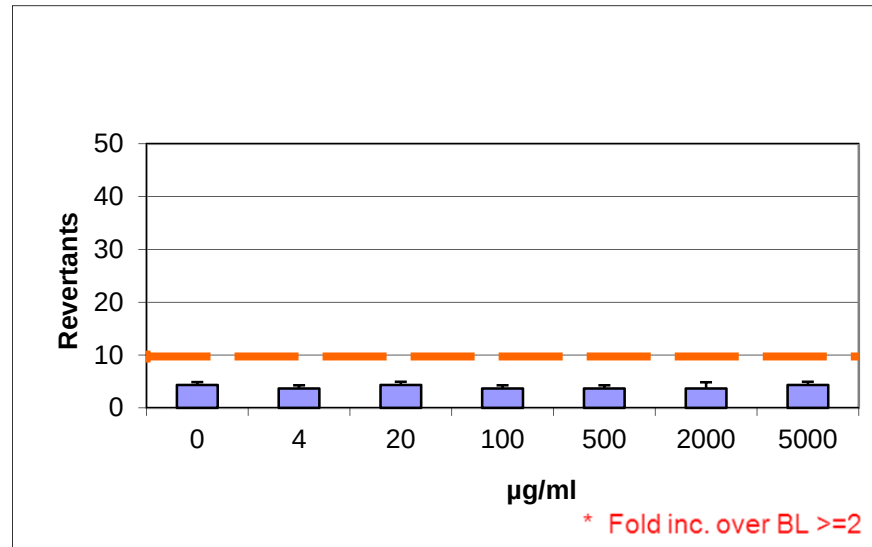
Şekil 3.19 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA1535 Suşu (+S9)

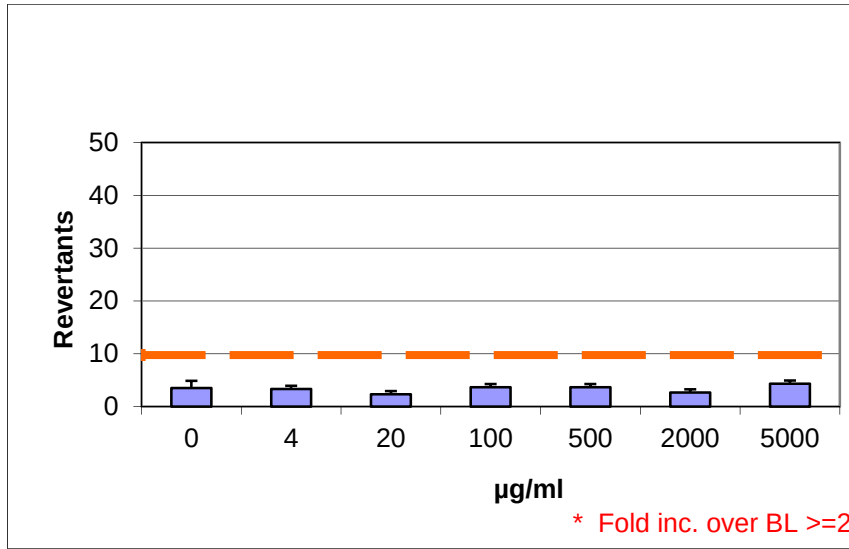
Çizelge 3.14 Revertant Koloni Sayıları (*S. typhimurium* TA 1537)

Konsantrasyon (µg/mL)	Etanol Ekstresi						Metanol Ekstresi					
	TA 1537 -S9			TA 1537 +S9			TA 1537 -S9			TA 1537 +S9		
	Tekrar											
4	4	3	4	4	3	3	2	2	3	3	3	4
20	4	5	4	2	2	3	4	3	3	3	4	4
100	4	3	4	4	3	4	5	4	3	3	2	2
500	4	4	3	4	4	3	2	3	3	2	2	5
2000	3	3	5	3	3	2	4	3	3	3	2	2
5000	5	4	4	5	4	4	2	3	5	3	5	5
Pozitif Kontrol	47	48	48	47	48	45	47	46	46	48	47	48

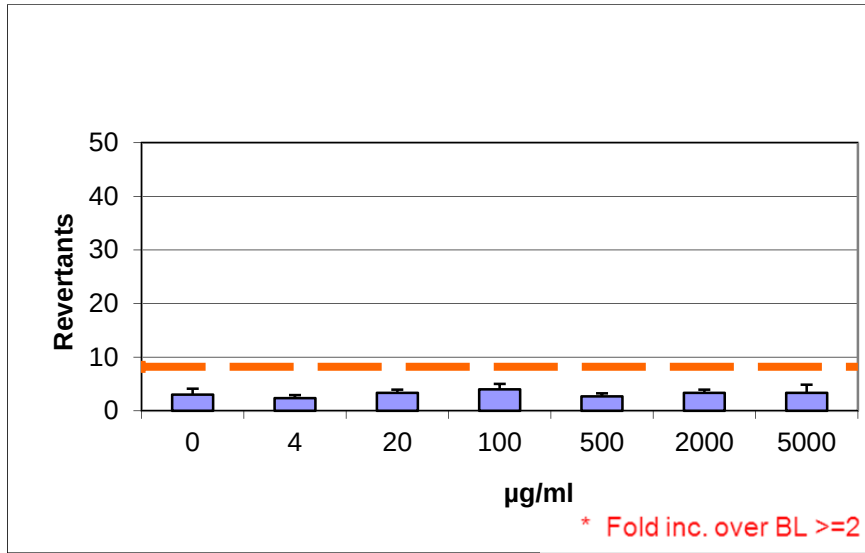
Çizelge 3.15 *S. typhimurium* TA 1537 Mutajenite Denemesinin Sonuçları

KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	4,33	3,50	0,52	1,38				
4	3	3,67	3,33	0,58	0,58	0,76	0,68	0,0606	0,4252
20	3	4,33	2,33	0,58	0,58	0,89	0,48	0,5000	0,1066
100	3	3,67	3,67	0,58	0,58	0,76	0,75	0,0606	0,4252
500	3	3,67	3,67	0,58	0,58	0,76	0,75	0,0606	0,4252
2000	3	3,67	2,67	1,15	0,58	0,76	0,55	0,1262	0,1804
5000	3	4,33	4,33	0,58	0,58	0,89	0,89	0,5000	0,1804
Pozitif Kontrol	3	47,67	46,67	0,58	1,53				
KL21 Poliherbal Formülasyonu Metanol Ekstresi									
Konsantrasyon (µg/mL)	n	Pozitif well'ler için her bir konsantrasyona ilişkin ortalama değerler		Standart Sapma		Kat Artışı (over baseline)		t-testi p-değeri (eşleştirilmemiş tek yönlü)	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Negatif Kontrol	6	3,00	4,33	1,10	1,97				
4	3	2,33	3,33	0,58	0,58	0,57	0,53	0,1831	0,2152
20	3	3,33	3,67	0,58	0,58	0,81	0,58	0,3219	0,2972
100	3	4,00	2,33	1,00	0,58	0,98	0,37	0,1137	0,0691
500	3	2,67	3,00	0,58	1,73	0,65	0,48	0,3219	0,1773
2000	3	3,33	2,33	0,58	0,58	0,81	0,37	0,3219	0,0691
5000	3	3,33	4,33	1,53	1,15	0,81	0,69	0,3569	0,5000
Pozitif Kontrol	3	46,33	47,67	0,58	0,58				

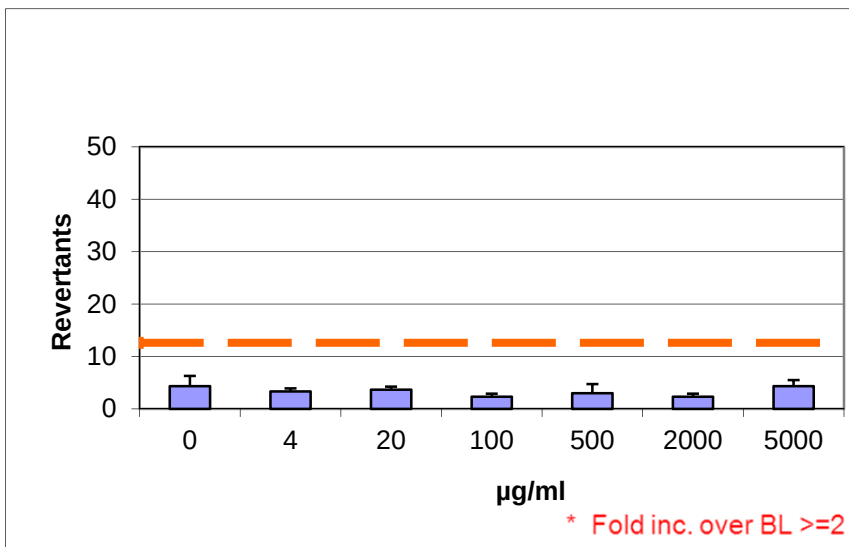
Şekil 3.20 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 1537 Suşu (-S9)



Şekil 3.21 Etanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 1537 Suşu (+S9)



Şekil 3.22 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA 1537 Suşu (-S9)



Şekil 3.23 Metanol Ekstresi *S. typhimurium* TA1537 Suşu (+S9)

3.3.3. *In vivo* akut toksisite testi sonucu

KL21 Poliherbal formülasyonu, dişi ve erkek deney fareleri üzerinde yapılan oral akut toksisite testi sonucunda oral LD₅₀ değeri belirlenmiştir. Kontrol gruba serum fizyolojik olmak üzere 175 mg/kg, 550 mg/kg ve 2000 mg/kg dozlarda hazırlanan KL21 Poliherbal formülasyonu fareler oral olarak uygulanmış, 24 ve 48 saat sonra hayvan sayısında herhangi bir değişim olmamıştır. KL21 Poliherbal formülasyonu oral LD₅₀ değeri 2000 mg/kg'dan fazla belirlenmiştir (Çizelge 3.16). “The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GSH)” kapsamında 5 kategoride sınıflandırılan akut toksisite test sonuçlarına göre KL21 poliherbal formülasyonu, 2000 mg/kg dozda oral olarak alındığında toksik değildir şeklinde değerlendirilir.

Çizelge 3.16 2000 mg/kg Doz Uygulamada Analiz Durdurma Kriterleri

Basamaklar	Dahil Edilen (I) Hariç Tutulan (E)	Dozlar (mg/kg)	Cevap (X) Cevap Yok (O)	Log ₁₀ Doz
1	I	175	O	2,2430
2	I	550	O	2,7404
3	I	2000	O	3,3010
4	I	2000	O	3,3010
5	I	2000	O	3,3010
6	E	5 hayvandan sonra analiz durdurulur çünkü 3 hayvanın hayatta kalması 2000 mg/kg doz uygulaması için limit değerdir.		
7	E			
8	E			
Hesaplanmış maksimum LD ₅₀ değeri ≥ 2000 mg/kg				

3.3.4. *In vivo* subakut toksisite testi sonuçları

Çalışmaya 40 fare ile başlanmış ve yine 40 fare ile tamamlanmıştır. KL21 Poliherbal formülasyonu uygulamasını takiben farelerde herhangi bir sağlık problemine rastlanmamıştır.

3.3.4.1. Total vücut ve organ ağırlıkları ile ilgili bulgular

Çalışma sonunda fareler tartılmış, anestezi altına alınmış ve sakrifiye edilen farelerden çıkarılan iç organlar yıkanmış ve tartılmıştır. Deneme sonunda, KL21 poliherbal formülasyonunun farklı dozları uygulanan dişi ve erkek farelerin final vücut ağırlıkları, kontrol grubu ile kıyaslandığında ve başlangıç ağırlıklarına oranla herhangi değişiklik göstermediği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Benzer şekilde

tüm uygulama gruplarında bulunan fareler, iç organ ağırlıkları ve rölatif organ ağırlıkları (organ ağırlığı/total vücut ağırlığı) bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık göstermemektedir (Çizelge 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22).

Çizelge 3.17 Erkek Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları

Uygulama Grupları	Total vücut ağırlığı (g) (ort ± SS)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
Kontrol	24,22 ± 1,30	24,58 ± 1,71	25,07 ± 1,43	28,80 ± 2,91	29,10 ± 2,86
300 mg/kg	24,28 ± 1,11	24,80 ± 1,61	25,01 ± 1,68	28,47 ± 1,94	28,70 ± 1,97
600 mg/kg	24,02 ± 1,36	25,85 ± 1,03	26,40 ± 0,49	27,44 ± 3,11	27,83 ± 2,64
900 mg/kg	24,56 ± 1,68	25,26 ± 0,99	25,79 ± 0,53	27,67 ± 1,21	27,82 ± 0,68

Gruplar arasında vücut ağırlığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.18 Dişi Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları

Uygulama Grupları	Total vücut ağırlığı (g) (ort ± SS)				
	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
Kontrol	24,12 ± 1,14	25,71 ± 0,82	25,84 ± 0,78	28,52 ± 1,31	28,52 ± 1,31
300 mg/kg	24,42 ± 0,93	25,70 ± 0,63	25,69 ± 0,53	26,88 ± 0,92	26,88 ± 0,92
600 mg/kg	23,40 ± 0,60	24,37 ± 1,33	24,78 ± 1,27	26,46 ± 2,22	26,46 ± 2,22
900 mg/kg	24,42 ± 0,66	25,71 ± 0,91	26,13 ± 0,55	26,14 ± 1,99	26,14 ± 1,99

Gruplar arasında vücut ağırlığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.19 Erkek Farelerin Organ Ağırlık Ortalamaları

Grup	Karaciğer (ort ± SS)	Böbrek* (ort ± SS)	Testis (ort ± SS)
Kontrol	1,54 ± 0,20	0,38 ± 0,05	0,16 ± 0,04
300 mg/kg	1,55 ± 0,17	0,41 ± 1,51	0,16 ± 0,01
600 mg/kg	1,57 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,14 ± 0,02
900 mg/kg	1,56 ± 0,11	0,39 ± 0,02	0,15 ± 0,02

*Böbrek ağırlıkları her iki organın toplam ağırlığı olarak verilmiştir. Gruplar arasında organ ağırlığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.20 Dişi Farelerin Organ Ağırlık Ortalamaları

Grup	Karaciğer (ort ± SS)	Böbrek* (ort ± SS)
Kontrol	1,47 ± 0,25	0,32 ± 0,02
300 mg/kg	1,45 ± 0,12	0,32 ± 0,06
600 mg/kg	1,43 ± 0,07	0,30 ± 0,06
900 mg/kg	1,46 ± 0,14	0,39 ± 0,03

*Böbrek ağırlıkları her iki organın toplam ağırlığı olarak verilmiştir. Gruplar arasında organ ağırlığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.21 Erkek Farelerin Rölatif Organ Ağırlıkları

Grup	Karaciğer (ort ± SS)	Böbrek (ort ± SS)	Testis (ort ± SS)
Kontrol	0,0528 ± 0,0029	0,0131 ± 0,0014	0,0055 ± 0,0012
300 mg/kg	0,0520 ± 0,0011	0,0146 ± 0,0011	0,0057 ± 0,0005
600 mg/kg	0,0569 ± 0,0028	0,0139 ± 0,0018	0,0049 ± 0,0006
900 mg/kg	0,0562 ± 0,0033	0,0189 ± 0,0011	0,0053 ± 0,0011

Gruplar arasında rölatif organ ağırlığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.22 Dişi Farelerin Rölatif Organ Ağırlıkları

Grup	Karaciğer (ort ± SS)	Böbrek (ort ± SS)
Kontrol	0,0517 ± 0,0097	0,0109 ± 0,0011
300 mg/kg	0,0535 ± 0,0042	0,0117 ± 0,0013
600 mg/kg	0,0529 ± 0,0063	0,0108 ± 0,0018
900 mg/kg	0,0553 ± 0,0078	0,0112 ± 0,0018

Gruplar arasında rölatif organ ağırlığı bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

3.3.4.2. Biyokimyasal analiz sonuçları

Deneme sonunda, KL21 polih herbal formülasyonunun farklı dozları uygulanan dişi ve erkek farelerden alınan tam kan örnekleri, 16 biyokimyasal parametre bakımından incelenmiştir.

Dişi farelerde başlangıç ölçüm değerleri ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 3.23). Bununla birlikte 300 mg/kg grubunda yer alan dişi farelerin bitiş

parametrelerinden albümin değerinde azalma, benzer şekilde 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz grubunda, kalsiyum ve bazofil değerlerinde azalma; kolesterol değerinde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan artış tespit edilmiştir. Ayrıca biyokimya başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki karşılaştırmaya göre, dişi farelerde 300 mg/kg doz grubunda tespit edilen total protein değerinde artışın, 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz gruplarında ise albümin değerinde azalmanın ve kolesterolde artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.24).

Benzer şekilde erkek farelerde başlangıç ölçüm değerleri ile kontrol grubu kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 3.25). Bununla birlikte bitiş parametreleri kontrol grubu ile kıyaslandığında 900 mg/kg doz grubunda bazofil değerinde azalma, 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz grubunda ise kolesterol değerlerinde istatistiksel olarak $p < 0,05$ seviyesinde artış olarak farklılıklar belirlenmiştir. Ayrıca biyokimya başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki karşılaştırmaya göre, erkek farelerde kontrol grubunda total protein, 300 mg/kg doz grubunda soydum, 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz gruplarında ise kolesterolün artış gösterişi istatistiksel açıdan tespit edilmiştir (Çizelge 3.26).

Çizelge 3.23 Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları (Dişi)

Parametreler	Mammalian Liver Profile Kiti ve Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort $\pm$ SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Albümin (g/dL)	4,06 $\pm$ 0,23	4,18 $\pm$ 0,22	3,73 $\pm$ 0,40	3,90 $\pm$ 0,62
Alkalen Fosfataz (U/L)	80,60 $\pm$ 4,10	81,60 $\pm$ 9,02	82,20 $\pm$ 5,26	81,20 $\pm$ 4,71
Alanin aminotransferaz (U/L)	60,60 $\pm$ 14,64	58,40 $\pm$ 16,02	57,00 $\pm$ 12,98	61,00 $\pm$ 7,52
Amilaz (U/L)	802,20 $\pm$ 167,17	800,60 $\pm$ 198,18	833,60 $\pm$ 190,65	841,20 $\pm$ 204,24
Total Bilurbin (mg/dL)	0,30 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,07
Kan Üre Azotu (mg/dL)	12,80 $\pm$ 2,77	12,60 $\pm$ 3,21	12,20 $\pm$ 1,64	12,00 $\pm$ 1,87
Kalsiyum (mg/dL)	9,94 $\pm$ 0,42	10,00 $\pm$ 0,89	10,40 $\pm$ 0,63	10,36 $\pm$ 0,84
Fosfat (mg/dL)	8,36 $\pm$ 1,48	8,26 $\pm$ 1,32	8,14 $\pm$ 1,61	8,34 $\pm$ 1,43
Kreatinin (mg/dL)	0,26 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,04
Glukoz (mg/dL)	215,40 $\pm$ 54,88	214,20 $\pm$ 16,68	216,40 $\pm$ 19,36	214,80 $\pm$ 53,22
Sodyum (mmol/L)	135,00 $\pm$ 3,24	135,80 $\pm$ 1,92	135,20 $\pm$ 1,79	136,40 $\pm$ 3,78
Potasyum (mmol/L)	6,02 $\pm$ 2,01	6,08 $\pm$ 1,48	6,10 $\pm$ 1,80	6,18 $\pm$ 1,67
Total Protein (g/dL)	5,56 $\pm$ 0,58	5,76 $\pm$ 0,47	5,35 $\pm$ 0,55	5,40 $\pm$ 0,45
Globulin (g/dL)	2,86 $\pm$ 0,42	2,42 $\pm$ 0,54	2,34 $\pm$ 0,65	2,22 $\pm$ 0,79
Bazofil (umol/L)	3,60 $\pm$ 2,41	3,40 $\pm$ 1,82	4,00 $\pm$ 1,58	3,80 $\pm$ 2,17
Kolesterol (mg/dL)	89,40 $\pm$ 16,50	96,40 $\pm$ 9,45	92,80 $\pm$ 4,55	90,20 $\pm$ 9,52

Gruplar arasında biyokimyasal değerler bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.24 Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları (Erkek)

Parametreler	Mammalian Liver Profile Kiti ve Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort ± SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Albümin (g/dL)	3,56±0,56	3,62±0,45	3,70±0,46	3,46±0,65
Alkalen Fosfataz (U/L)	86,60±7,47	89,60±12,22	85,20±4,97	88,80±7,98
Alanin aminotransferaz (U/L)	58,60±8,96	61,80±10,11	63,20±6,98	64,00±8,28
Amilaz (U/L)	827,20±30,84	818,80±11,34	821,20±57,01	826,40±78,79
Total Bilurbin (mg/dL)	0,24±0,09	0,28±0,04	0,26±0,05	0,24±0,05
Kan Üre Azotu (mg/dL)	11,80±4,09	11,40±2,61	11,00±2,55	11,60±3,05
Kalsiyum (mg/dL)	10,14±0,39	10,28±0,40	10,40±0,47	10,44±0,69
Fosfat (mg/dL)	8,10±1,60	8,50±1,35	8,26±1,51	8,30±1,27
Kreatinin (mg/dL)	0,32±0,13	0,34±0,05	0,32±0,11	0,36±0,09
Glukoz (mg/dL)	211,60±13,01	213,0±9,75	212,00±8,86	213,60±9,34
Sodyum (mmol/L)	136,00±2,55	135,60±2,07	136,00±1,41	137,80±1,10
Potasyum (mmol/L)	5,24±0,37	5,28±0,49	5,20±0,43	5,32±0,83
Total Protein (g/dL)	5,62±0,60	5,78±0,52	5,56±0,43	5,74±0,34
Globulin (g/dL)	2,36±0,55	2,34±0,59	2,28±0,57	2,26±0,66
Bazofil (umol/L)	4,00±2,00	4,20±1,48	3,80±1,30	4,00±1,58
Kolesterol (mg/dL)	85,00±11,60	86,02±6,57	89,00±2,55	89,80±5,45

Gruplar arasında biyokimyasal değerler bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.25 Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları (Dişi)

Parametreler	Mammalian Liver Profile Kiti ve Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Albümin (g/dL)	3,46±0,09*	3,08±0,42*	3,00±0,10*	3,34±0,11
Alkalen Fosfataz (U/L)	86,00±2,45	84,80±5,72	86,40±6,62	87,20±2,77
Alanin aminotransferaz (U/L)	55,80±3,49	55,60±4,34	56,60±2,51	57,40±2,07
Amilaz (U/L)	909,40±78,28	906,20±97,60	916,40±76,28	918,20±67,20
Total Bilurbin (mg/dL)	0,26±0,05	0,26±0,05	0,26±0,05	0,28±0,04
Kan Üre Azotu (mg/dL)	10,80±1,64	10,60±0,89	10,80±1,30	10,20±1,64
Kalsiyum (mg/dL)	9,78±0,16*	9,86±0,49*	10,28±0,56	10,62±0,34
Fosfat (mg/dL)	8,82±0,50	8,18±0,85	8,28±1,63	8,02±0,76
Kreatinin (mg/dL)	0,18±0,08	0,22±0,04	0,20±0,07	0,18±0,08
Glukoz (mg/dL)	222,80±12,54	226,40±9,45	227,40±17,81	223,80±8,79
Sodyum (mmol/L)	142,00±5,00	142,40±4,67	142,20±5,22	142,00±1,58
Potasyum (mmol/L)	5,06±0,47	5,28±0,38	5,22±0,19	5,22±0,19
Total Protein (g/dL)	6,24±0,30	6,34±0,27	6,28±0,38*	6,22±0,22
Globulin (g/dL)	2,74±0,38	2,84±0,40	2,82±0,31	2,84±0,54
Bazofil (umol/L)	2,00±0,71*	2,40±0,89*	3,86±0,32	3,20±0,36
Kolesterol (mg/dL)	125,80±7,25*	130,00±11,94*	95,00±9,06	94,80±6,43

* Gruplar arasında biyokimyasal değerler bakımından $p<0,05$ seviyesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 3.26 Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları (Erkek)

Parametreler	Mammalian Liver Profile Kiti ve Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort ± SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Albümin (g/dL)	3,00±0,20	2,84±0,17	2,88±0,22	3,04±0,18
Alkalen Fosfataz (U/L)	88,40±2,70	87,60±3,36	89,40±7,89	87,60±14,38
Alanin aminotransferaz (U/L)	62,00±2,55	62,20±1,79	61,20±3,77	63,80±3,42
Amilaz (U/L)	914,20±92,45	911,60±90,92	917,80±81,05	919,60±75,25
Total Bilurbin (mg/dL)	0,28±0,04	0,28±0,04	0,28±0,04	0,26±0,05
Kan Üre Azotu (mg/dL)	10,60±1,67	11,00±1,87	11,00±1,00	11,40±1,52
Kalsiyum (mg/dL)	9,92±0,36	10,16±0,49	10,06±0,32	10,44±0,44
Fosfat (mg/dL)	7,96±1,27	8,74±0,71	8,20±1,07	8,10±0,68
Kreatinin (mg/dL)	0,18±0,08	0,20±0,07	0,20±0,07	0,20±0,07
Glukoz (mg/dL)	288,80±8,70	227,20±11,56	226,40±11,33	227,20±5,54
Sodyum (mmol/L)	144,00±23,39	142,40±2,30	136,00±1,41	141,40±2,30*
Potasyum (mmol/L)	5,36±0,21	5,38±0,34	5,20±0,43	5,38±0,44
Total Protein (g/dL)	6,30±0,16	6,30±0,14	5,56±0,43	6,32±0,19
Globulin (g/dL)	2,84±0,32	2,92±0,18	2,28±0,57	2,90±0,27
Bazofil (umol/L)	3,34±0,19*	4,00±0,71	3,86±0,23	4,12±0,07
Kolesterol (mg/dL)	138,00±16,91*	132,00±6,71*	88,20±1,92	89,40±5,71

* Gruplar arasında biyokimyasal değerler bakımından $p < 0,05$ seviyesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmiştir.

3.3.4.3. Hematoloji analiz sonuçları

Deneme sonunda, KL21 Polihherbal formülasyonunun farklı dozları uygulanan dişi ve erkek farelerden alınan tam kan örnekleri ile 15 hematoloji parametresinin değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. Dişi farelerin başlangıç ve bitiş parametreleri karşılaştırıldığında, ayrıca kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan $p < 0,05$ seviyesinde herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 3.27, Çizelge 3.29). Benzer şekilde erkek farelerin hematolojik başlangıç ve bitiş değerlerinde kontrol grubuna kıyasla bir farklılık tespit edilmemiş olmakla birlikte, 900 mg/kg doz grubunun trombosit miktarında ilk ölçümlere oranla azalma meydana gelmiştir (Çizelge 3.28 ve Çizelge 3.30).

Çizelge 3.27 Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları (Dişi)

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Lökosit (10^9 hücre/L)	8,42±1,51	8,51±1,81	8,77±2,19	8,78±2,32
Lenfosit (10^9 hücre/L)	5,16±1,41	5,32±1,32	5,54±1,22	5,43±1,33
Monosit (10^9 hücre/L)	0,26±0,13	0,27±0,20	0,32±0,16	0,23±0,14
Nötrofil (10^9 hücre/L)	1,46±1,07	1,71±1,03	1,42±0,82	1,36±0,83
Eritrosit (10^{12} hücre/L)	8,21±0,95	8,10±1,10	8,16±1,10	8,02±0,98
Hemoglobin (g/L)	14,20±1,15	14,02±1,20	14,54±1,13	14,52±0,52
Hematokrit (%)	37,96±3,96	39,50±3,69	40,04±2,66	38,63±3,63
Eritrositlerin ortalama büyüklüğü (fl)	46,80±2,17	47,80±1,92	47,40±2,70	48,00±3,32
Hemoglobin miktarı (pg)	11,90±0,83	11,81±0,72	12,02±0,89	12,26±0,73
Hem. kons. yüzde ifadesi (g/dL)	28,06±2,48	27,56±2,293	28,14±2,30	28,04±2,06
Eritrositlerin dağılım genişliği (%)	18,22±0,78	18,54±0,54	18,38±0,49	18,56±0,88
Trombosit (10^9 hücre/L)	293,20±69,15	282,40±85,43	292,00±33,47	294,60±25,12
Trombositlerin kana oranı (%)	0,17±0,09	0,21±0,14	0,16±0,07	0,18±0,09
Trombositlerin ort. büyüklüğü (fl)	7,24±1,13	7,38±0,74	7,58±0,93	7,44±0,71
Trombositlerin dağılım genişliği (%)	34,16±1,57	34,30±2,17	34,22±2,30	36,62±2,73

Gruplar arasında hematolojik değerler bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.28 Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları (Erkek)

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Lökosit (10^9 hücre/L)	8,56±1,32	8,38±1,08	8,29±1,14	8,69±1,17
Lenfosit (10^9 hücre/L)	5,72±1,11	5,93±1,41	5,85±0,94	5,91±0,82
Monosit (10^9 hücre/L)	0,25±0,12	0,29±0,20	0,29±0,17	0,31±0,14
Nötrofil (10^9 hücre/L)	1,71±1,00	1,73±1,00	1,78±0,96	1,72±1,02
Eritrosit (10^{12} hücre/L)	8,57±1,07	8,39±1,36	8,63±1,22	8,54±1,30
Hemoglobin (g/L)	13,82±1,19	13,69±1,33	13,94±1,14	13,91±1,35
Hematokrit (%)	38,91±3,60	38,11±2,89	39,90±4,04	39,41±3,98
Eritrositlerin ortalama büyüklüğü (fl)	48,20±2,68	48,80±3,35	48,40±2,88	48,60±2,97
Hemoglobin miktarı (pg)	11,74±0,62	11,92±0,28	11,80±0,76	11,92±0,73
Hem. kons. yüzde ifadesi (g/dL)	28,00±1,58	28,20±2,59	28,80±0,84	28,40±1,14
Eritrositlerin dağılım genişliği (%)	18,9±0,9	18,72±0,67	18,70±0,46	18,98±0,45
Trombosit (10^9 hücre/L)	381,8±21,8	358,60±42,00	311,80±35,88	343,80±45,05
Trombositlerin kana oranı (%)	0,17±0,08	0,16±0,07	0,17±0,09	0,19±0,13
Trombositlerin ort. büyüklüğü (fl)	7,22±1,03	7,30±0,76	7,34±1,18	7,40±0,51
Trombositlerin dağılım genişliği (%)	34,26±1,66	34,90±1,02	34,92±1,14	34,58±0,65

Gruplar arasında hematolojik değerler bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.29 Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları (Dişi)

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Lökosit (10^9 hücre/L)	8,64±0,58	8,69±0,49	8,90±0,24	8,81±1,50
Lenfosit (10^9 hücre/L)	5,95±0,69	5,48±0,61	5,52±0,68	5,40±0,94
Monosit (10^9 hücre/L)	0,29±0,06	0,27±0,03	0,26±0,04	0,27±0,12
Nötrofil (10^9 hücre/L)	1,83±0,52	1,84±0,25	1,85±0,09	1,84±0,69
Eritrosit (10^{12} hücre/L)	8,79±0,33	8,87±0,18	8,87±0,18	8,94±0,41
Hemoglobin (g/L)	13,90±0,47	13,79±0,35	13,77±0,25	13,88±0,27
Hematokrit (%)	39,14±3,25	39,36±1,47	38,98±1,97	39,78±2,32
Eritrositlerin ortalama büyüklüğü (fl)	49,00±1,58	49,20±5,40	49,00±2,55	79,20±1,48
Hemoglobin miktarı (pg)	11,68±0,48	11,60±0,46	11,68±0,48	11,95±0,44
Hem. kons. yüzde ifadesi (g/dL)	28,70±2,09	29,63±1,01	29,64±1,24	29,92±1,54
Eritrositlerin dağılım genişliği (%)	18,58±0,94	18,58±0,94	18,58±0,94	18,90±1,66
Trombosit (10^9 hücre/L)	288,80±8,58	288,20±8,76	287,20±6,42	287,20±7,33
Trombositlerin kana oranı (%)	0,20±0,08	0,23±0,17	0,24±0,08	0,27±0,04
Trombositlerin ort. büyüklüğü (fl)	7,248±0,50	7,16±0,30	7,26±0,38	7,14±0,59
Trombositlerin dağılım genişliği (%)	35,60±2,23	35,34±2,90	35,82±2,52	35,40±1,41

Gruplar arasında hematolojik değerler bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.30 Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları (Erkek)

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)			
	900 mg/kg	600 mg/kg	300 mg/kg	Kontrol
Lökosit (10^9 hücre/L)	9,93±0,39	9,66±0,38	9,96±0,34	9,81±1,10
Lenfosit (10^9 hücre/L)	6,39±0,92	6,50±0,90	6,48±0,80	6,34±0,85
Monosit (10^9 hücre/L)	0,38±0,10	0,37±0,07	0,37±0,05	0,38±0,14
Nötrofil (10^9 hücre/L)	1,52±0,35	1,58±0,34	1,54±0,45	1,59±0,51
Eritrosit (10^{12} hücre/L)	9,40±0,53	9,48±0,82	9,56±0,92	9,43±1,04
Hemoglobin (g/L)	13,42±0,87	13,36±1,01	13,44±0,87	13,62±1,10
Hematokrit (%)	40,57±1,56	40,85±1,98	40,42±1,65	40,82±1,50
Eritrositlerin ortalama büyüklüğü (fl)	48,20±1,92	48,00±2,24	48,00±2,12	48,00±1,39
Hemoglobin miktarı (pg)	11,78±0,42	11,86±0,38	11,81±0,49	11,77±0,38
Hem. kons. yüzde ifadesi (g/dL)	30,78±1,63	30,47±1,29	30,68±0,88	30,52±1,06
Eritrositlerin dağılım genişliği (%)	20,02±1,00	20,36±1,58	20,04±1,54	20,64±1,96
Trombosit (10^9 hücre/L)	287,80±8,26*	287,00±9,82	289,00±7,07	286,80±45,89
Trombositlerin kana oranı (%)	0,28±0,07	0,29±0,12	0,28±0,10	0,28±0,15
Trombositlerin ort. büyüklüğü (fl)	7,72±1,62	7,90±1,87	7,82±2,17	7,30±1,70
Trombositlerin dağılım genişliği (%)	35,42±1,70	35,78±2,51	35,34±1,88	34,96±2,39

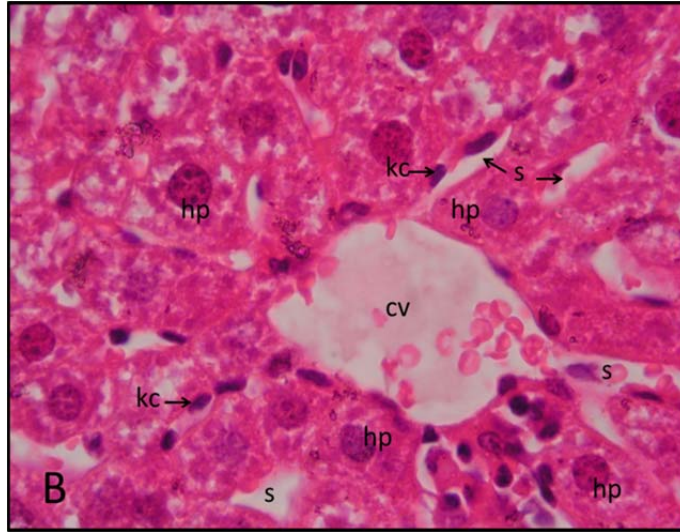
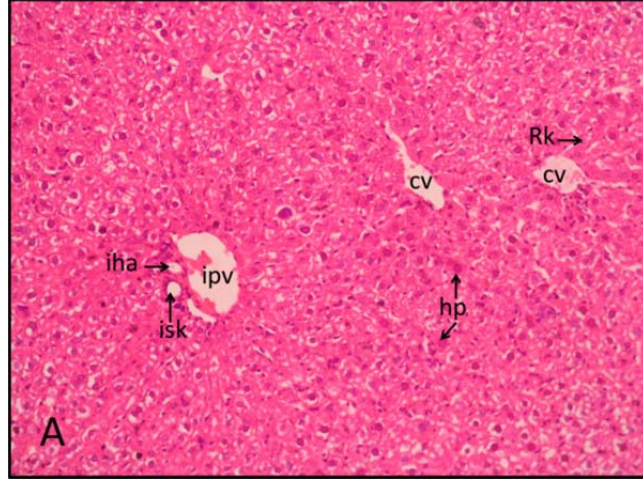
Gruplar arasında hematolojik değerler bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

3.3.4.4. Histolojik analizler

3.3.4.4.1. Hemotoksilen & Eozin boyama sonuçları

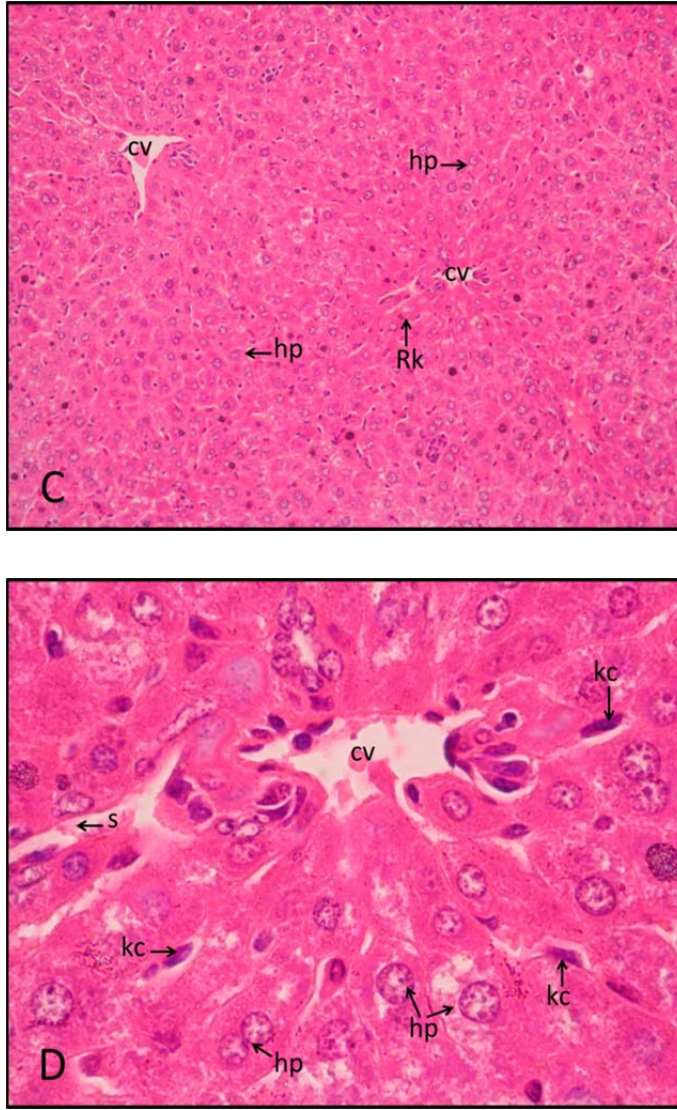
Hematoksilen-Eosin ile boyanmış karaciğer dokusu kesitleri rutin histolojik parametreler (parankimal ve stromal değişiklikler) açısından incelenmiştir. Genel histolojik görünüm dişi fare grupları, erkek fare grupları ve dişi ve erkek gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre, karaciğer dokusu genel

histolojik görünümü tüm gruplarda normal olarak değerlendirilmiştir. Sentral ven, interlobular portal ven, hepatik arter ve safra kanalları normal görünümündedir. Sinüzoidler ve stromal doku normal histolojik görünümde izlenmiştir. Remark kordonlarını oluşturan hepatositler normal sitoplazma ve nükleus değişiklikleri açısından normal olarak değerlendirilmiştir. Savunma hücreleri olarak bilinen kuffer hücrelerinde sayısal bir artış izlenmemiştir (Şekil 3.24, 3.25, 3.26, 3.27).

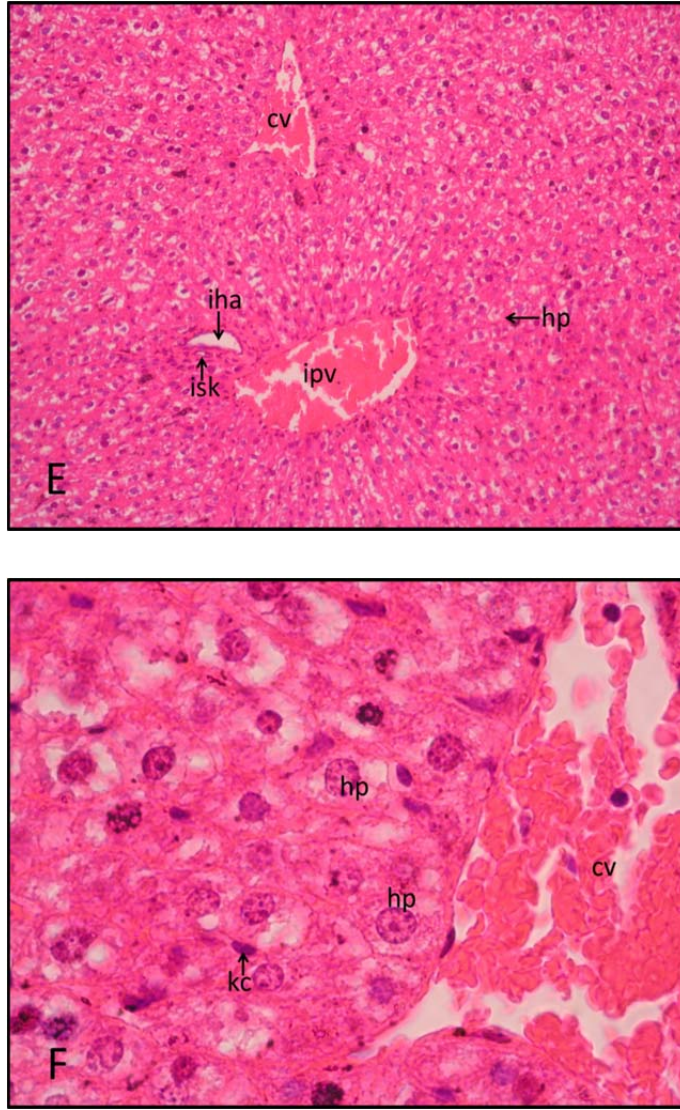


Şekil 3.24 Dişi Kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha), interlobular safra kanalları (isk) ve sinüzoidler (s) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi.

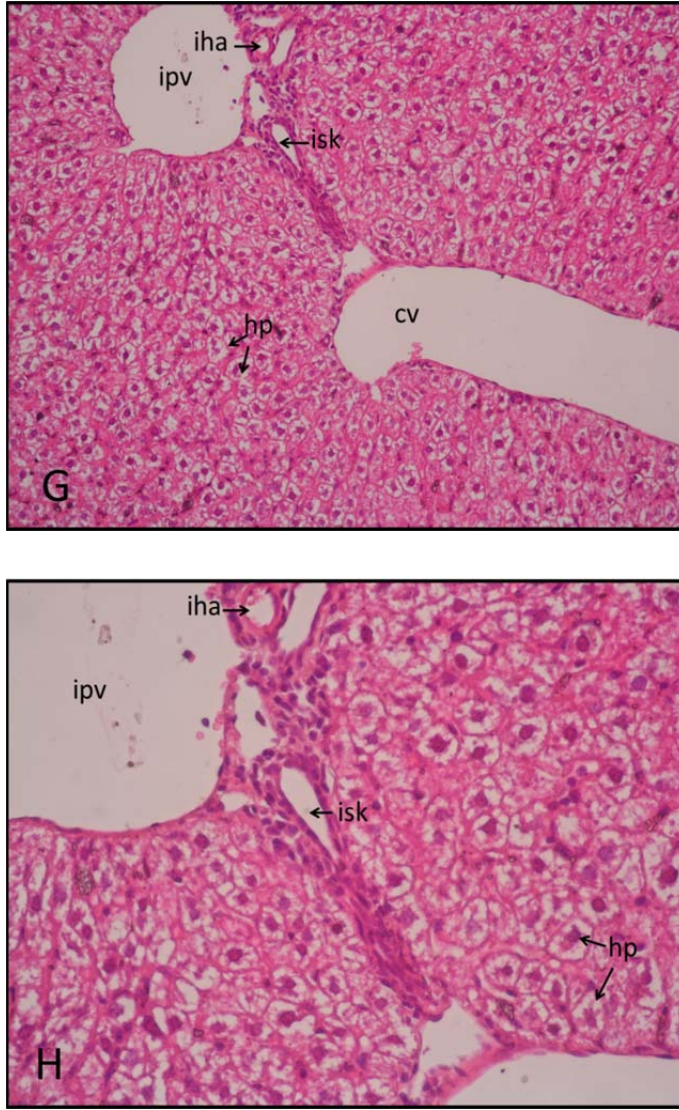
Büyütme Ax20, Bx100.



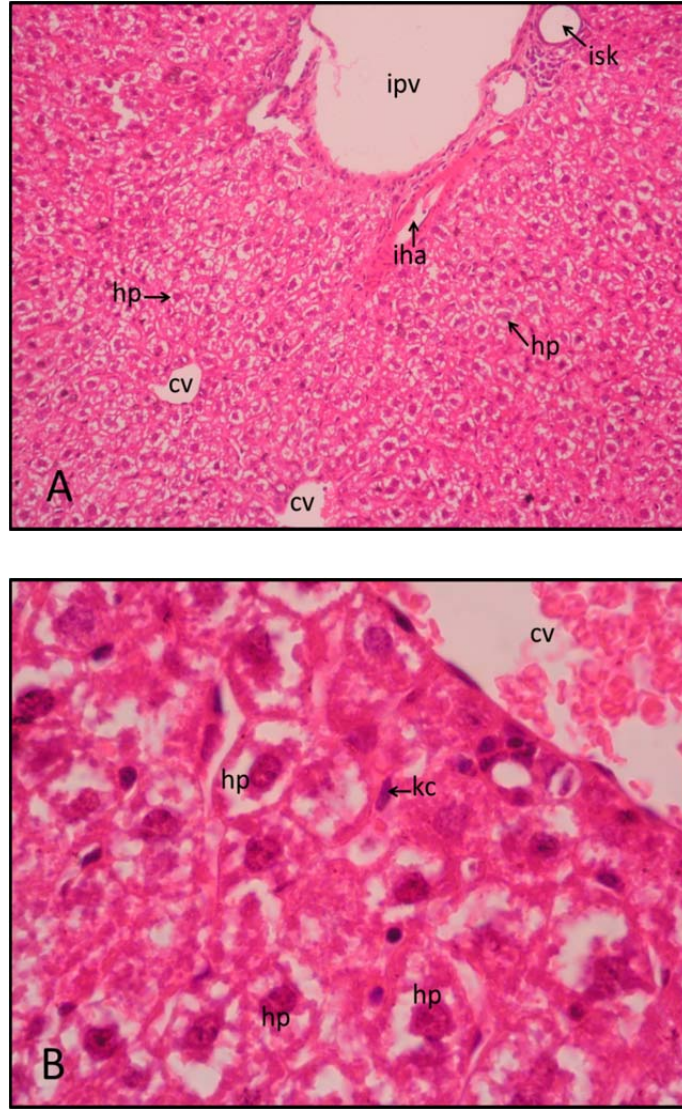
Şekil 3.25 Diş 300 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk), Hepatositler (hp) ve sinüzoidler (s) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Cx20, Dx100.



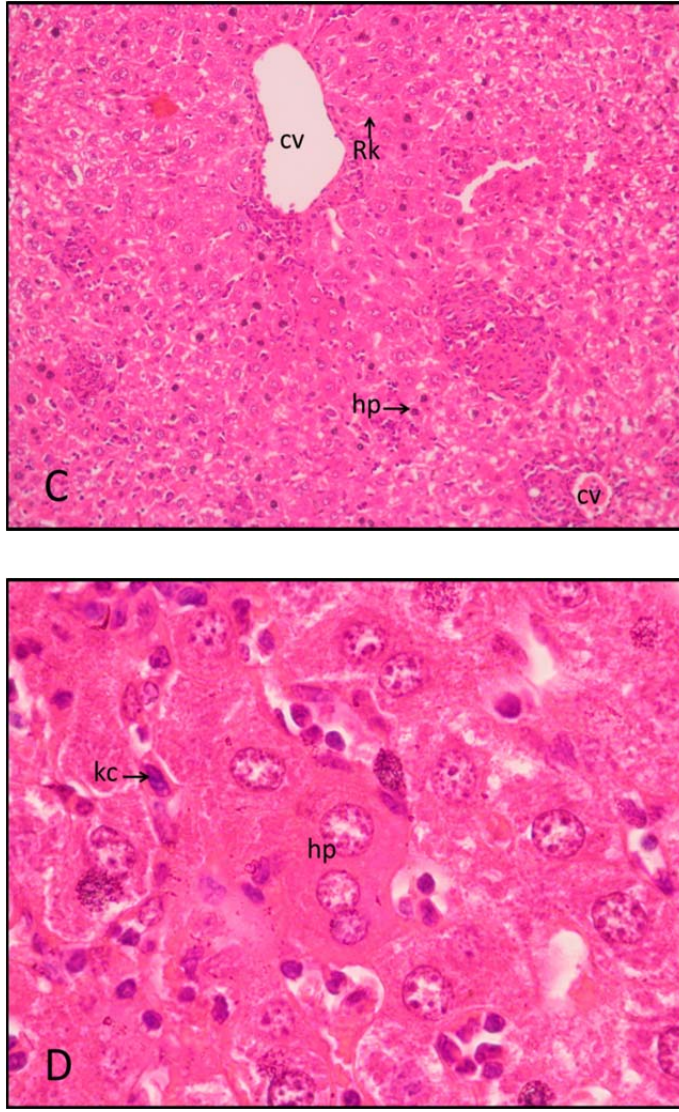
Şekil 3.26 Dişi 600 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha), interlobular safra kanalları (isk) ve sinüzoidler (s) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ex20, Fx100.



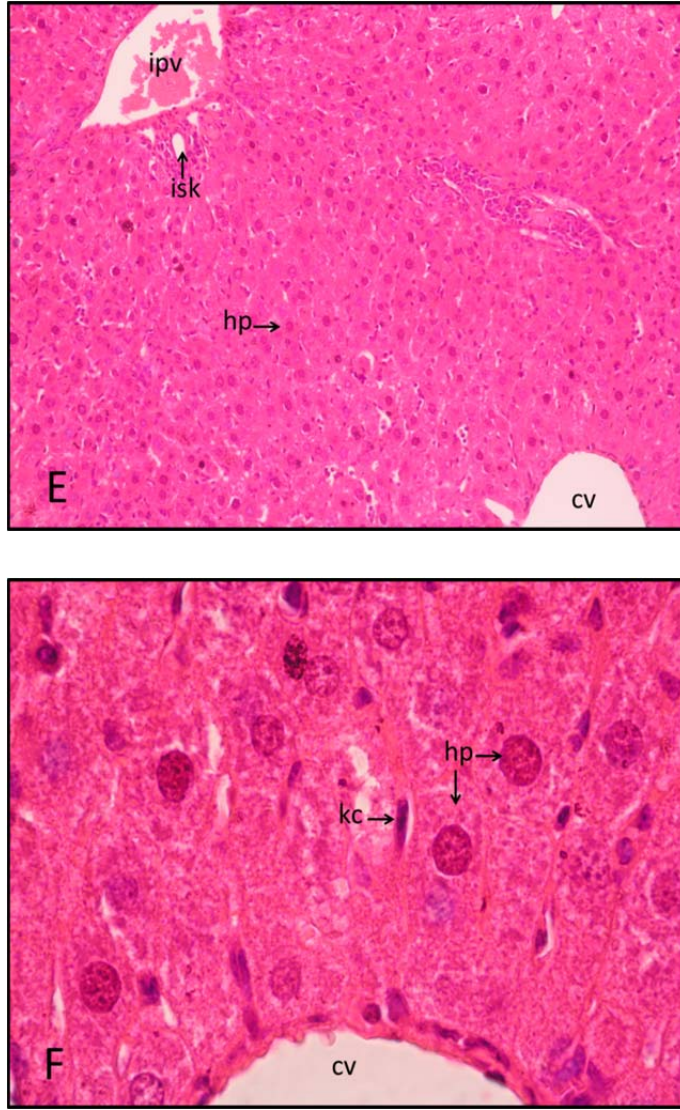
Şekil 3.27 Dişi 900 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. Büyütme Gx20, Hx100.



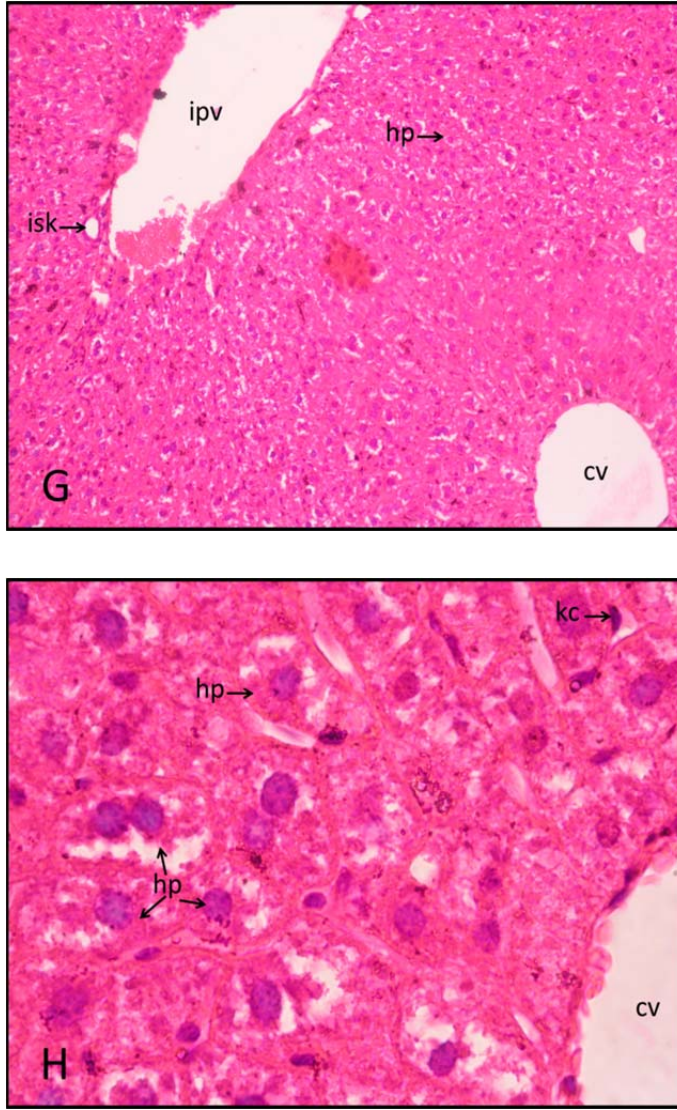
Şekil 3.28 Erkek kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv), interlobular hepatik arter (iha) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ax20, Bx100.



Şekil 3.29 Erkek 300 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Remark kordonları (Rk) ve Hepatositler (hp) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Cx20, Dx100.



Şekil 3.30 Erkek 600 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Ex20, Fx100.



Şekil 3.31 Erkek 900 mg/kg grup karaciğer dokusu histolojik kesiti. Sentral ven (cv), Hepatositler (hp), interlobular portal ven (ipv) ve interlobular safra kanalları (isk) normal görünümündedir. kc: kupffer hücresi. Büyütme Gx20, Hx100.

3.4. Anti-kanser Etkinin Değerlendirilmesi

3.4.1. *In vitro* apoptotik etkinin belirlenmesi

3.4.1.1. Hücre hatlarından Total RNA izolasyon sonuçları

DMSO ve hücre kontrol grupları, gen ekspresyon profillerinin karşılaştırılabilir olması amacıyla KL21 polih herbal formülasyonu test grubu ile birlikte seçilmiş ve her birinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA miktarları Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Waltham, USA) cihazı ile ng/μL cinsinden ölçülmüştür (Çizelge 3.31).

Çizelge 3.31 Hücre Hatlarının Total RNA İzolasyon Sonuçları

Hücre Hatları	Total RNA değerleri (ng/μL)			
	Hücre Hattı Kontrol Grubu	DMSO Kontrol Grubu (%0,05)	KL21 Etanol Ekstresi (10 mg/mL)	KL21 Metanol Ekstresi (10 mg/mL)
MCF-7	660,8	1309,5	1891,2 ng/μL	-
A549	780,2	2436,4	-	-
HeLa	1074,8	1064,4	715,9 ng/μL	-
Caco-2	1588,6	2800,6	-	-
HEK-293	395,1	2241,7	5436,7 ng/μL	2033,2 ng/μL

3.4.1.2. Apoptotik gen ekspresyonunun sonuçları

LightCycler'dan elde edilen Δ CT değerleri ile 'Karşılaştırmalı CT Metodu' kullanılarak her bir hedef gen için kat değişimi (fold change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.32). Hesaplama her bir hücre hattının kontrol grubu ile maruziyet grubu ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Analizde kullanılan aktin-β kontrol (ACTB), β-2-mikroglobulin prokürsör (B2M), gliseraldehit-3-P dehidrogenaz (GAPDH), hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT1), 60S ribozomal protein L13a (RPL13A), 16S ribozomal RNA ve 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) gibi housekeeping genlerle de hedef gen ifadesinin kontrolü sağlanmıştır ve ifadesindeki değişimin hesaplanmasında yine bu internal housekeeping kontrollerin Δ CT değerlerinden yararlanılarak normalizasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.32 Hedef Gen için Belirlenen Kat Değişimi Değerleri

Genler	Hücre Hatları	
	HEK-293	MCF-7
AKT1	-1,009	1,000
APAF1	1,007	1,001
AVEN	1,004	1,000
BAD	1,003	1,004
BAG1	1,003	1,011
BAK1	-1,010	0,957
BAX	1,001	1,002
BBC3	-1,020	-1,049
BCL2	-1,003	1,000
BCL2L1	-1,014	1,020
BCL2L10	-1,026	-1,138
BCL2L11	1,003	1,002
BCL2L13	-1,015	1,020
BCL2L2	-1,008	-1,001
BID	1,002	1,006
BIK	1,001	1,001
BIRC2	-1,001	1,011
BIRC3	1,000	1,004
BIRC5	1,034	1,031
BOK	-1,000	1,000
CAD	1,005	1,006
CASP1	0,000	0,000
CASP10	1,001	1,001
CASP12	0	1,000
CASP14	0	0
CASP2	1,001	1,000
CASP3	1,004	1,000
CASP4	1,000	1,001
CASP5	1,000	0,000
CASP6	1,000	1,002
CASP7	1,004	1,001
CASP8	1,000	1,000
CASP8AP2	-1,007	1,002
CASP9	1,001	1,003
CFLAR	1,001	1,002
CRADD	1,002	1,002
DFFA	-1,015	1,011
DIABLO	-1,003	1,005
endoG	1,003	1,002

Genler	Hücre Hatları	
	HEK-293	MCF-7
FADD	-1,028	-1,115
FAM96A	-1,005	-1,142
FAM96B	1,006	1,009
FAS	-1,001	1,001
FASLG	-1,022	-1,117
HMGB1	1,056	1,024
HRK	-1,008	0,970
HSP90B1	1,248	1,145
HTRA2	1,032	1,068
LRDD	1,000	-1,001
MCL1	-1,021	-1,086
NFKB1	-1,000	1,013
NFKB2	1,001	1,011
NGFR	1,000	1,000
PMAIP1	1,015	1,026
PTEN	-1,012	-1,053
REL	-1,021	-1,064
RELA	-1,001	1,003
RELB	1,000	1,002
SOCS2	-1,038	-1,090
SOCS3	-1,000	1,000
STAT1	-1,003	1,016
STAT5A	1,000	1,000
STAT5B	1,005	1,003
TNF	-1,048	-1,097
TNFRSF10A	0	1,007
TNFRSF10B	-1,005	1,019
TNFRSF10C	1,000	1,000
TNFRSF10D	1,000	1,001
TNFRSF11B	0	1,000
TNFRSF1A	-1,006	1,010
TNFRSF1B	1,000	1,001
TNFRSF21	1,001	1,015
TNFRSF25	-1,000	1,000
TNFSF8	0	0
TNFSF10	0	0
TNFSF11	0	0
TP53	1,042	1,043
TP53I3	1,002	1,002
TRAF1	-1,000	1,001
TRAF2	1,005	1,011

Genler	Hücre Hatları	
	HEK-293	MCF-7
TRAF3	1,005	1,010
TRAF5	-1,001	1,004
TRAF6	1,005	1,002
TRAF7	1,006	1,005

Hedef gene özgü belirlenen kat değişimi değerleri, kullanılan iki hücre hattı (HEK-293, MCF-7) için grafiklerde gösterilmiştir. Değişimin belirlenebilmesinde kolaylık sağlaması amacı ile analizlenen bu 84 insan apoptoz ilişkili gen, üyesi oldukları gen aileleri, ilişkili fonksiyonları ve gen ürünlerinin yapısı baz alınarak gruplandırılmış (Çizelge 3.33) ve her bir hücre hattındaki hedef gen ifadesinin kat değişimi ile ilişkili grafiklerde bu gruplandırmaya bağlı kalınmıştır.

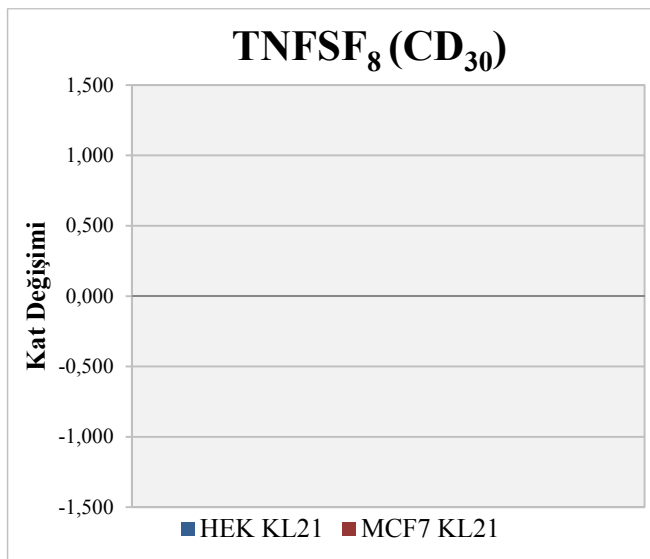
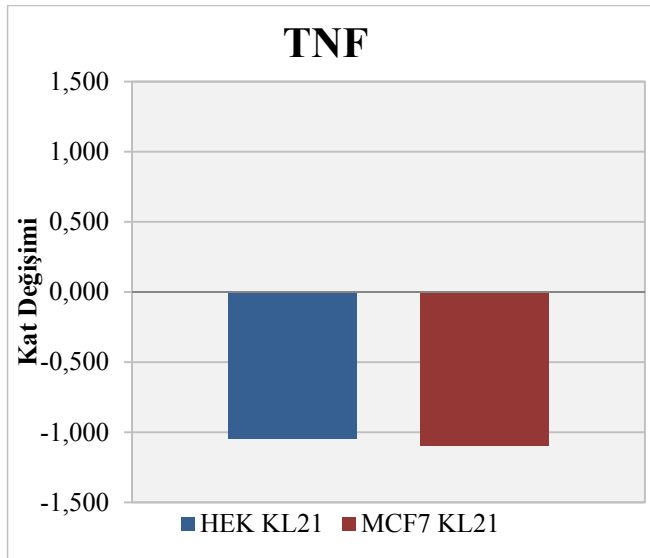
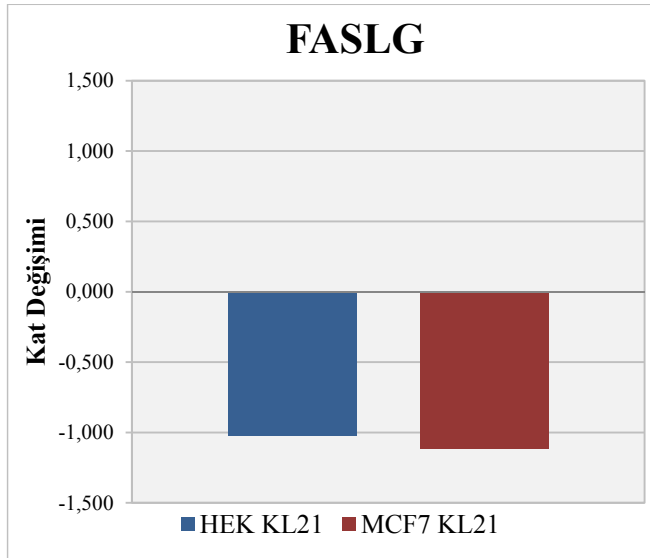
Gruplandırmada üç ana başlık altında yapılırken, her bir ana grup da kendi içinde alt başlıklara ayrılmıştır. Ekstrinsik ve intrinsik yolakta bireysel olarak çalışan gen ürünleri ve her iki yolakta ortak görevleri olan elemanlar literatür taraması ile saptanmış ve grup başlıkları altında toplanmıştır. Çalışılan insan apoptoz ilişkili genler, Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) ve National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanlarında taranarak, her biri uygun graplara yerleştirilmiştir (Çizelge 3.33).

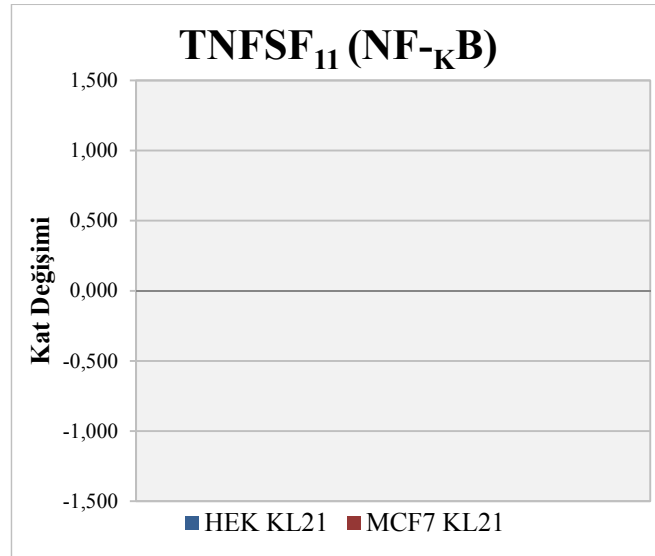
Çizelge 3.33 İnsan Apoptotik Yolak Gen Ailelerinin Sınıflandırılması

Ekstrinsik Apoptotik Yolak		
TNF Domaini		FASLG, TNF
		(TRAIL yolağı) TNFSF ₈ , TNFSF ₁₀ , TNFSF ₁₁
TNFR ve Ölüm Domaini		CRADD, FADD, LRDD, FAS, NGFR, TNFRSF _{10A} , TNFRSF _{10B} , TNFRSF _{10C} , TNFRSF _{10D} , TNFRSF _{11B} , TNFRSF _{1A} , TNFRSF _{1B} , TNFRSF ₂₁ , TNFRSF ₂₅
TRAF Domaini		TRAF ₁ , TRAF ₂ , TRAF ₃ , TRAF ₅ , TRAF ₆ , TRAF ₇
İntrinsik Apoptotik Yolak		
Antiapoptotik		BAG ₁ , BCL ₂ , BCL ₂ L ₁ (BCLxL), BCL ₂ L ₂ (Bcl-W), MCL ₁
Proapoptotik		BAK ₁ , BAX, BOK, BAD, BBC ₃ (PUMA), BID, BIK, Hrk, PMAIP ₁ (NOXA)
Prosurvival	NFKB sinyali	NFKB ₁ , NFKB ₂ , REL, RELA, RELB
	PTEN sinyali	AKT ₁ , PTEN, TP ₅₃ , TP ₅₃ I ₃
	STAT sinyali	STAT ₁ , STAT _{5A} , STAT _{5B} , SOCS ₂ , SOCS ₃
Apoptoz araçları (facilitator)		BCL ₂ L ₁₀ , BCL ₂ L ₁₁ , BCL ₂ L ₁₃
DNA Fragmentasyonu		DFFA, CAD, FAM _{96A} , FAM _{96B} , HMGB ₁
Kazpazlar & Regülatörler		
Başlatıcılar		CASP ₂ , CASP ₈ , CASP ₉ , CASP ₁₀
Efektörler		CASP ₃ , CASP ₆ , CASP ₇ , CASP ₁₄
Inflamatuar		CASP ₁ , CASP ₄ , CASP ₅ , CASP ₁₂
Kazpaz regülatörleri		APAF ₁ , CASP ₈ AP ₂ , DIABLO (SMAC), endoG, HTRA ₂
İnhibitörler		AVEN, BIRC ₂ , BIRC ₃ , BIRC ₅ , CFLAR, HSP _{90B} ₁

3.4.1.2.1. Ekstrinsik Apoptotik Yolak Elemanları

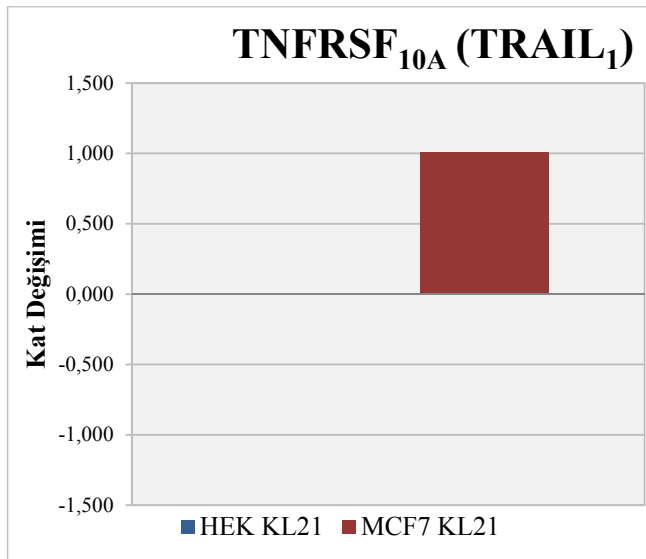
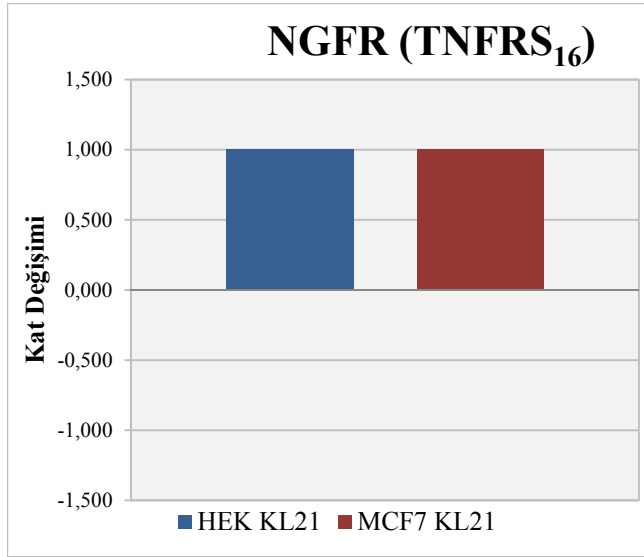
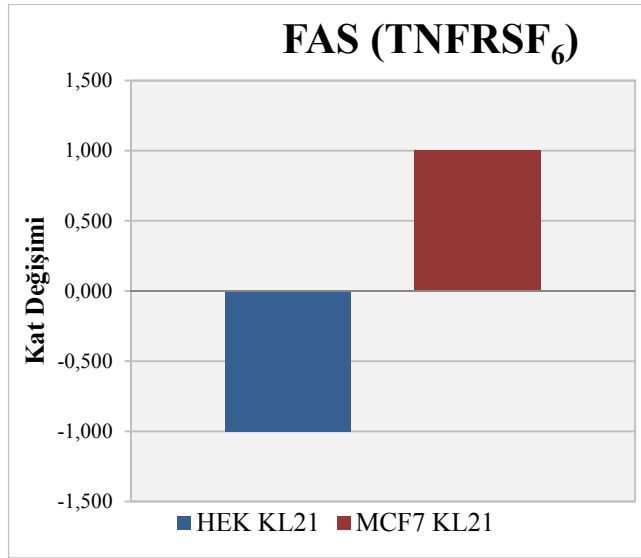
TNF Domaini: Bu grupta yer alan TNF ligand ailesi üyeleri olan TNFSF₈, TNFS₁₀ ve TNFS₁₁ genlerinde hem HEK-293 hem de MCF-7 hücre hatlarında herhangi bir aktivasyon gözlenmezken, FASLG ve TNF (TNF ligand ailesi) genlerinde her iki hücre hattında da 1'er katlık down-regülatif değişiklik tespit edilmiştir. Ayrıca FASLG geninde, MCF-7 hücre hattındaki artış 1 kattan biraz daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.32).

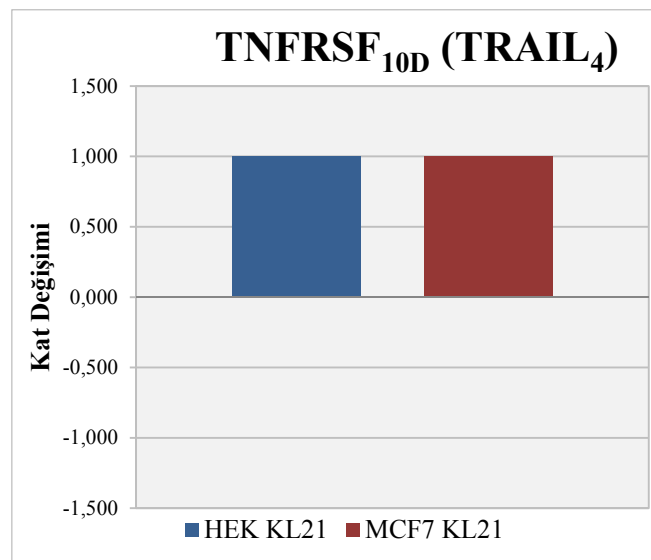
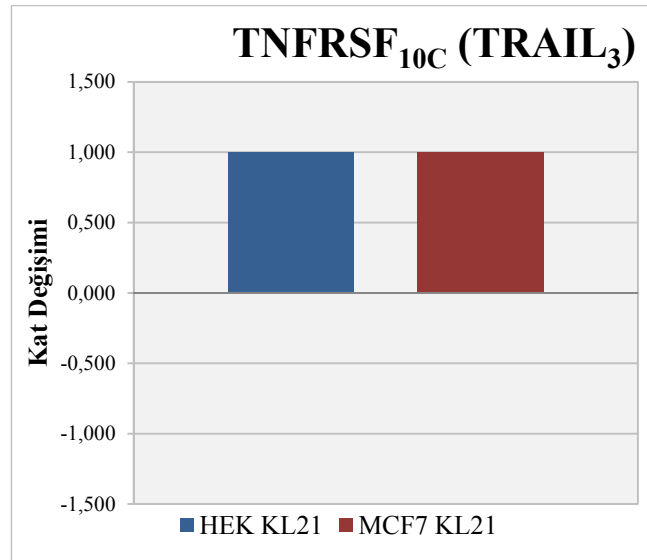
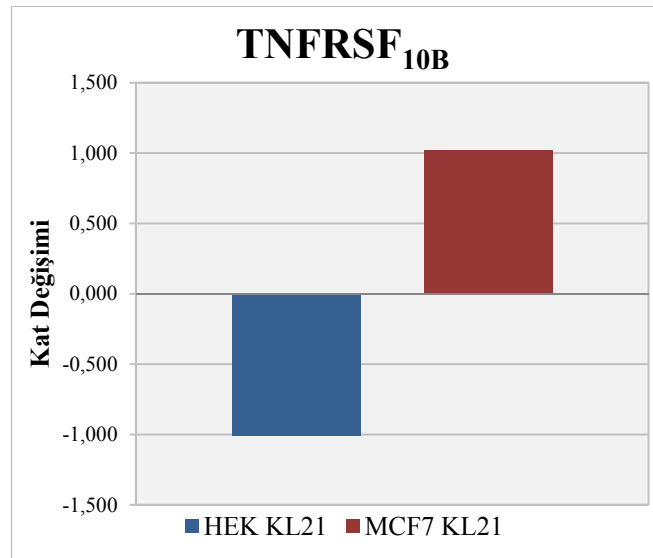


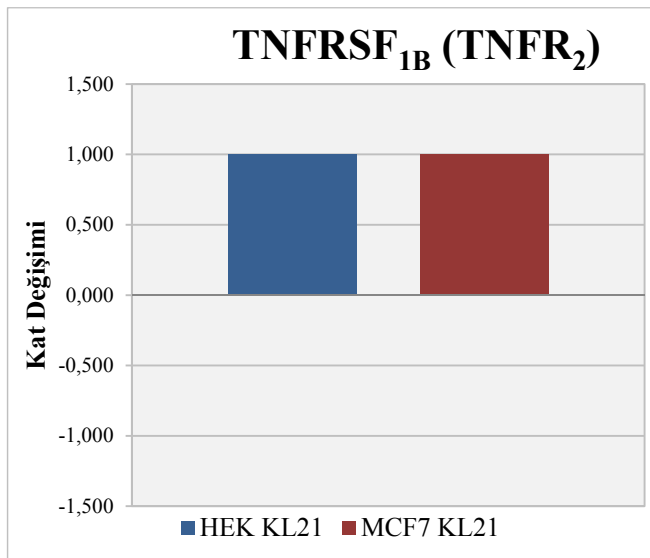
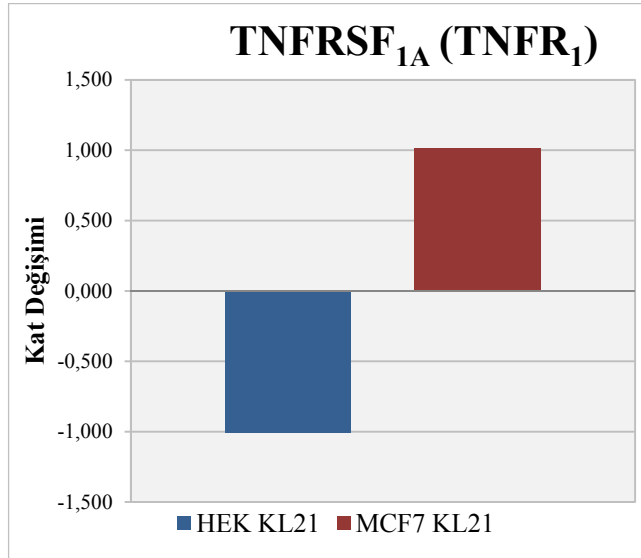
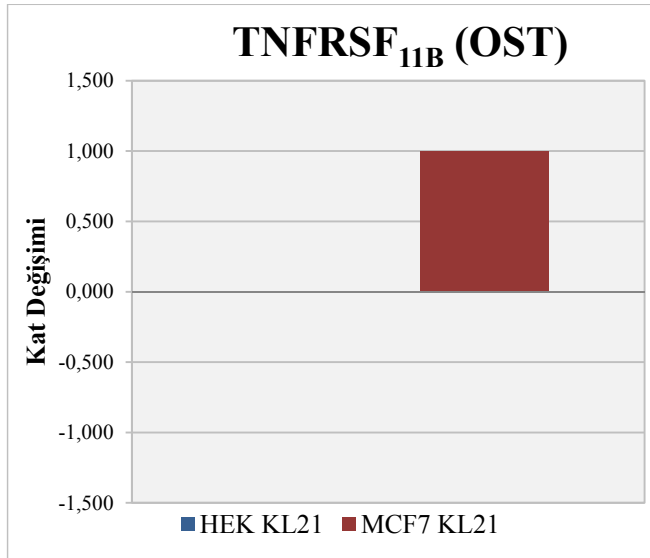


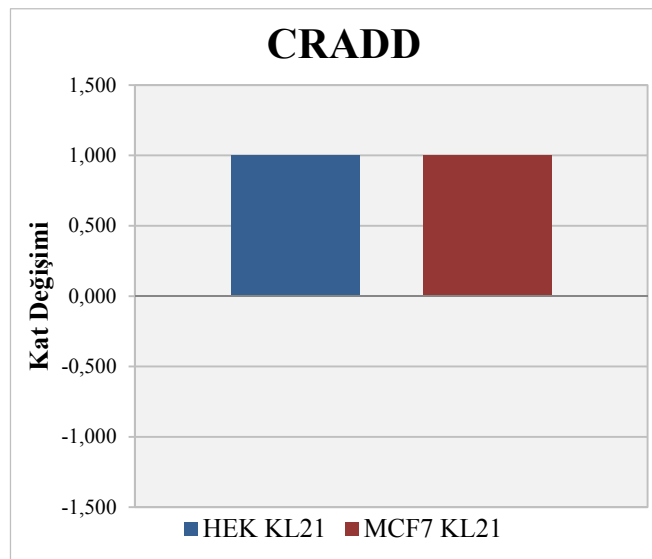
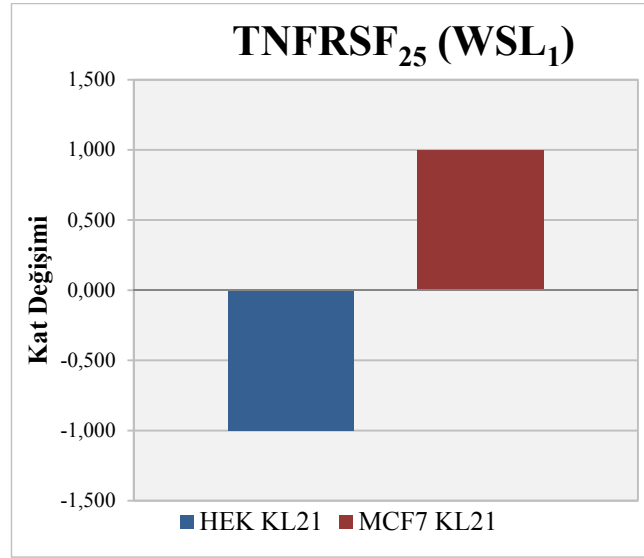
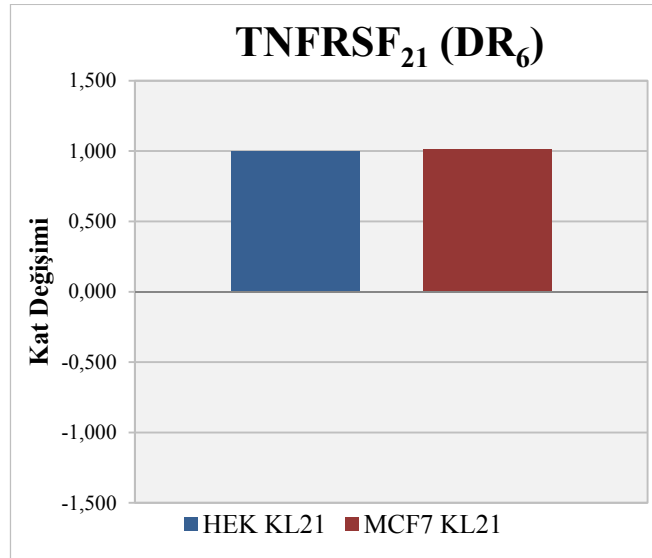
Şekil 3.32 TNF Domaini Gen Ailesi Elemanlarının Kat Değişim Oranları

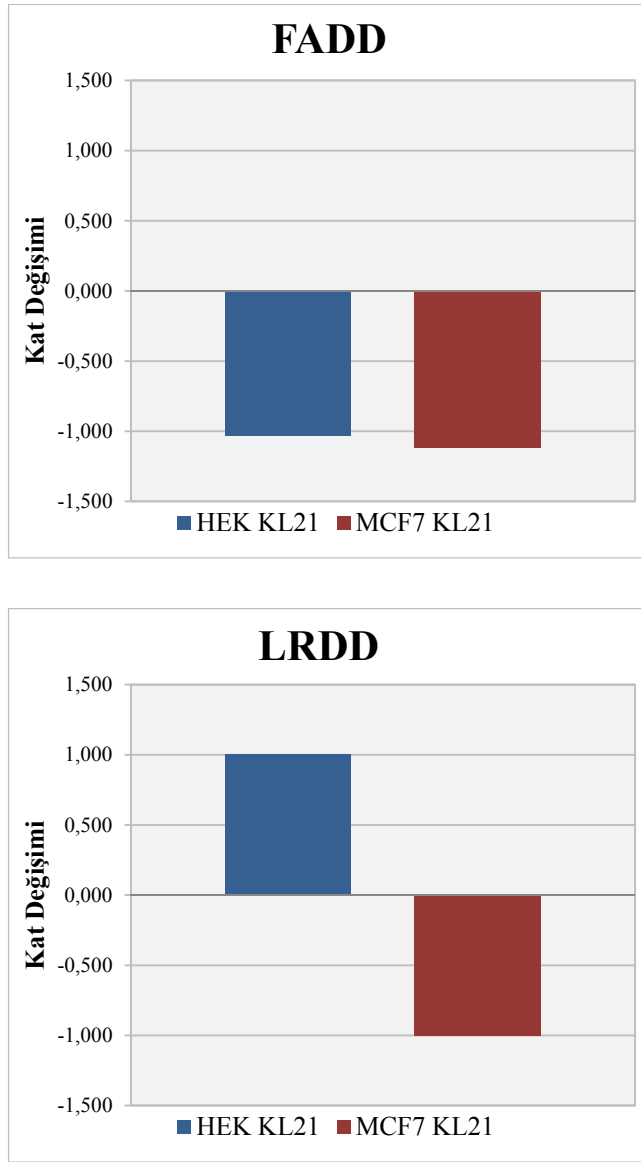
TNFR ve Ölüm Domaini: Bu grupta yer alan ve apoptoz indüksiyonunda görev alan regülatörlerden olan CRADD geninde her iki hücre hattında da 1 katlık up-regülatif, FADD geninde ise 1 katlık down regülatif değişiklik tespit edilmiştir. LRDD geninde ise bu durum HEK-293 hücre hattında 1 kat up-regülatif, MCF-7 hücre hattında ise 1 kat down regülatif olacak şekildedir. TNF ve ölüm domainindeki kat değişimleri HEK-293 ile karşılaştırıldığında, aktivasyon değişiminin yaklaşık olarak 1-kat olduğu belirlenmiştir. FAS, TNFRSF_{10B}, TNFRSF_{1A} ve TNFRSF₂₅ genlerinde HEK-293 hücre hattı down-regülatif değişiklik gösterirken MCF-7 hücre hattı up-regülatif değişiklik göstermiştir. TNFRSF_{10A} ve TNFRSF_{11B} genlerinde HEK-293 hücre hattında herhangi bir aktivasyon tespit edilmezken, MCF-7 hücre hattında 1 kat up-regülatif değişiklik tespit edilmiştir. Her iki hücre hattı da NGFR, TNFRF_{10C}, TNFRF_{10D}, TNFRF_{1B} ve TNFRF₂₁ genlerinde 1'er katlık up regülatif değişiklik tespit edilmiştir (Şekil 3.33)





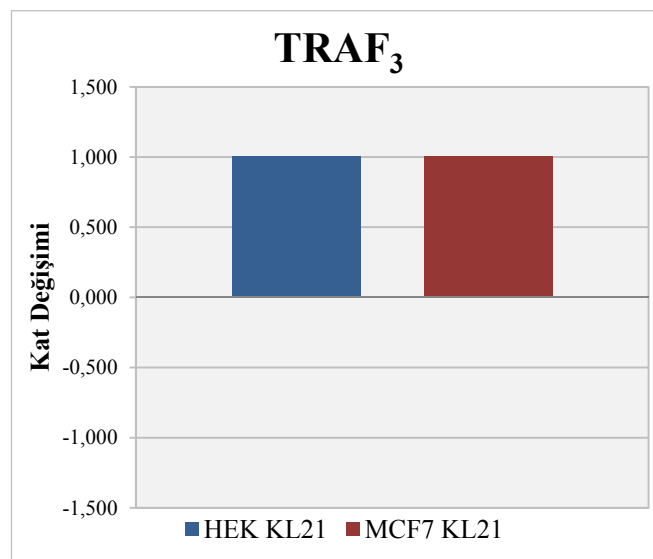
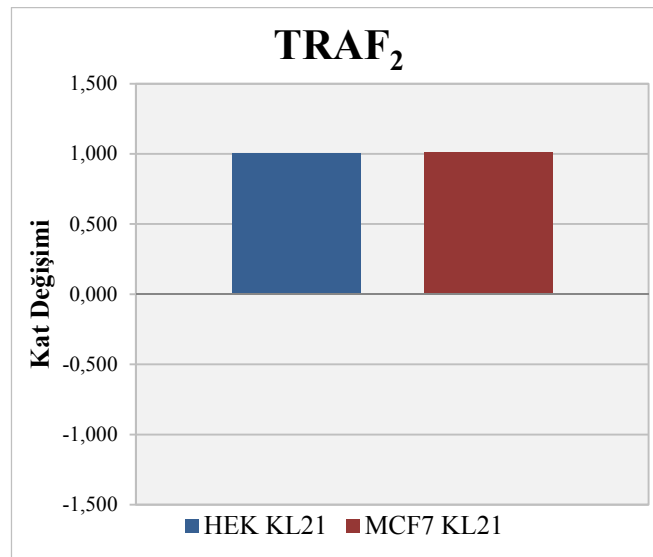
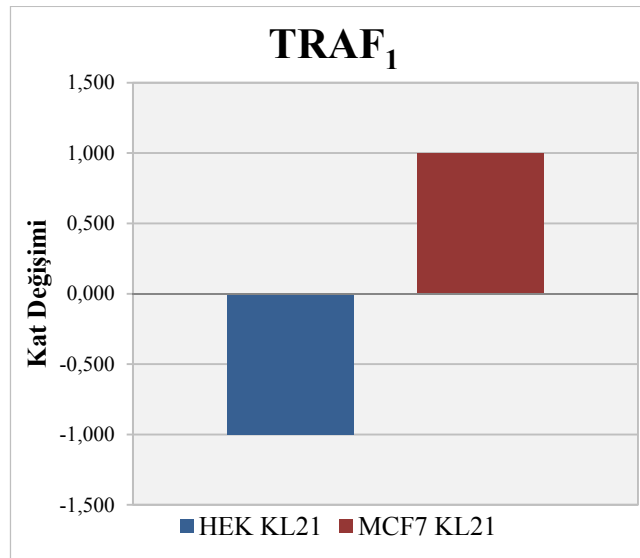


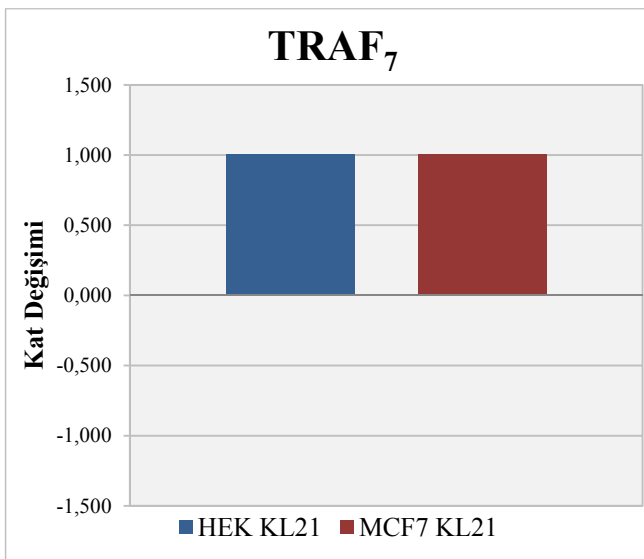
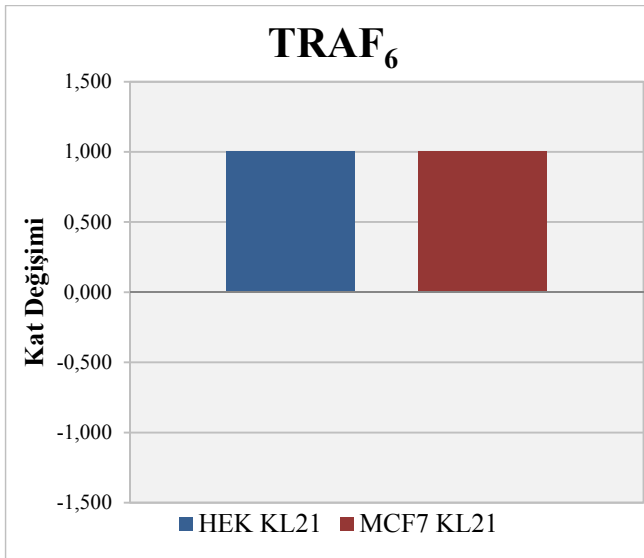
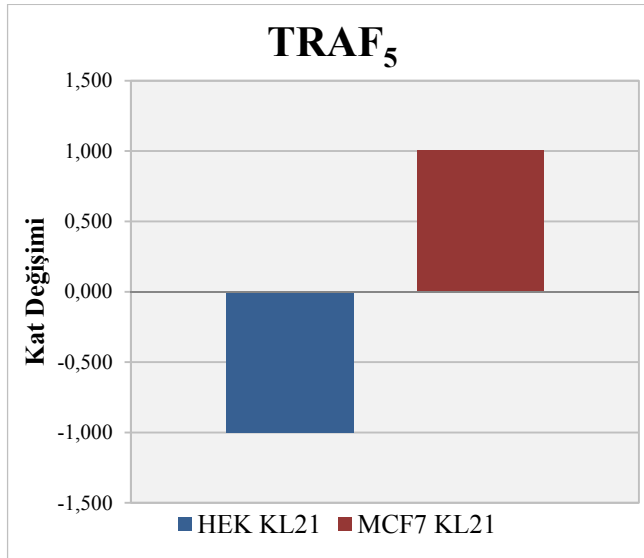




Şekil 3.33 TNF ve Ölüm Domaini Gen Ailesinin Kat Değişim Oranları

Tümör Nekrotik Faktör Reseptör İlişkili Faktör (TRAF) Domaini: Her iki hücre hattı da 6 tip TRAF üyesinde aktivasyon göstermiş olup 1 kat değişim tespit edilmiştir. TRAF₁ ve TRAF₅ ligandlarında HEK-293 hücre hattında 1-katlık down-regülatif değişim göstermiş olup TRAF₂, TRAF₃, TRAF₆, TRAF₇'de ise 1-katlık up-regülatif değişim sergilemiştir. MCF-7 hücre hattında ise TRAF üyelerinin tamamında 1-katlık up-regülatif aktivasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.34).



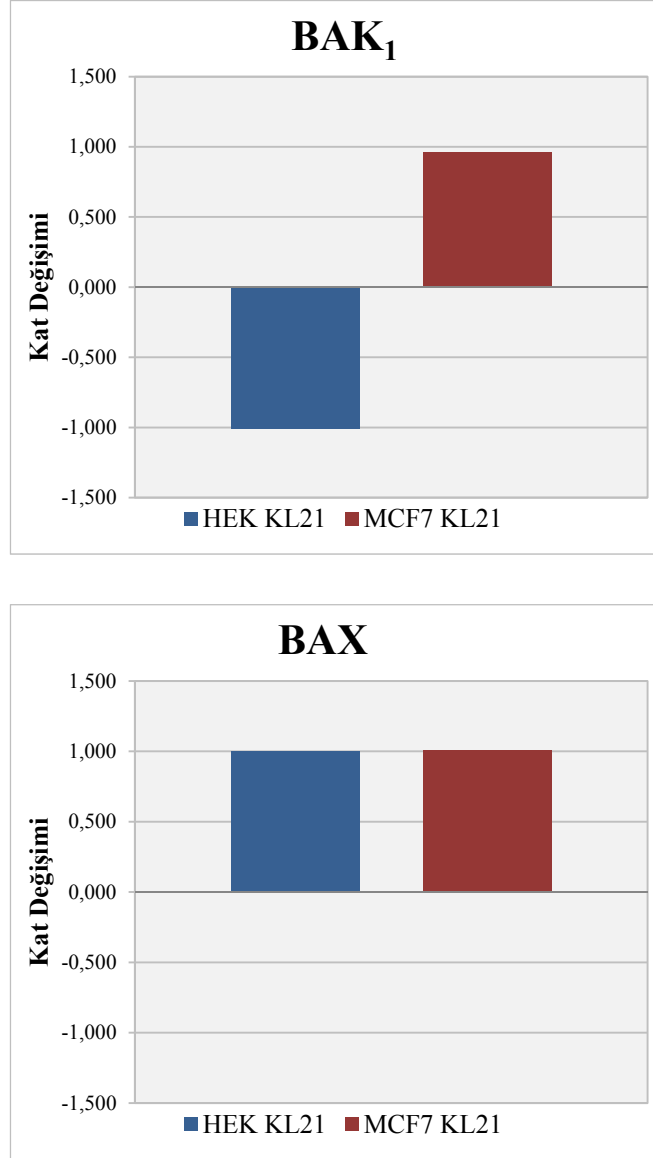


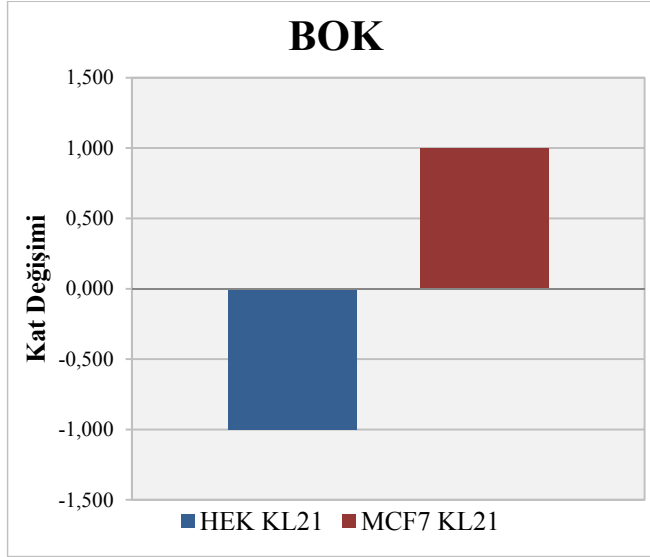
Şekil 3.34 TRAF Gen Ailesi Elemanlarının Kat Değişim Oranları

3.4.1.2.2. İntrinsik apoptotik yolak elemanları

BCL₂ aile üyeleri:

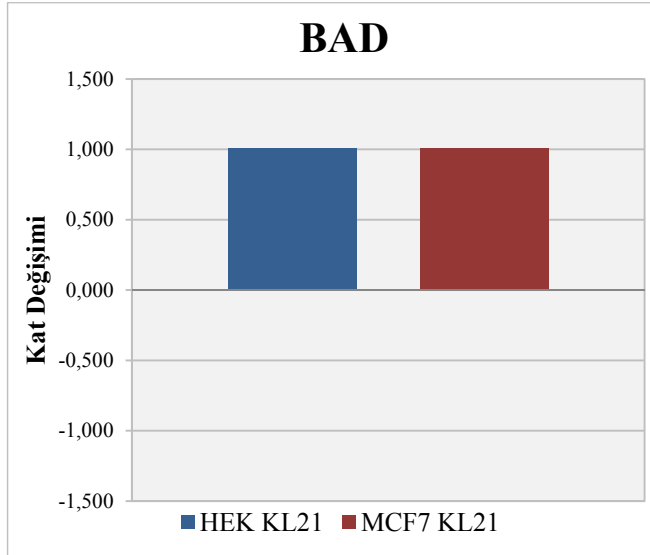
Pro-apoptotik Bcl-2 Ailesi Multi-BH(123) Domaini içerenler: BAK₁ ve BOK genleri HEK-293 hücre hattında 1 katlık down-regülatif, MCF-7 hücre hattı ise yaklaşık 1 katlık up-regülatif değişim göstermiş olup her iki hücre hattı da BAX geninde 1 katlık up-regülatif aktivasyon göstermişlerdir (Şekil 3.35).

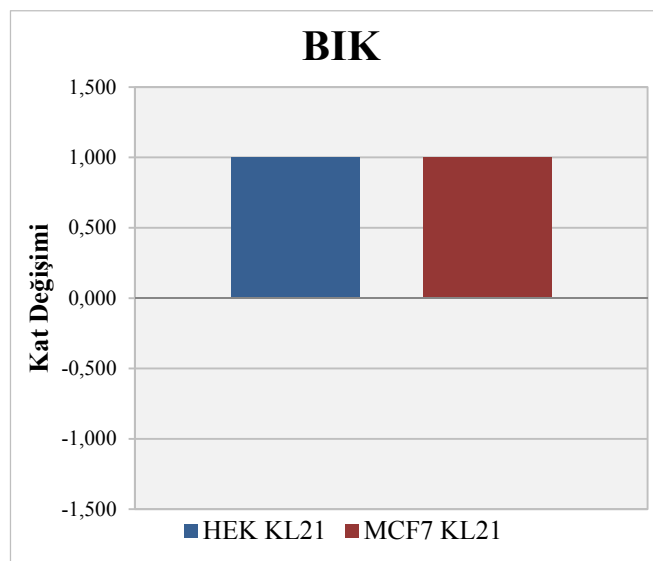
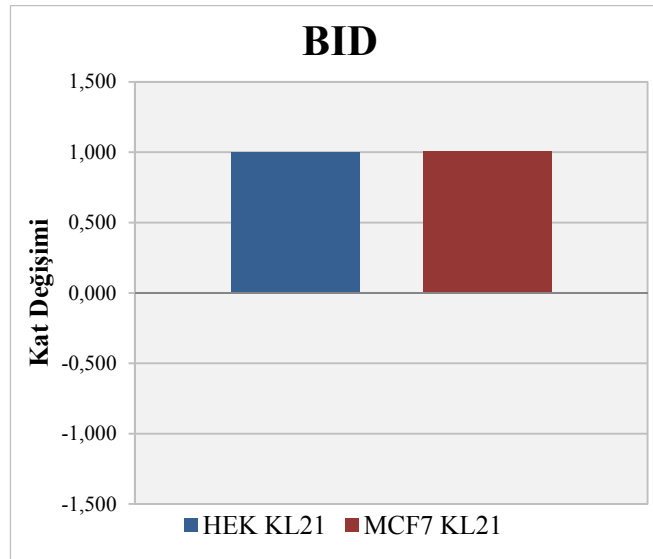
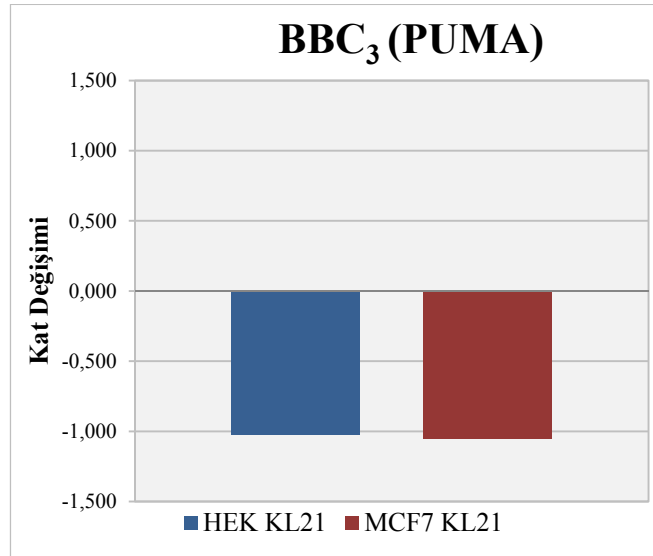


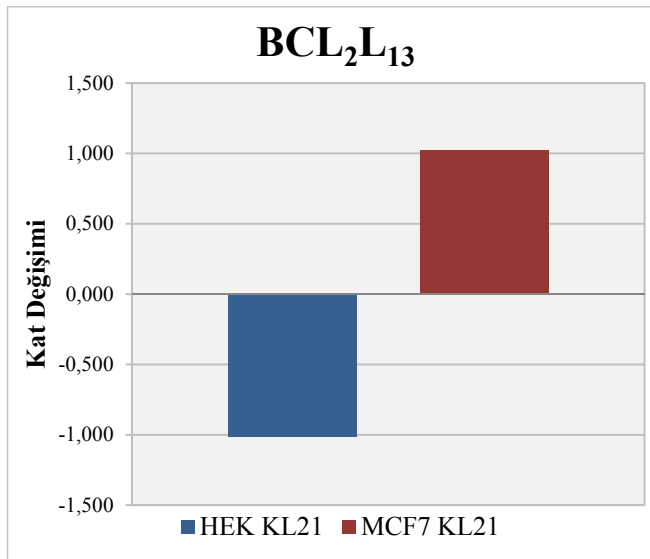
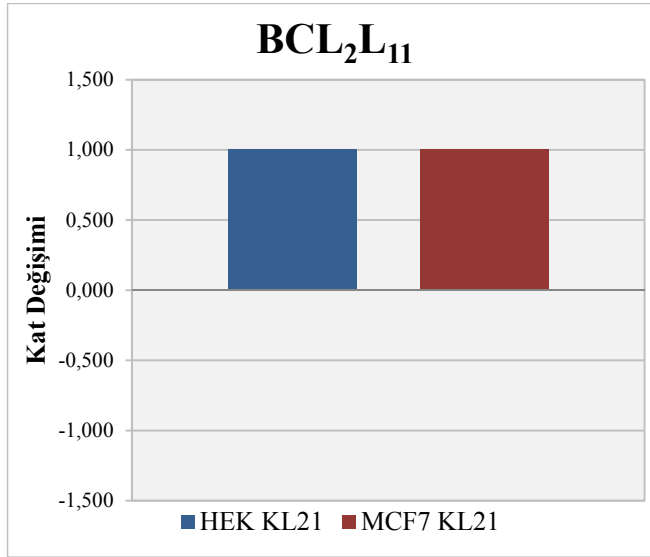
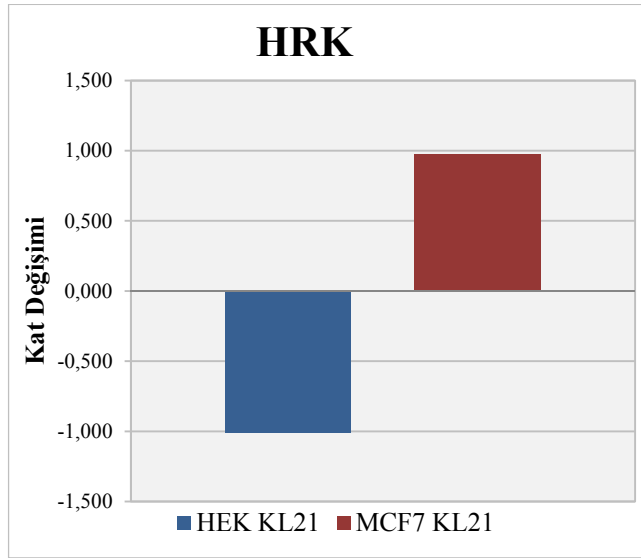


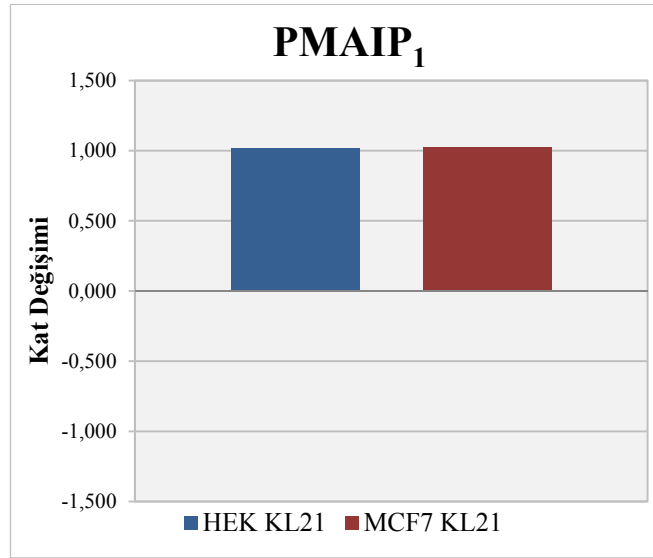
Şekil 3.35 BCL₂ Aile Üyelerinin Pro-Apoptotik, Multi-BH (BH123) Domaini İçeren Elemanlarını Kodlayan Genlerinin Kat Değişim Oranları

Pro-apoptotik Bcl-2 Ailesi BH3 Domaini içerenler: BAD, BCL₂L₁₁ (Apoptosis facilitator), PMAIP₁ (proapoptotik regülatör), BID ve BIK genlerinde, HEK-293 ve MCF-7 hücre hatlarında 1 katlık up-regülatif, BBC₃ geninde ise 1 katlık down-regülatif değişim tespit edilmiştir. Bununla birlikte HRK ve kazpaz aktivatörü olan BCL₂L₁₃ genlerinde HEK-293 hücre hattında 1 katlık down-regülatif, MCF-7 hücre hattında ise 1-katlık up-regülatif aktivasyon saptanmıştır (Şekil 3.36).



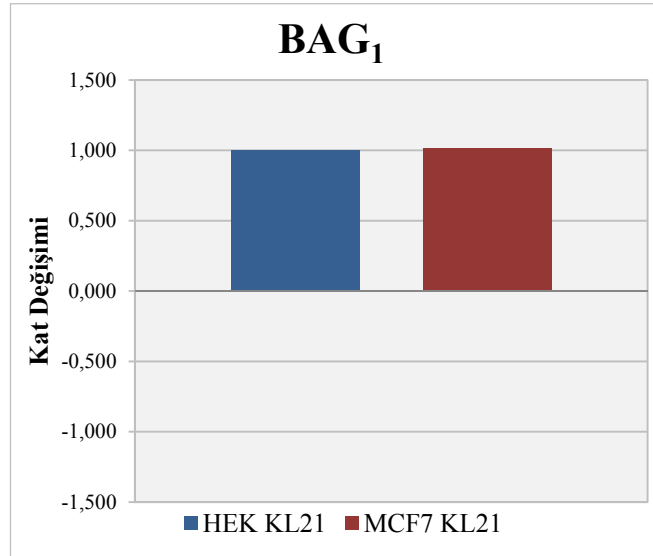


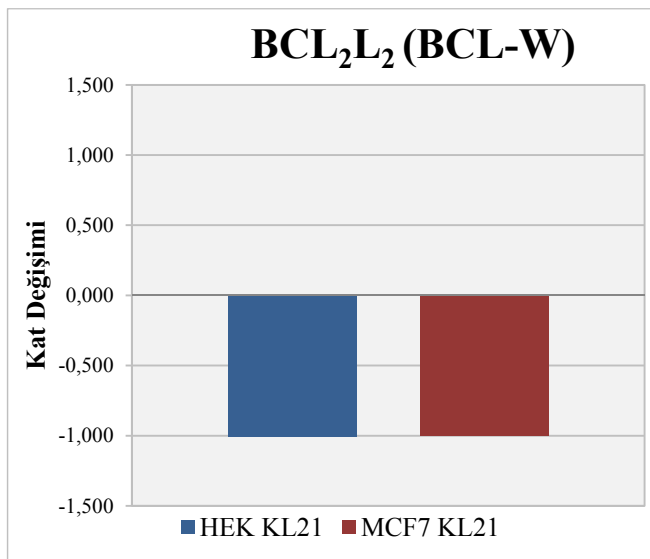
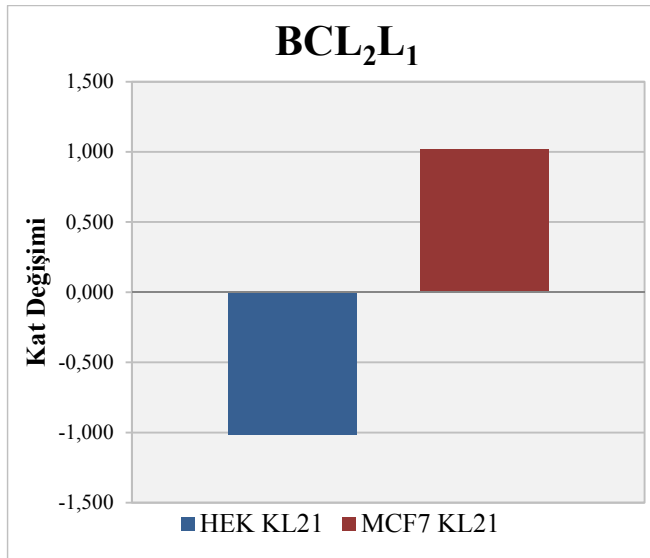
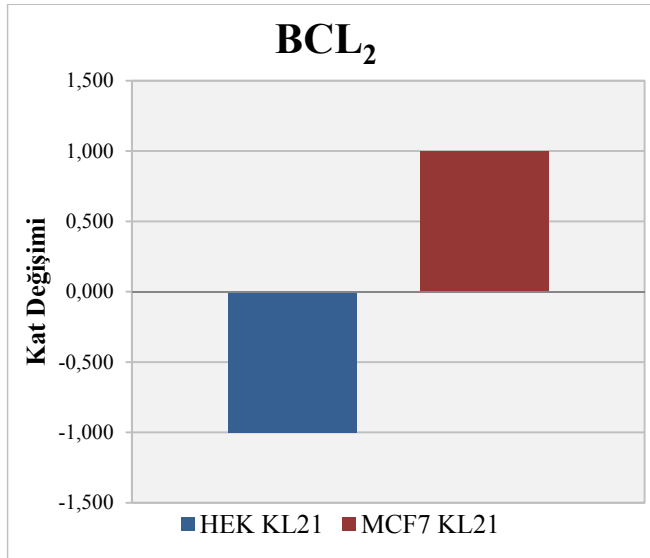


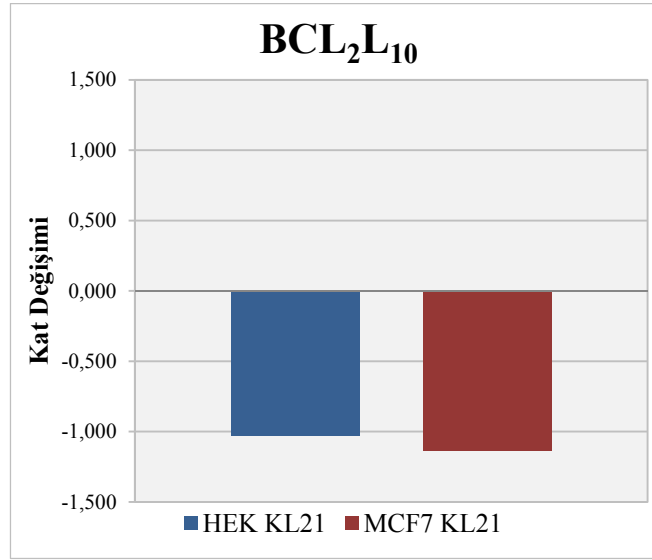
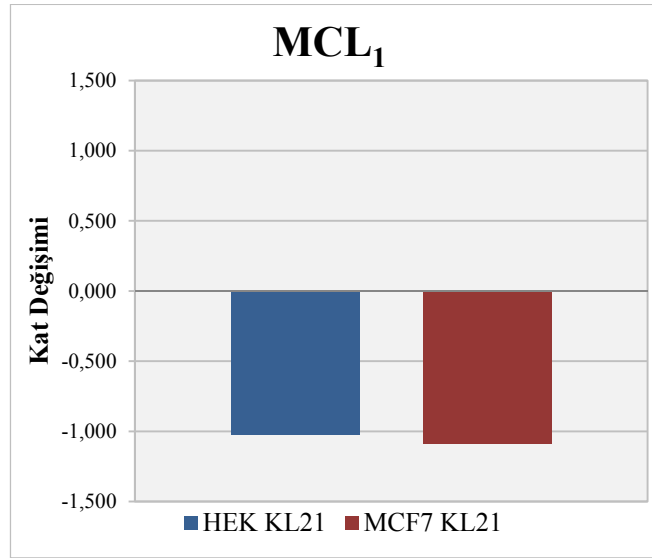


Şekil 3.36 BCL₂ Aile Üyelerinin Pro-Apoptotik, BH (BH3) Domaini İçeren Elemanlarını Kodlayan Genlerinin Kat Değişim Oranları

Anti-apoptotik Bcl-2 Ailesi: BCL₂ ve BCL₂L₁ genlerinde HEK-293 hücre hattı 1 katlık down-regülatif, MCF-7 hücre hattında ise 1 katlık up regülatif değişiklik göstermiştir. BCL₂L₂, BCL₂L₁₀ (Apoptosis facilitator) ve MCL₁ genlerinde ise her iki hücre hattı da down-regülatif değişiklik gösterirmiş olmakla birlikte MCL₁ ve BCL₂L₁₀ genlerinde MCF-7 hücre hattında gözlenen değişim kontrol ile kıyaslandığında 1 kattan biraz daha fazladır. İki hücre hattı da BAG geninde 1 katlık up-regülatif değişikliğe sebep olmuştur (Şekil 3.37).

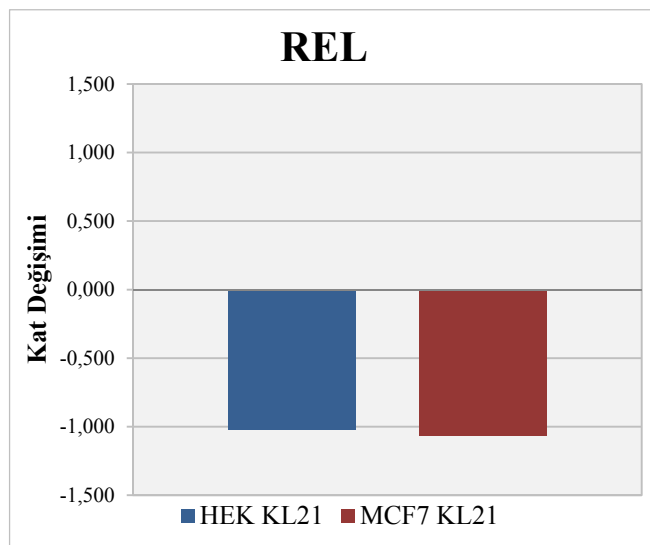
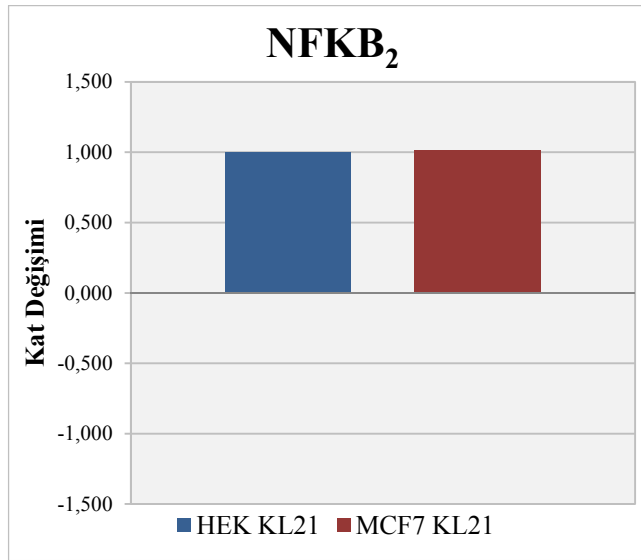
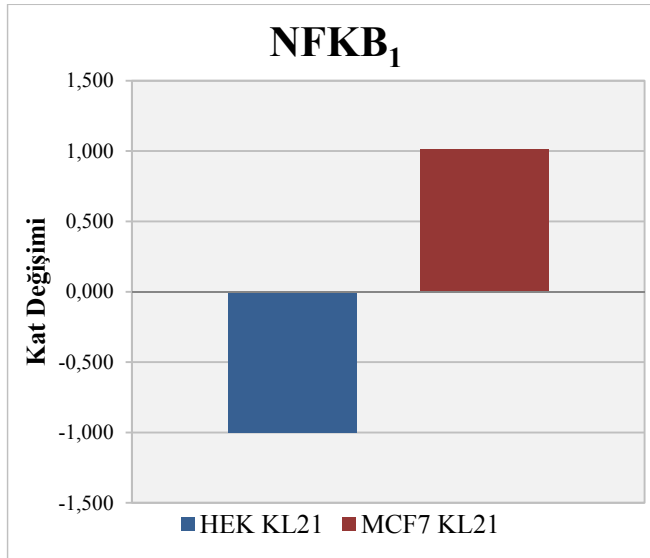


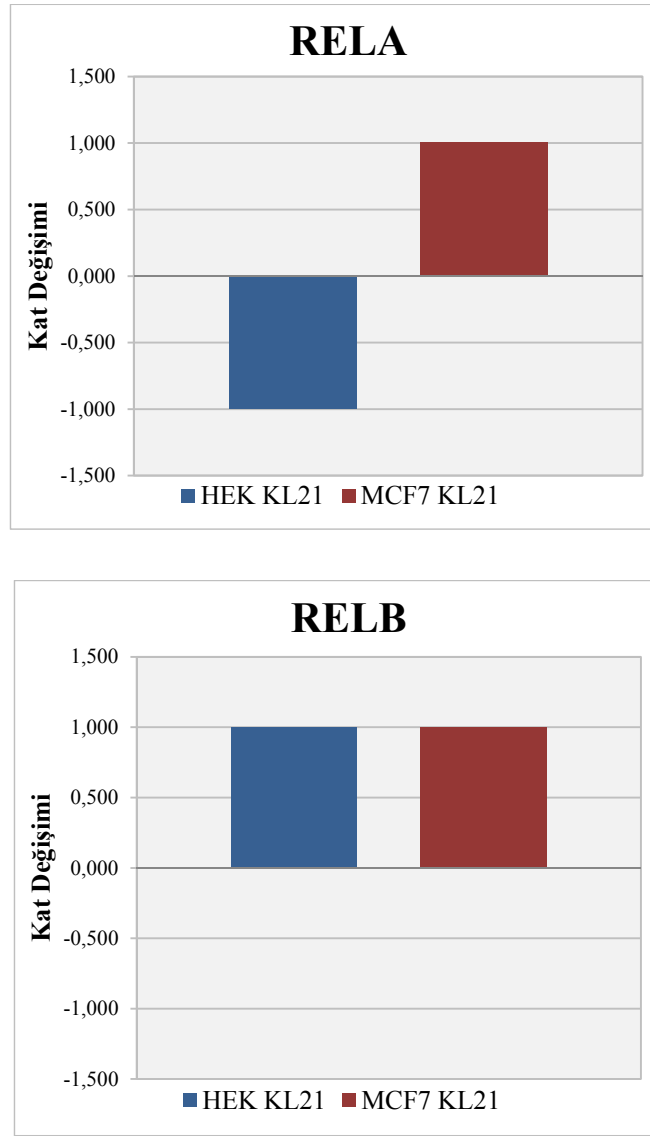




Şekil 3.37 BCL₂ Ailesinin Anti-Apoptotik Genlerinin Kat Değişim Oranları

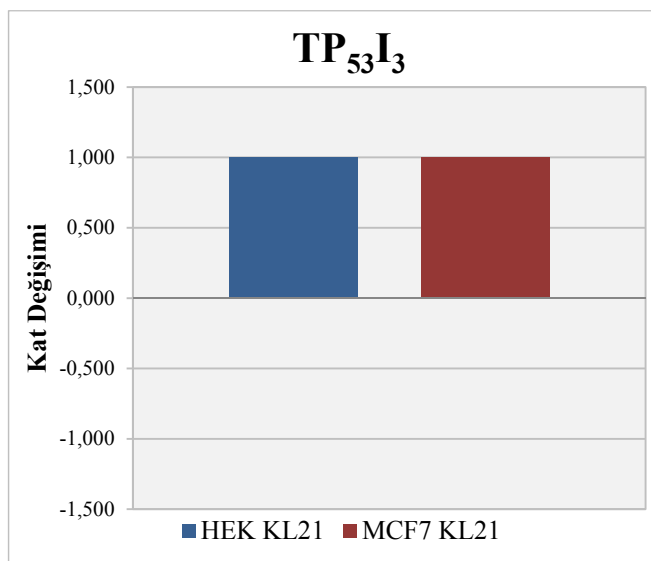
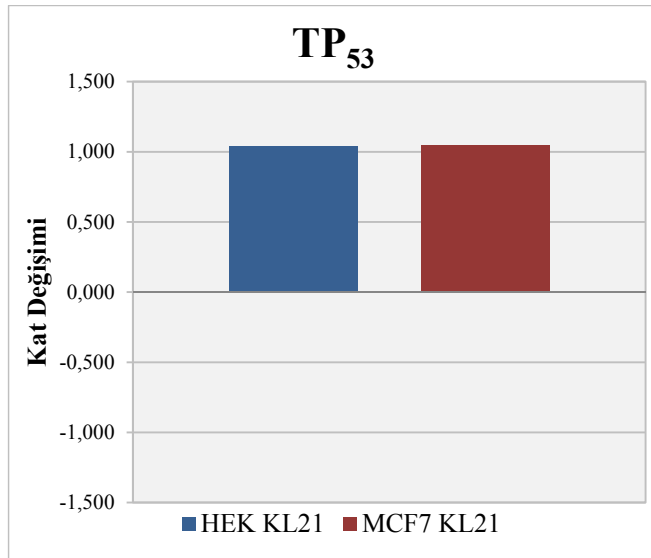
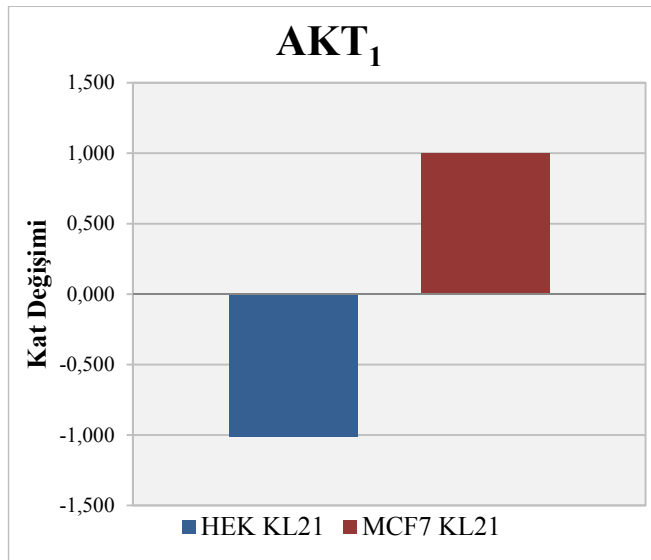
Pro-survival NF- κ B Sinyal Yolağı: Anti-apoptotik regülatörlerden olan NF κ B₁ ve RELA genleri HEK-293 hücre hattında 1 katlık down-regülatif aktivasyon gösterirken MCF-7 hücre hattında ise 1 katlık up-regülatif değişiklik göstermiştir. NF κ B₂ ve RELB genlerinde ise her iki hücre hattında 1 katlık up-regülatif, REL geninde ise down regülatif aktivasyon tespit edilmiştir. Ayrıca MCF-7 hücre hattında, kontrole göre kıyaslandığında REL geninde ki down-regülatif aktivasyon 1 kattan biraz daha fazla olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.38).

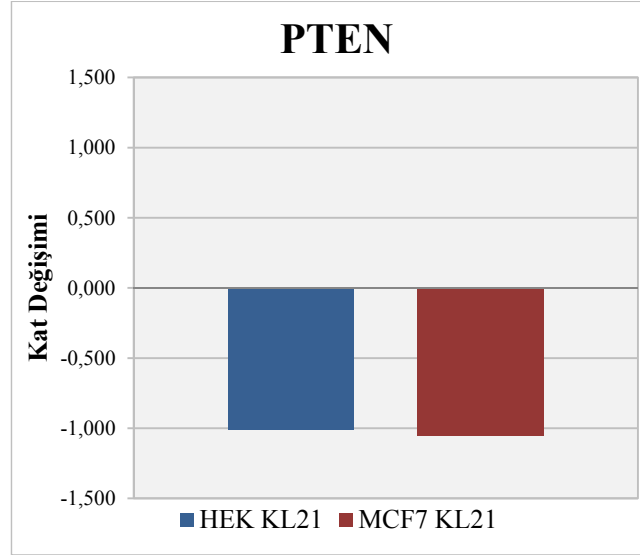




Şekil 3.38 NF-KB Sinyal Yolağı Genlerinin Kat Değişim Oranları

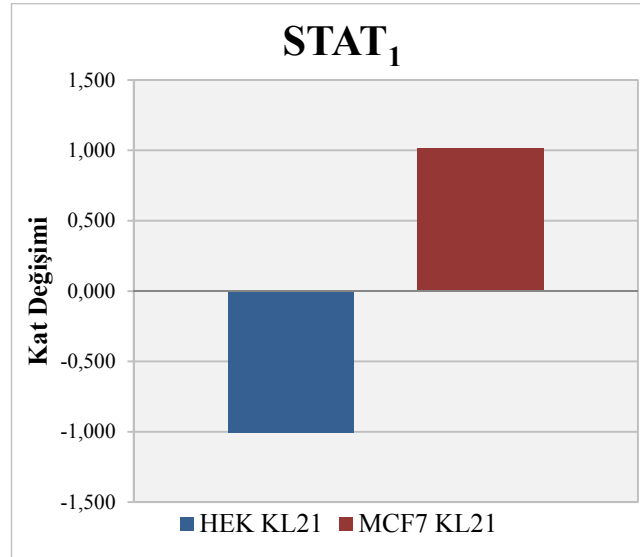
Pro-survival PTEN Sinyal Yolağı: Pro-apoptotik regülatörlerden olan TP₅₃ ve TP₅₃I₃ genleri her iki hücre hattında da 1 katlık up-regülatif değişiklik göstermiş olup anti apoptotik regülatör olan PTEN geninde ise 1 katlık down-regülatif aktivasyon göstermiştir. Bu gendeki aktivasyon MCF-7 hücre hattında 1 kattan biraz daha fazla olarak belirlenmiştir. Anti apoptotik regülatif AKT₁ geni HEK-293 hücre hattında 1 katlık down-regülatif, MCF-7 hücre hattında ise up-regülatif değişiklik göstermiştir (Şekil 3.39).

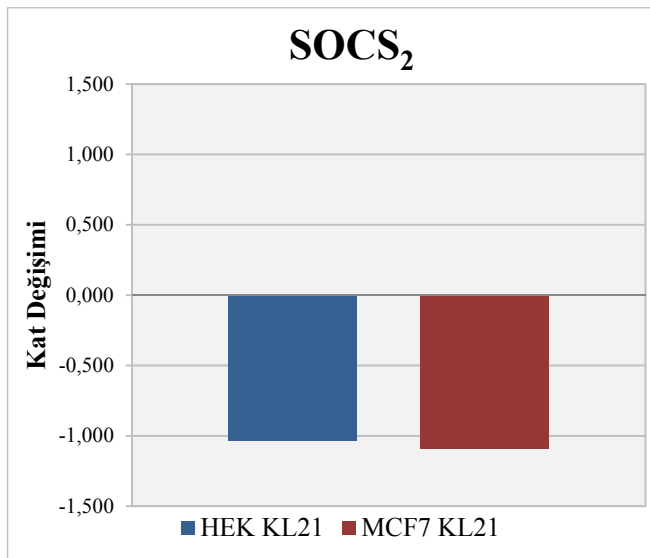
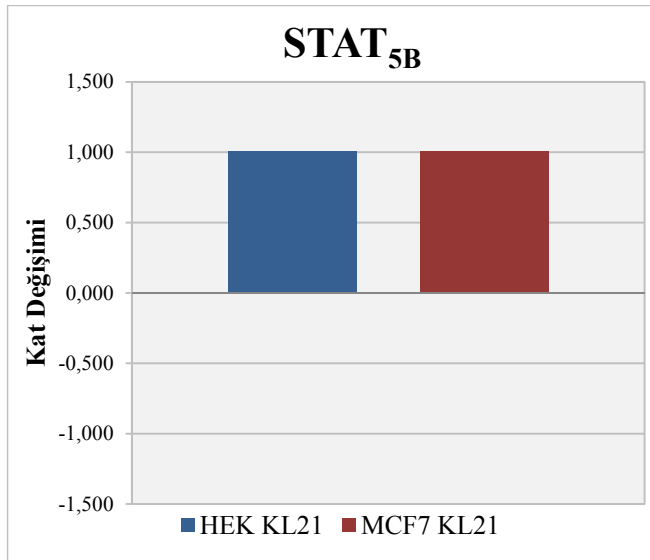
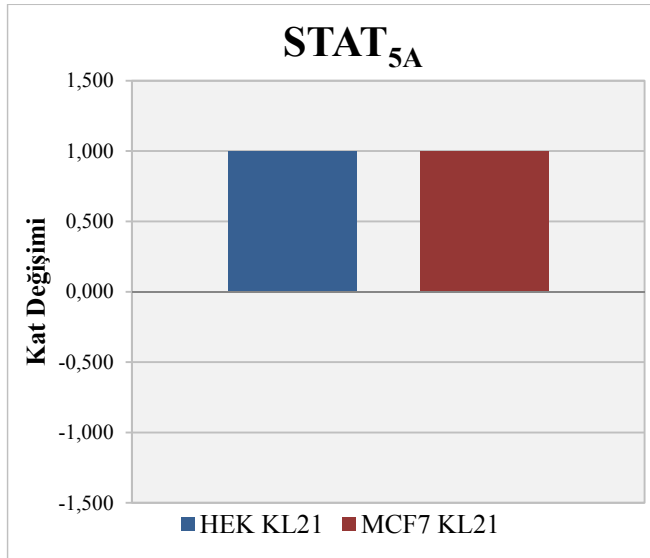


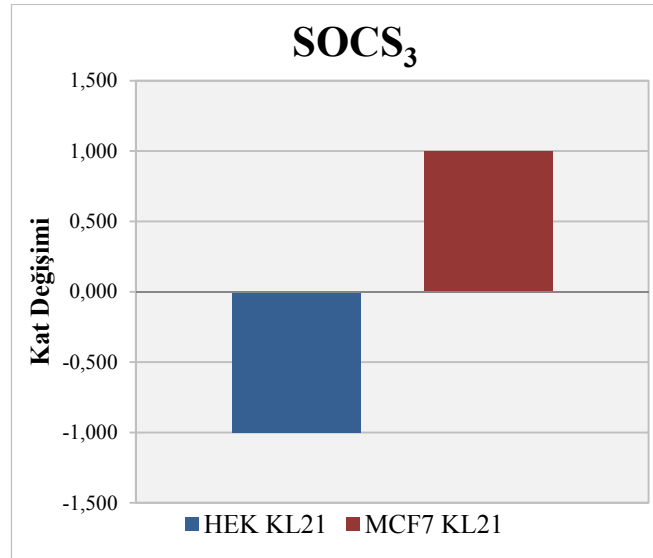


Şekil 3.39 Pro-survival PTEN Sinyal Yolağı Genlerinin Kat Değişim Oranları

Pro-survival STAT Sinyal Yolağı: Anti apoptotik regülatör genlerinden olan STAT_{5A} ve STAT_{5B} her iki hücre hattında da 1 katlık up-regülatif, SOCS₃ ve pro apoptotik STAT₁ genlerinde ise HEK-293 hücre hattı down-regülatif, MCF-7 hücre hattı ise up-regülatif değişiklik göstermiştir. SOCS₂, anti apoptotik regülatif gruba ait olan bu gende her iki hücre hattı da yaklaşık 1 katlık down-regülatif değişiklik göstermiştir (Şekil 3.40).

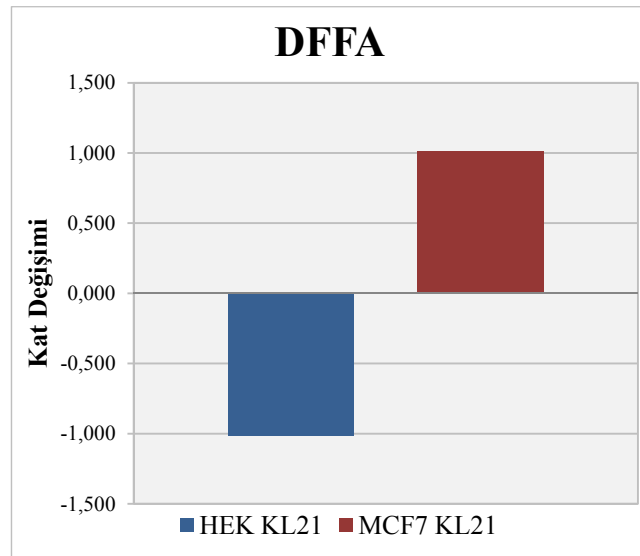


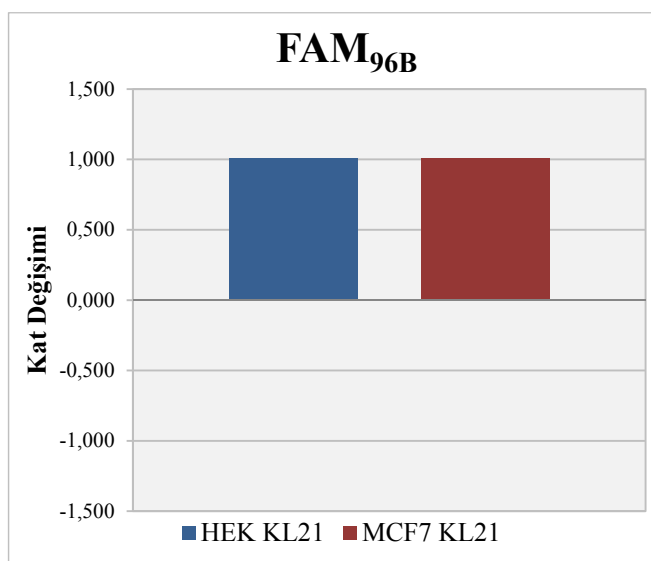
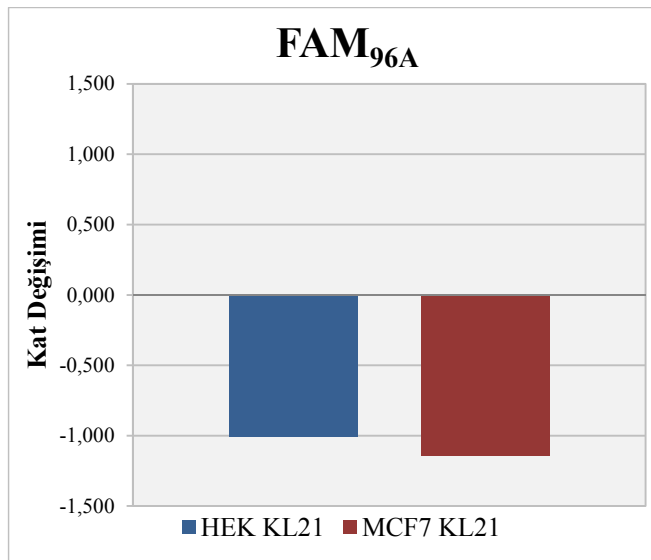
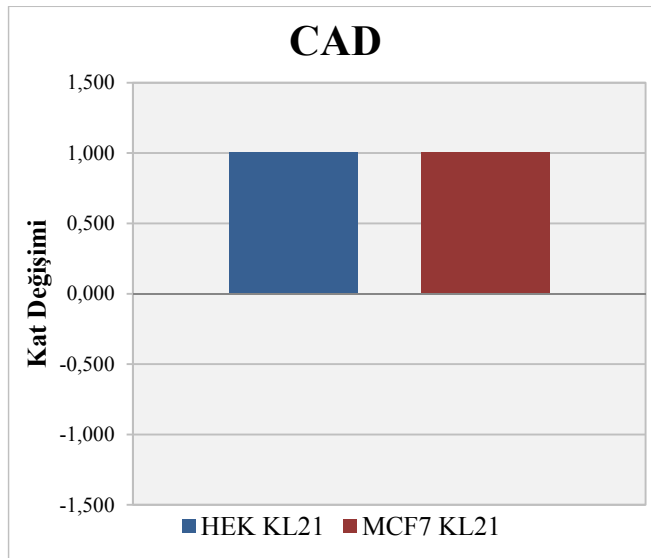


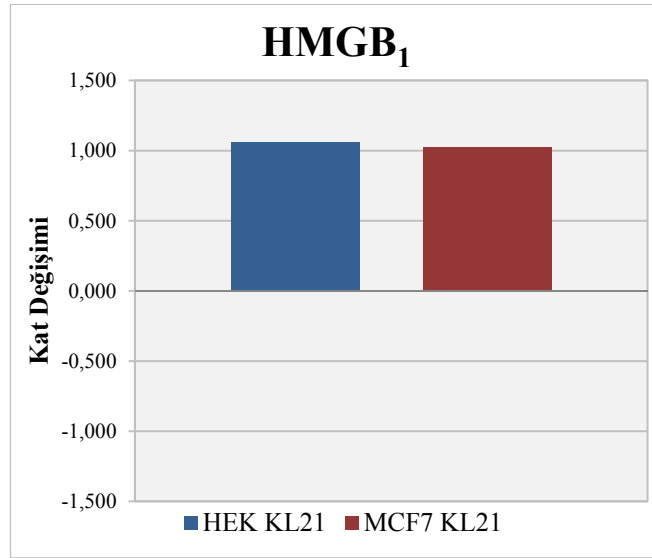


Şekil 3.40 Pro-survival STAT Sinyal Yolağı Genlerinin Kat Değişim Oranları

DNA Fragmentasyonunda görev alan genler (Aracı Proteinler): Aracı proteinlerden olan DFFA geninde HEK-293 hücre hattı 1 kat down-regülatif, MCF-7 hücre hattı ise 1 katlık up-regülatif aktivasyon gösterirken, FAM_{96B}, CAD ve HMGB₁ genlerinde her iki hücre hattı da up-regülatif değişiklik göstermiştir. FAM_{96A} geninde ise her iki hücre hattı da 1 katlık down-regülatif aktivasyon gösterirken MCF-7 hücre hattında bu aktivasyon HEK-293 hücre hattına göre 1 kattan biraz daha fazla olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.41).



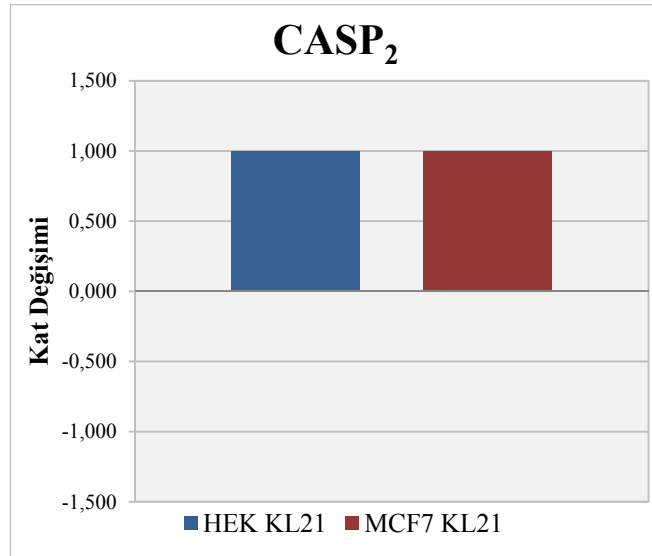


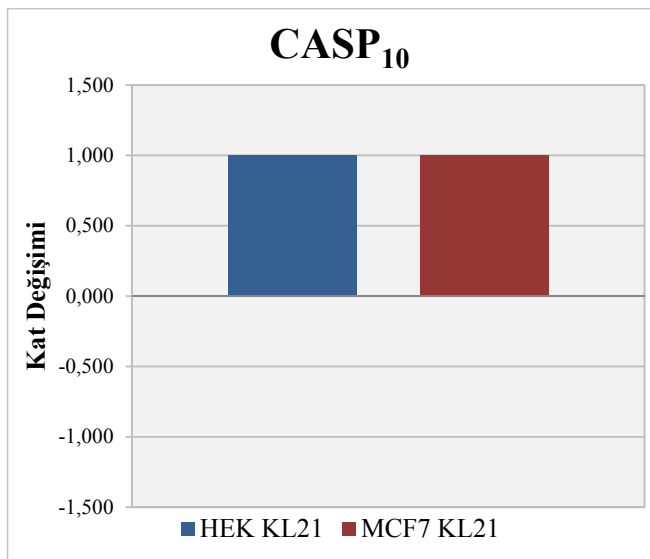
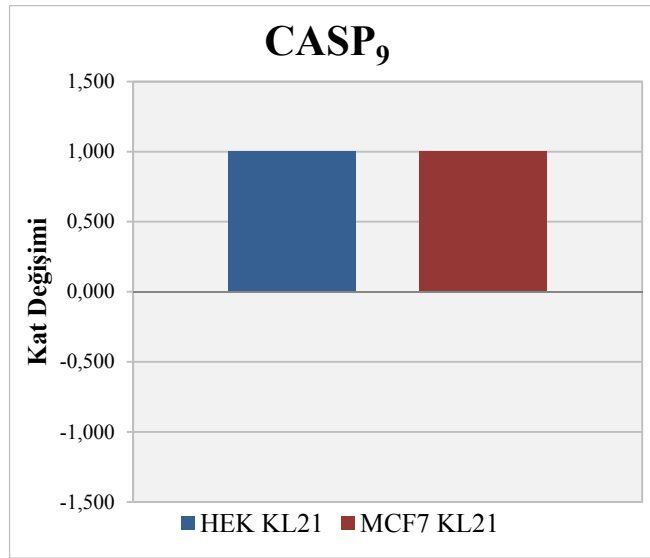
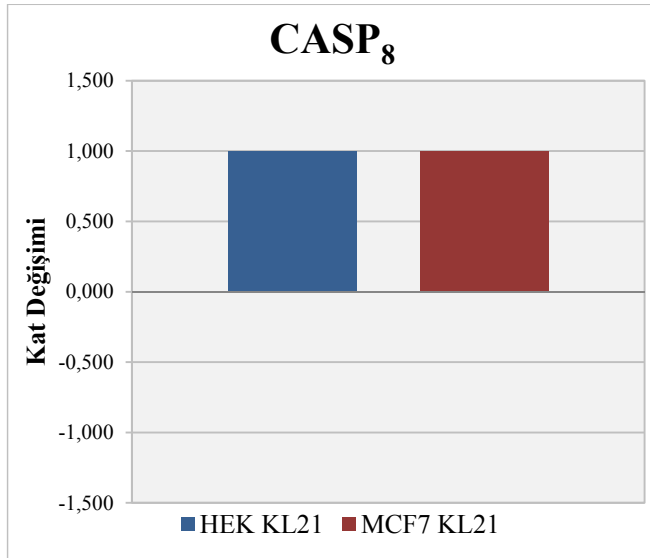


Şekil 3.41 DNA Fragmentasyonunda Görev Alan Genlerinin Kat Değişim Oranları

3.4.1.2.3. Kaspazlar ve Regülatör Genler

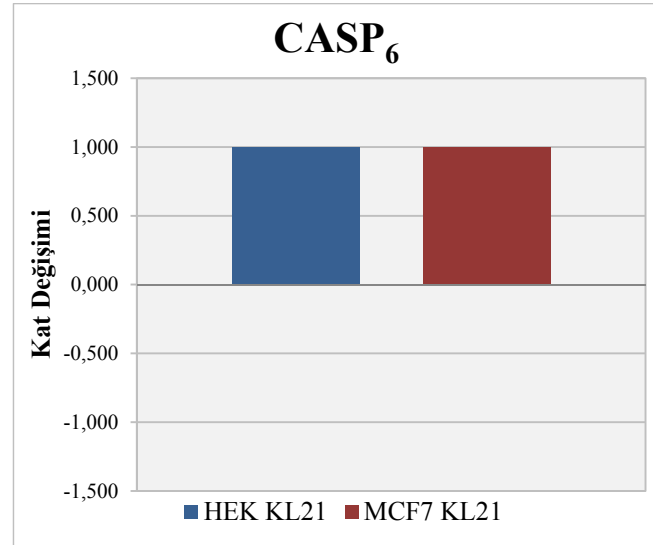
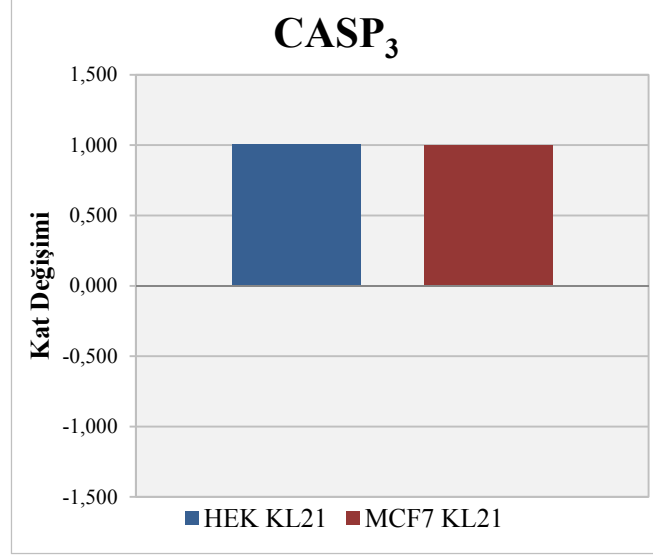
Başlatıcı Kaspazlar: Ekstrinsik apoptotik yolda görev alan başlatıcı kaspazlardan CASP₈ ve CASP₁₀ genleri, her iki hücre hattında da 1 katlık up-regülatif aktivasyon göstermiştir. Benzer şekilde instrinsik apoptotik yolda görev alan ve yine başlatıcı kaspazlardan olan CAS₂ ve CASP₉ genleri de her iki hücre hattında da 1 katlık up-regülatif değişiklik göstermiştir (Şekil 3.42).

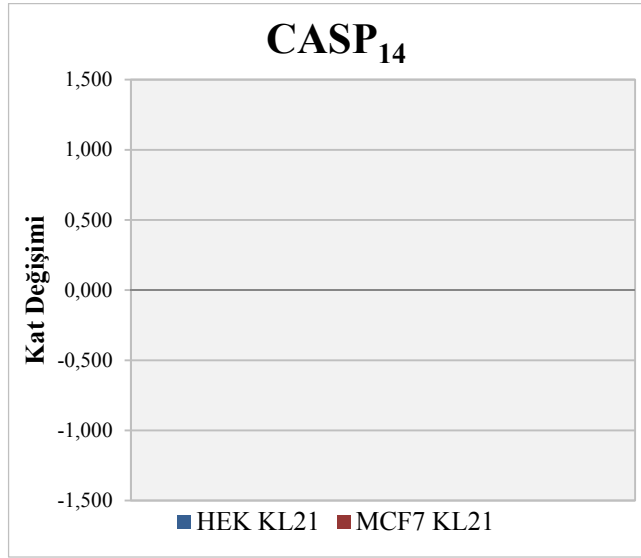
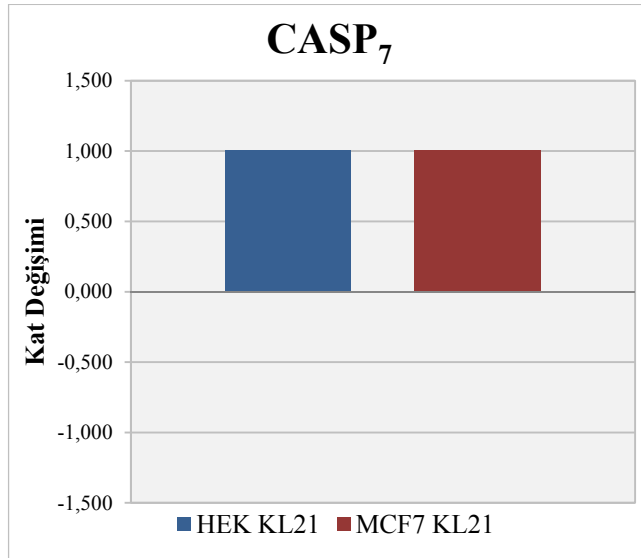




Şekil 3.42 Başlatıcı Kaspazların Gen Ekspresyonu Kat Değişim Oranları

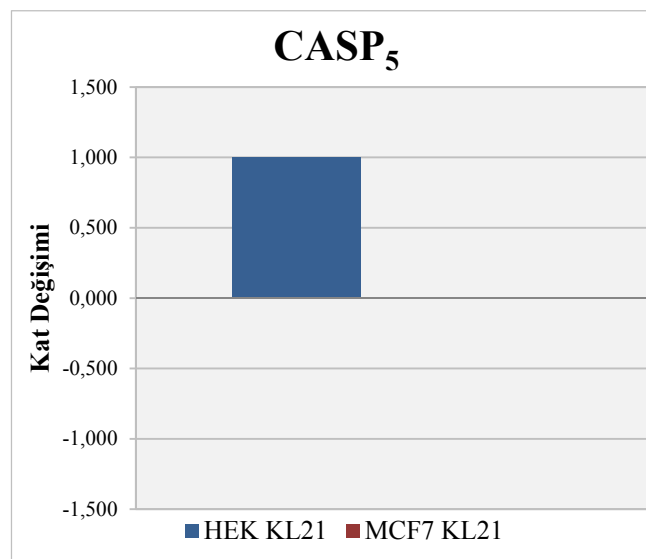
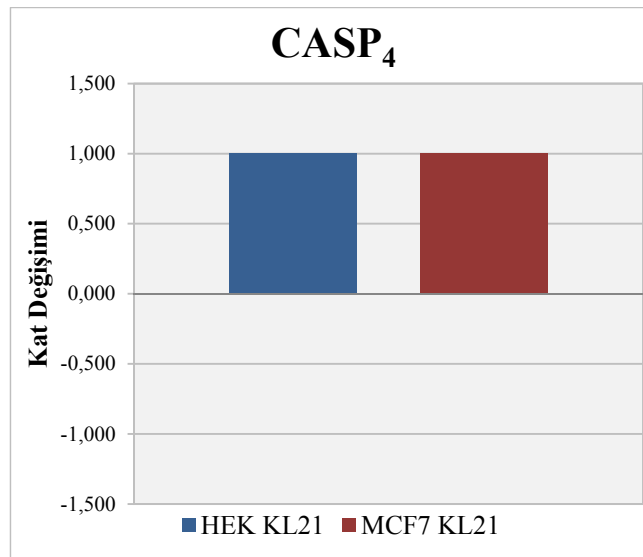
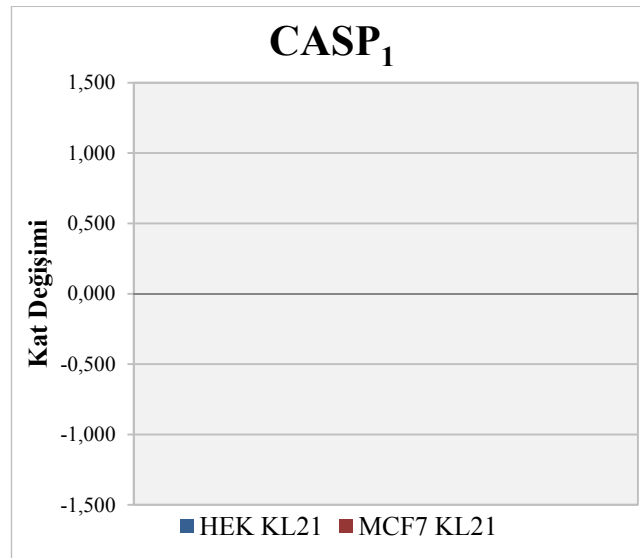
Effektör Kaspazlar: Tamamı ekstrinsik apoptotik yolda görev alan efektör kaspazlardan her iki hücre hattı için sadece CASP₁₄ geninde herhangi bir aktivasyon gözlenmezken, CASP₃, CASP₆ ve CAS₇ genlerinde 1 katlık up-regülatif değişiklik tespit edilmiştir (Şekil 3.43).

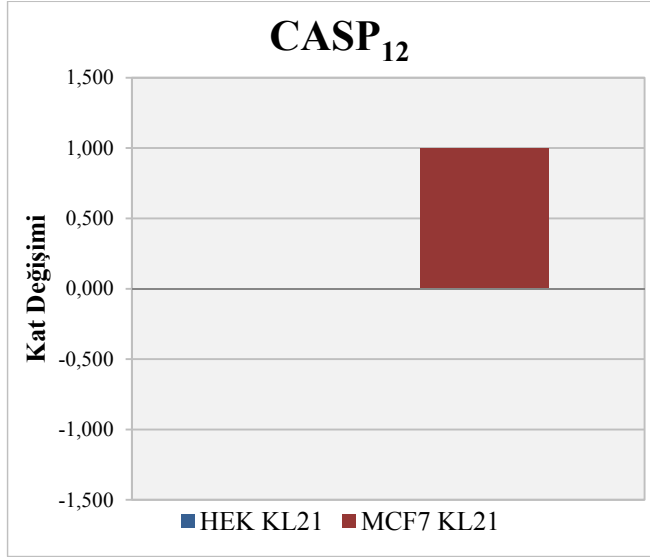




Şekil 3.43 Efektör Kaspazların Gen Ekspresyonu Kat Değişim Oranları

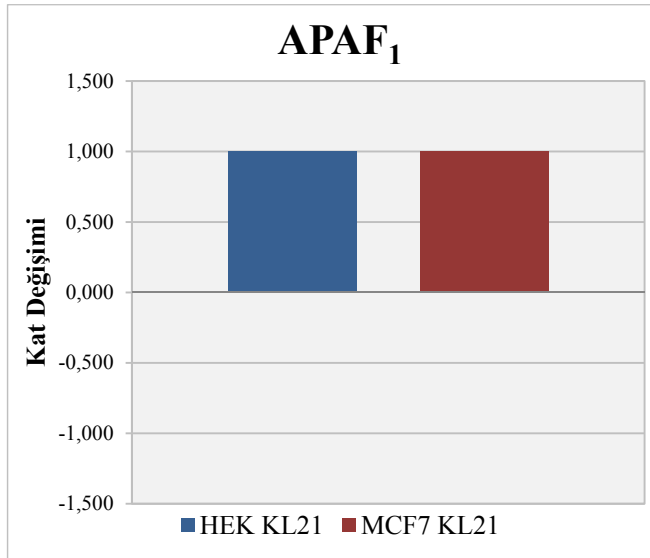
Inflamatuar Kaspazlar: HEK-293 ve MCF-7 hücre hatlarında $CASP_1$ geninde herhangi bir aktivasyon tespit edilmezken $CASP_4$ geninde ise her iki hücre hattında da 1 katlık up-regülatif değişiklik tespit edilmiştir. $CASP_5$ geninde HEK-293 hücre hattı 1 katlık up-regülatif değişiklik göstermiş olup MCF-7 hücre hattında ise herhangi bir aktivasyon belirlenmemiştir. $CASP_{12}$ geninde ise MCF-7 hücre hattı 1 katlık up-regülatif değişiklik göstermiş olup HEK-293 hücre hattında ise aktivasyon tespit edilmemiştir (Şekil 3.44).

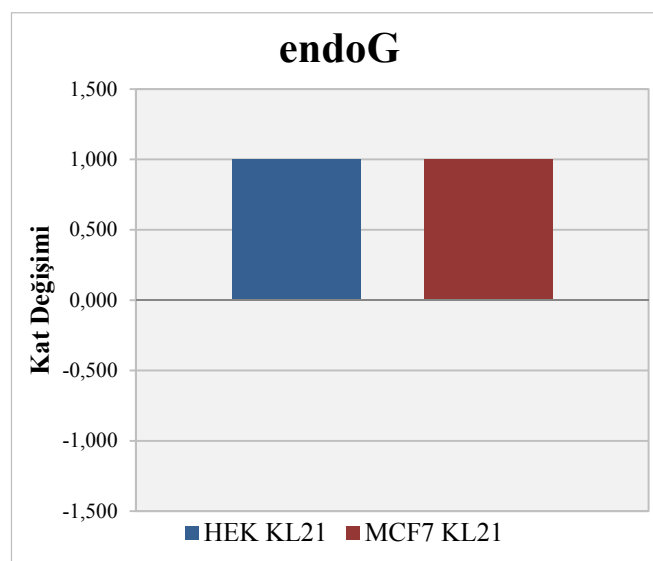
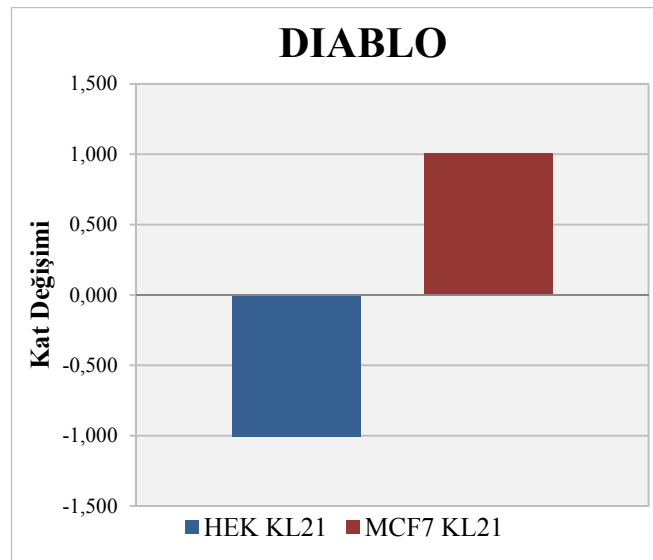
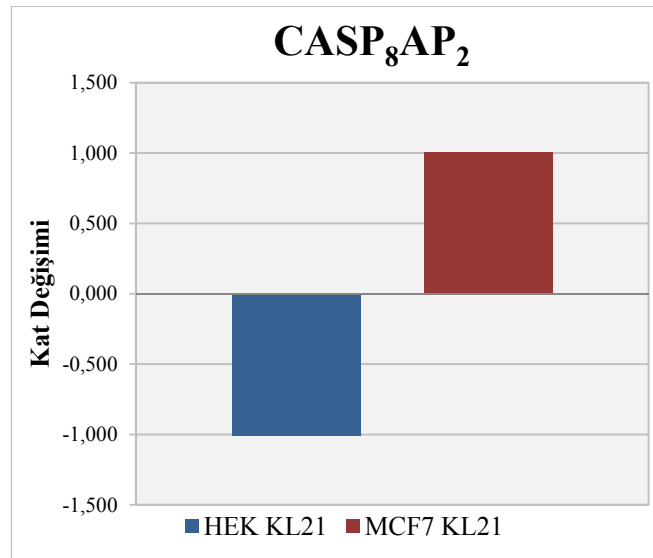


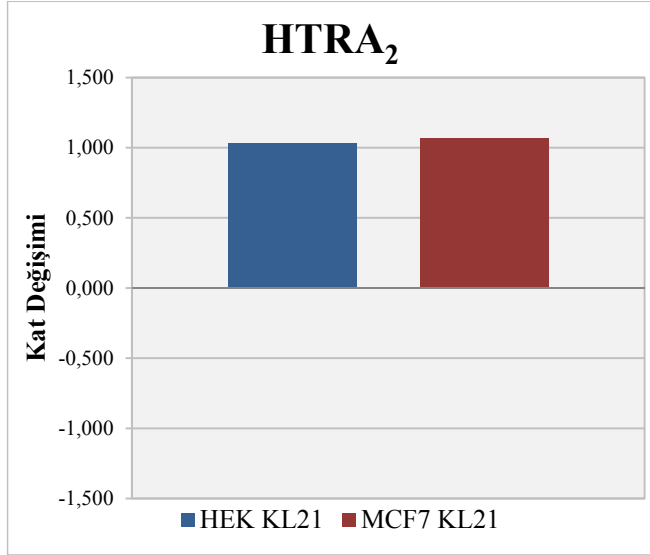


Şekil 3.44 İnflamatuvar Kaspazların Gen Ekspresyonu Kat Değişim Oranları

Kaspaz Regülatörleri: Her iki hücre hattında da 1 kat up-regülatif değişiklik gösterdiği genler, instrinsik apoptotik yolda görev alan apoptoz inhibitörü regülatörlerinden olan APAF₁, mitokondriyal prokürsörlerden olan endoG ve HTRA₂'dir. CASP₈AP₂ ve DIABLO genlerinde ise her iki hücre hattında 1'er katlık değişim göstermiş olup, HEK-293 hücre hattında bu değişim down-regülatif, MCF-7 hücre hattında ise up-regülatif aktivasyon şeklindedir (Şekil 3.45).

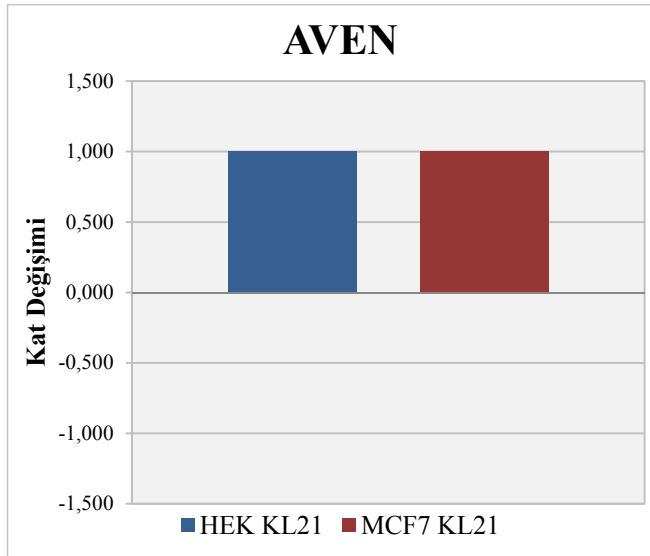


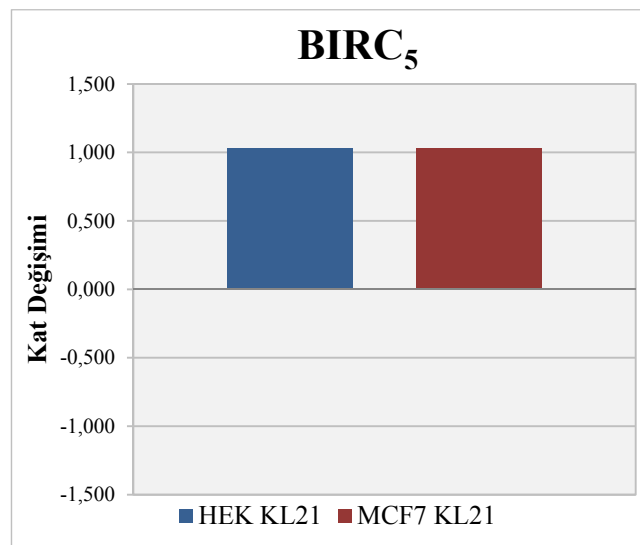
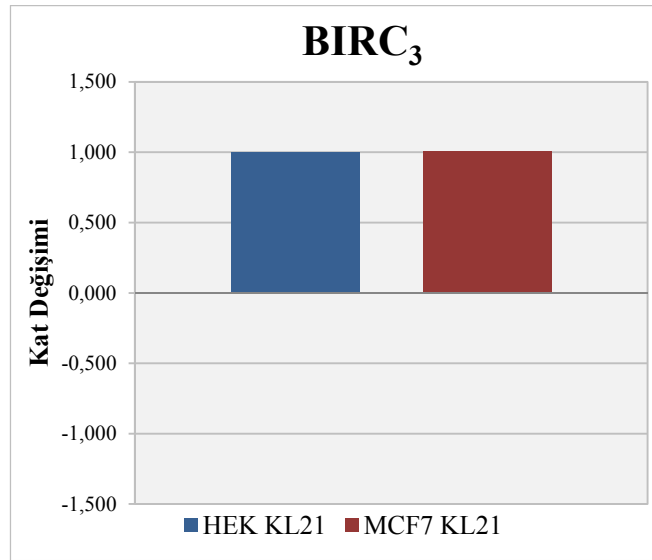
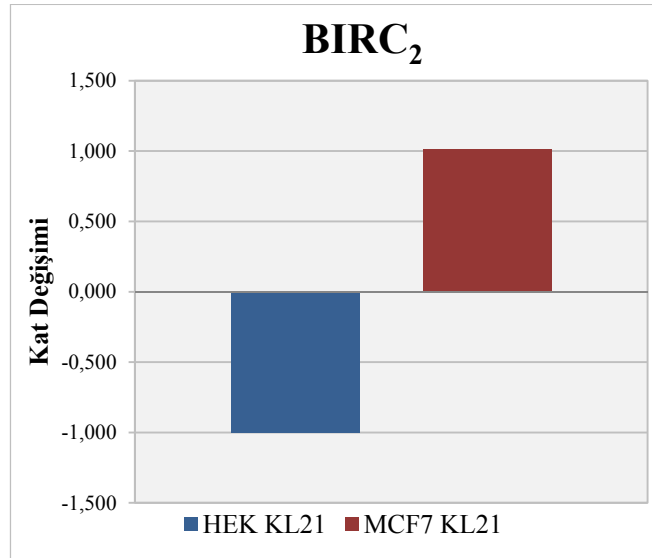


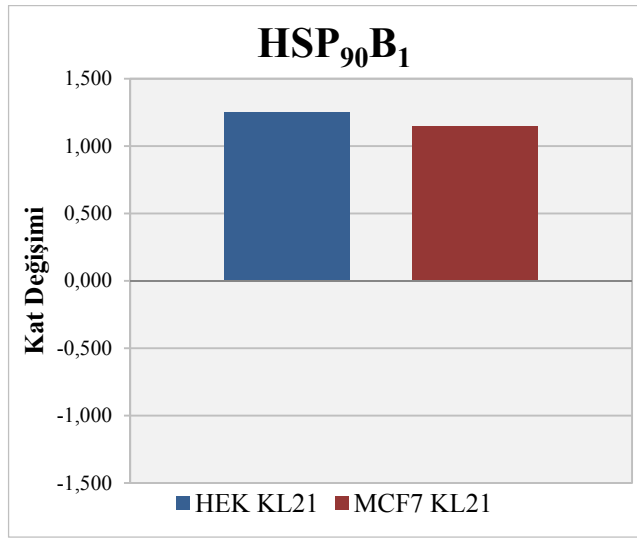
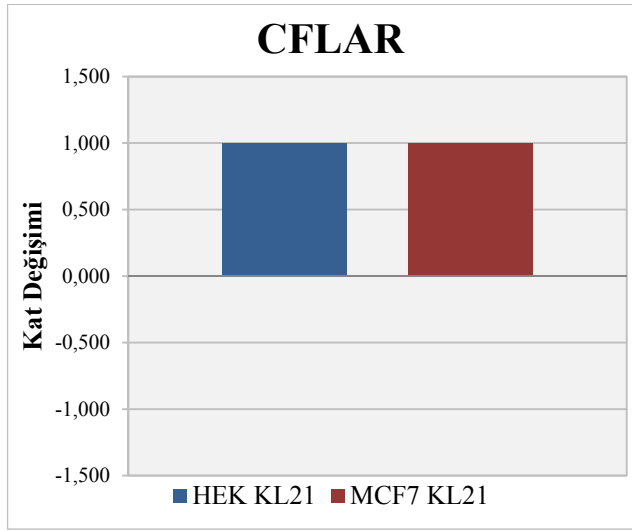


Şekil 3.45 Kaspaz Regülatör Genlerinin Ekspresyonu Kat Değişim Oranları

Apoptoz İnhibitörleri: İnstrinsik apoptotik yolda görev alan regülatör genlerden olan AVEN geni her iki hücre hattında da 1 kat up-regülatif değişiklik göstermiştir. Ekstrinsik apoptotik yolda görev alan apoptoz inhibitörlerinden olan BIRC₃ (cIAP₂), BIRC₅ ve CFLAR genlerinde her iki hücre hattında da 1 kat up-regülatif değişiklik göstermiş olmakla birlikte aynı grupta yer alan BIRC₂ (cIAP₁) geninde HEK-293 hücre hattında down-regülatif, MCF-7 hücre hattında ise up-regülatif aktivasyon tespit edilmiştir. Benzer şekilde her iki hücre hattı HSP_{90B1} geninde up-regülatif değişiklik göstermiş olmakla birlikte 1 kattan daha fazla aktivasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.46).







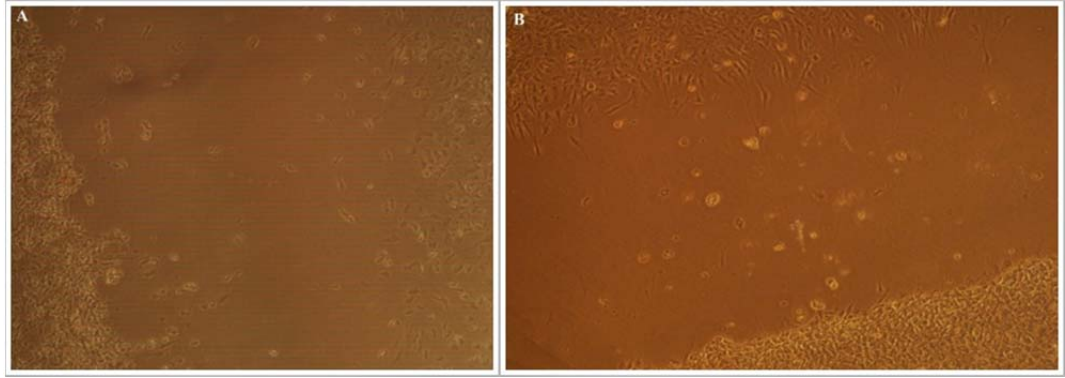
Şekil 3.46 Apoptoz İnhibitör Genlerinin Ekspresyonu Kat Değişim Oranları

3.4.2. Anti-anjiyogenik etkinin belirlenmesi

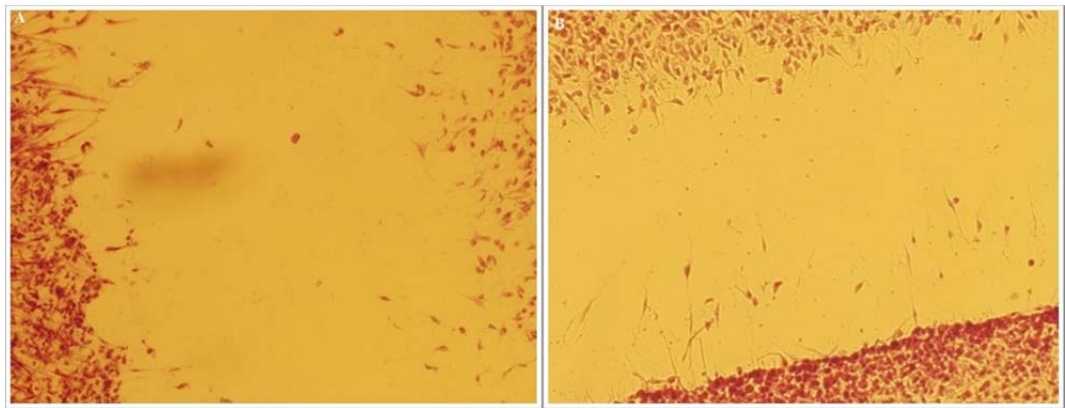
3.4.2.1. In vitro hücre migrasyon denemesi - yara iyileşme modeli

“CytoSelect 24 –Well Wound Healing Assay Kit” ile KL21 polihherbal formülasyon uygulamasının hücre migrasyonu ve anjiyogenezis gibi süreçlere etkisi ortaya konmuştur. Prosedür kapsamında yara oluşturulan bölgeye doğru kutuplaşarak göç eden hücre miktarı belirlenmiş, sonuçlar doğrultusunda yara iyileşme yüzdesi ve migrasyon oranı hesaplanmıştır.

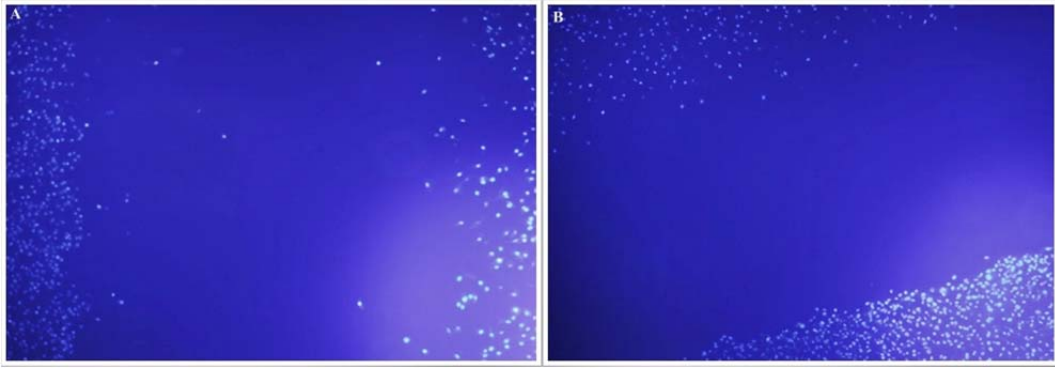
Herhangi bir boyama işlemi yapılamadan, uygulamanın 24. saatinde görüntü alınmıştır (Şekil 3.47). Ayrıca uygulamanın 48. saatinde giemsa boyama yapılarak tüm hücreler, (Şekil 3.48) DAPI boyama ile nükleuslar görüntülenmiştir (Şekil 3.49).



Şekil 3.47 24 Saat Sonunda Boyama Yapılmamış Alanların Görüntüsü **A.** Kontrol Grubu (% 0,1)
B. KL21 Polihherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi (5 mg/mL)



Şekil 3.48 48 Saat Sonunda Giemsa Boyama Yapılmış Alanların Görüntüsü **A.** Kontrol Grubu (% 0,1) **B.** KL21 Polihherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi (5 mg/mL)



Şekil 3.49 48 Saat Sonunda DAPI Boyama Yapılmış Alanların Görüntüsü **A.** Kontrol Grubu (% 0,1) **B.** KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresi (5 mg/mL)

Çalışma sonucunda kontrol (DMSO) maddesinin absorbans değerlerine göre yara iyileşme yüzdesi belirlenmiştir. Çalışmaya göre, 5 mg/mL uygulama dozunda KL21 polihherbal formülasyonunun etanol ekstresinin yara kapatma yüzdesi $\% 28 \pm 5$; Migrasyon oranı ise 6,66 nm /s olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.34, 3.35).

Çizelge 3.34 Yara İyileşme Modeli Sonuçları

KL21 Poliherbal Formülasyonu Etanol Ekstresinin Yara İyileşme Yüzdesi	
DMSO (570 nm Absorbans)	$\mu\text{g/mL}$
0,25	25
0,17	12,50
0,27	6,25
0,28	3,25
0,27	1,63
0,11	0,63

Çizelge 3.35 Migrasyon Oranı

Hücre Migrasyon Oranı	Hücre Migrasyon Uzunluğu (nm)	Migrasyon Zamanı (saat)
	320	48
	6,66	

3.4.2.2. In vivo koryoallantoik membran yöntemi (HET-CAM)

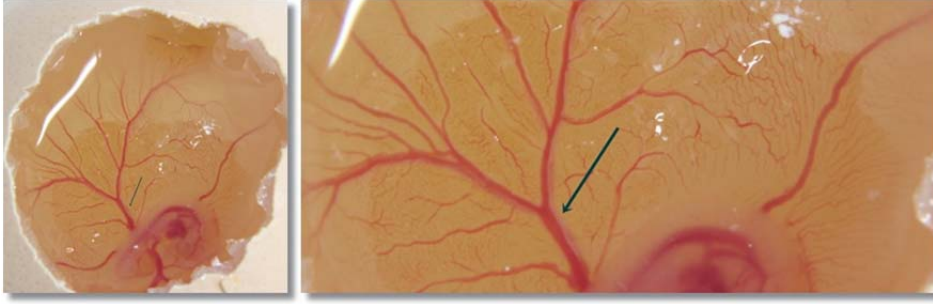
KL21 polih herbal formülasyonun anti anjiyogenik etki göstererek tümör büyümesini inhibe ettiğini kanıtlamak amacıyla Het-Cam metodu gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda koryoallantoik membran üzerinde hemoraji, vasküler lizis ve koagülasyon bakımından değerlendirmeler yapılmış ve Çizelge 3.36’da verilen skor tablosuna göre anti anjiyogenik etkisi hesaplanmıştır.

Pozitif kontrol olarak anti anjiyogenik etkinliği kanıtlanmış Süramin (Şekil 3.52), Negatif kontrol olarak ise NaCl kullanılmıştır (Şekil 3.50). Çalışmada çözgen olarak kullanılan DMSO’nun herhangi bir anjiyogenik etkisi tespit edilmemiştir (Şekil 3.51).

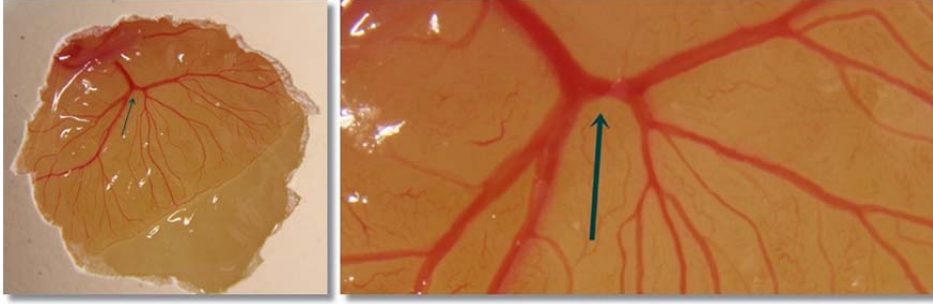
KL21 polih herbal formülasyonun etanol ve metanol ekstralarının en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 900 µL/mL’de güçlü bir anti anjiyogenik etki tespit edilirken (Şekil 3.53, 3.54) orta ve düşük dozlarda (600-300 µL/mL) herhangi bir etkiye rastlanmamıştır (Şekil 3.55, 3.56, 3.57, 3.58).

Çizelge 3.36 Anti-Anjiyogenik Skorum Sistemi Sonuçları

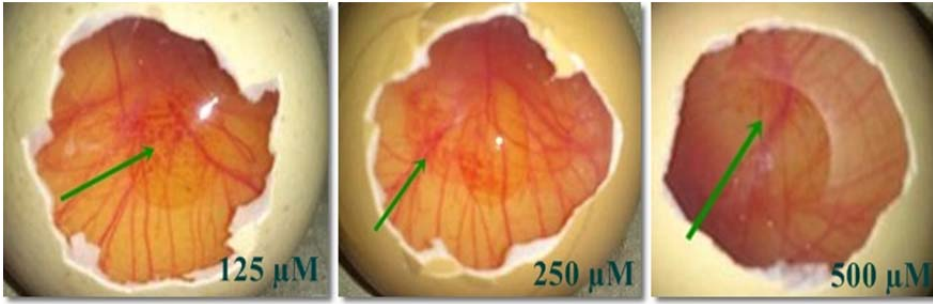
Örnekler	Konsantrasyon	Yumurta Sayısı	Etki	Skor
Etanol Ekstresi	900 µL/mL	5	Kuvvetli	>1
	600 µL/mL	5	Yok	0
	300 µL/mL	5	Yok	0
Metanol Ekstresi	900 µL/mL	5	Kuvvetli	>1
	600 µL/mL	5	Yok	0
	300 µL/mL	5	Yok	0
Çözgen Kontrol DMSO	100 µL	5	Yok	0
Pozitif Kontrol Süramin	125 µM	5	Kuvvetli	>1
	250 µM			
	500 µM			
Negatif Kontrol NaCl çözeltisi	% 0,9 (w/v)	5	Yok	0



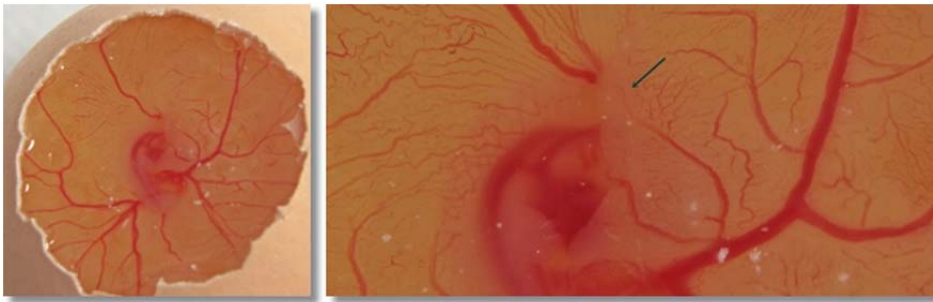
Şekil 3.50 HET-CAM Negatif Kontrol Grubu



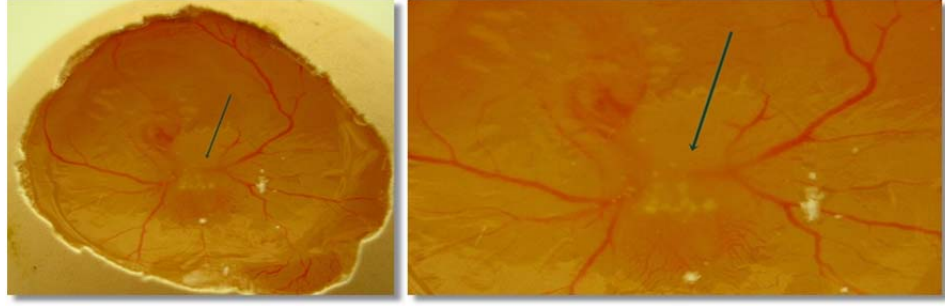
Şekil 3.51 HET-CAM DMSO Çözgen Kontrol Grubu



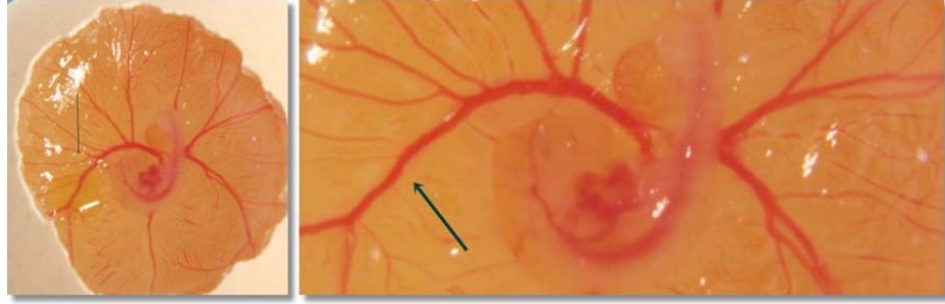
Şekil 3.52 HET-CAM Pozitif Kontrol Grubu



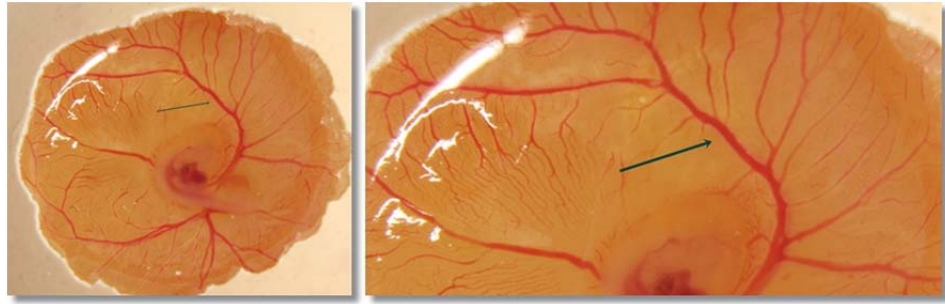
Şekil 3.53 HET-CAM 900 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonunun Metanol Ekstresi



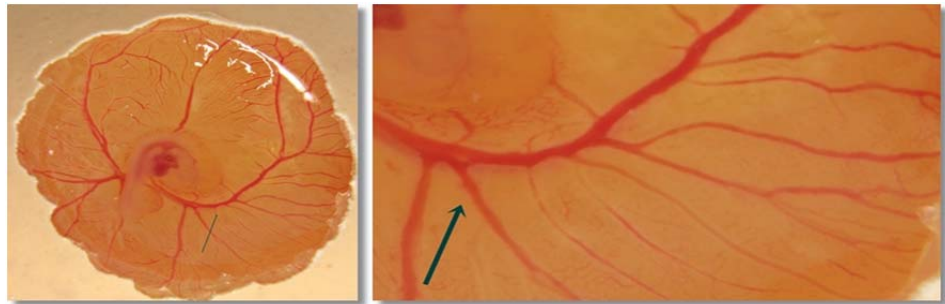
Şekil 3.54 HET-CAM 900 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Etanol Ekstresi



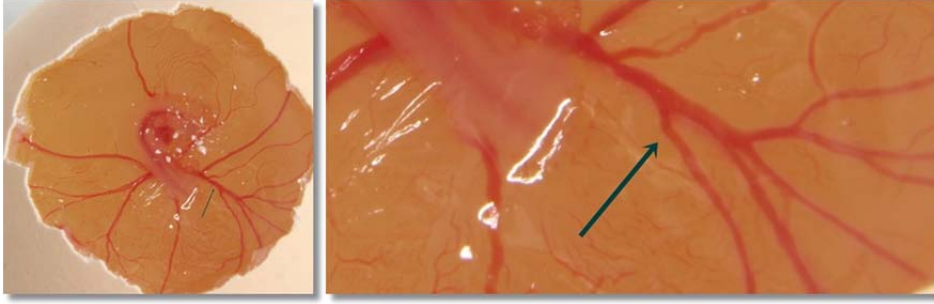
Şekil 3.55 HET-CAM 600 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Metanol Ekstresi



Şekil 3.56 HET-CAM 600 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Etanol Ekstresi



Şekil 3.57 HET-CAM 300 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Metanol Ekstresi



Şekil 3.58 HET-CAM 300 µg/mL KL21 Poliherbal Formülasyonun Etanol Ekstresi

3.4.3. *In vivo* Ehrlich Ascites tümör modeli

Çalışma kapsamında tümör kontrol grubunda EAC hücreleri ile başarılı bir şekilde solid tümör oluşturulmuştur (Şekil 3.59).



Şekil 3.59 Tümör Kontrol Grubu

Pozitif kontrol grubunda süramin uygulaması gerçekleştirilmiş ve 7 fareden 3 tanesinde tümör oluşumu tespit edilmemiştir. Uygulama sürecini kapsayan 14 gün boyunca fareler düzenli olarak tartılmışlardır.

Farelerin vücut ağırlıklarının başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında tümör kontrol, KL21 pre- ve post-implantasyon grupları ile süramin grubunda çalışma sonlandığında bir artış tespit edilmiştir (Çizelge 3.37).

Çizelge 3.37 Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları

Günler	Total vücut ağırlığı (g) (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-KL21	Post-KL21	Tümör	Pozitif	Negatif
1	23,57±1,98	23,24±3,45	23,85±3,41	25,19±1,67	22,39±3,13
2	24,16±1,40	23,82±3,22	24,48±3,17	25,28±1,65	23,43±3,33
3	23,16±2,41	23,61±2,99	24,28±2,62	25,36±1,52	23,55±2,97
4	24,95±2,80	24,84±3,45	24,86±3,51	25,95±1,53	24,76±3,96
5	25,21±2,92	25,13±3,61	24,89±3,51	26,58±1,07	24,97±3,77
6	25,09±3,37	24,94±3,37	25,41±3,41	26,54±1,39	25,08±3,80
7	24,41±3,08	24,23±3,23	24,55±3,45	25,59±1,27	25,60±4,46
8	24,80±3,26	25,02±3,24	24,97±3,72	26,29±1,44	24,47±4,83
9	25,82±3,39	25,84±3,79	25,50±4,10	26,62±5,13	27,24±0,99
10	26,12±3,72	26,14±2,86	25,88±4,53	28,18±0,74	26,55±4,82
11	25,81±3,74	26,81±3,47	26,52±4,18	28,62±1,25	27,30±5,45
12	26,21±3,76	26,70±3,73	25,95±4,92	28,91±1,40	27,04±5,87
13	26,07±4,30	27,17±3,66	26,18±4,89	29,26±1,04	26,86±5,60
14	26,56±4,04*	27,42±3,90*	26,38±4,61*	29,66±1,15	24,17±5,09

Gruplar arasında bitiş değerleri bakımından istatistiksel açıdan $p < 0,05$ seviyesinde farklılık tespit edilmiştir.

Ehrlich ascites tümör modeli sonuçlarına göre KL21 pre ve post implantasyon grupları ile tümör kontrol grubunda tümör oluşum yüzde % 100 iken, süramin uygulaması yapılan pozitif kontrol grubunda ise tümör oluşum yüzdesi % 57,14 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.8). Ayrıca KL21 post-implantasyon grubunda kontrol grubuna kıyasla tümör hacminde ve tümör ağırlığında azalma tespit edilmiştir (Çizelge 3.38).

Çizelge 3.38 Ehrlich Ascites Tümör Modeli Sonuçları

Gruplar	Tümör Ağırlık (g)	Tümör Uzunluk	Tümör Genişlik	Tümör Hacmi (mm ³)	Tümör Oluşum Yüzdesi (%)
KL21 Pre implantasyon	0,18	0,55	1,02	0,28	100
	0,25	2,00	1,50	1,50	
	0,05	0,04	1,00	0,02	
	0,25	1,30	1,00	0,65	
	0,27	1,50	1,00	0,75	
	0,20	2,00	0,80	0,80	
	0,17	1,00	0,90	0,45	
Ort. ± SS	0,19±0,07	1,20±0,72	1,03±0,20	0,65±0,47	
KL21 Post implantasyon	0,15	0,90	0,70	0,32	100
	0,10	1,00	0,50	0,25	
	0,24	1,50	0,50	0,38	
	0,12	0,60	0,60	0,18	
	0,18	0,50	0,90	0,23	
	0,08	1,00	0,30	0,15	
	0,07	1,00	0,25	0,13	
Ort. ± SS	0,13±0,06*	0,93±0,32	0,54±0,21	0,23±0,08*	
Tümör Kontrol	0,12	0,40	1,01	0,20	100
	0,22	1,00	0,40	0,20	
	0,37	2,10	1,00	1,05	
	0,20	0,90	0,70	0,32	
	0,10	1,00	0,50	0,25	
	0,32	2,00	1,50	1,50	
	0,28	0,50	1,10	0,28	
Ort. ± SS	0,23±0,10	1,13±0,68	0,89±0,35	0,54±0,51	
Pozitif Kontrol	0,13	1,10	0,90	0,50	57,14
	0,21	1,20	0,80	0,48	
	0,72	2,30	1,10	1,27	
	0,09	0,50	0,60	0,15	
Ort. ± SS	0,29±0,29	1,28±0,65	0,85±0,20	0,47±0,23	

3.4.3.1. Biyokimyasal ve hematolojik analizler

Vetscan HM5 ve VS2 cihazları ile farelerin hematoloji ve biyokimya parametreleri incelenmiştir.

Hematoloji parametreleri incelendiğinde gruplar arasında başlangıç değerleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 3.399). Bitiş parametrelerinde ise KL21 pre- ve post-implantasyon gruplarında lenfosit miktarında artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde monosit

değerlerinde negatif kontrol grubu ile tümör kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan artış saptanmıştır. Çalışmanın başında alınan kanlar ile analizler sonlandığında toplanan kanlar arasında hematoloji parametrelerinde ki istatistiksel değişiklikler belirlenmiştir. Bunlar arasında negatif kontrol grubunda, eritrosit hemoglobin konsantrasyonunun yüzde olarak ifadesi olan MCHC parametresi ile tümör kontrol grubunda, trombositlerin dağılım genişliği olarak adlandırılan PDWc parametresinde istatistiksel açıdan $p<0,05$ seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde KL21 pre-implantasyon grubunda MCHC ve eritrositlerin dağılım genişliği olan RDWc parametresi ile KL21 post-implantasyon grubunda lenfosit değerinde, süramin grubunda ise MCHC değerinde istatistiksel açıdan önemli bir artış belirlenmiştir (Çizelge 3.40).

Çizelge 3.39 Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort $\pm$ SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-KL21	Post-KL21	Tümör	Pozitif	Negatif
WBC (10^9 h/L)	7,54 $\pm$ 2,02	9,48 $\pm$ 3,50	8,44 $\pm$ 2,02	9,13 $\pm$ 0,57	9,00 $\pm$ 0,88
LYM (10^9 h/L)	5,91 $\pm$ 0,57	4,11 $\pm$ 0,01	5,60 $\pm$ 2,12	6,64 $\pm$ 0,73	6,81 $\pm$ 0,43
MON (10^9 h/L)	0,27 $\pm$ 0,21	0,25 $\pm$ 0,11	0,14 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,23	0,25 $\pm$ 0,11
NEU (10^9 h/L)	0,92 $\pm$ 0,31	2,22 $\pm$ 0,16	1,31 $\pm$ 1,31	0,54 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,13
RBC (10^{12} h/L)	9,05 $\pm$ 0,02	7,58 $\pm$ 0,08	7,19 $\pm$ 0,46	8,27 $\pm$ 0,95	8,08 $\pm$ 1,72
HGB (g/L)	14,14 $\pm$ 0,27	14,59 $\pm$ 0,60	14,65 $\pm$ 0,67	13,21 $\pm$ 0,43	14,33 $\pm$ 0,32
HCT (%)	39,09 $\pm$ 5,75	39,94 $\pm$ 1,81	36,88 $\pm$ 2,52	34,16 $\pm$ 2,47	37,54 $\pm$ 1,37
MCV (fl)	47,00 $\pm$ 2,83	49,00 $\pm$ 5,66	50,50 $\pm$ 3,54	45,00 $\pm$ 0,10	46,50 $\pm$ 0,70
MCH (pg)	12,60 $\pm$ 0,28	11,70 $\pm$ 0,99	11,85 $\pm$ 1,20	12,60 $\pm$ 0,10	12,65 $\pm$ 0,21
MCHC (g/dL)	28,15 $\pm$ 3,60	28,70 $\pm$ 0,85	27,90 $\pm$ 1,98	29,51 $\pm$ 2,28	30,00 $\pm$ 0,71
RDWc (%)	18,20 $\pm$ 1,55	18,90 $\pm$ 0,42	18,90 $\pm$ 0,42	17,65 $\pm$ 0,77	18,30 $\pm$ 0,14
PLT (10^9 hücre/L)	291,50 $\pm$ 4,95	295,00 $\pm$ 49,50	280,00 $\pm$ 28,28	308,00 $\pm$ 82,02	280,00 $\pm$ 14,14
PCT (%)	0,23 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,11	0,20 $\pm$ 0,15	0,13 $\pm$ 0,11
MPV (fl)	7,10 $\pm$ 0,84	8,05 $\pm$ 0,21	7,55 $\pm$ 0,91	6,90 $\pm$ 0,28	7,60 $\pm$ 0,56
PDWc (%)	34,80 $\pm$ 1,69	36,90 $\pm$ 3,25	39,45 $\pm$ 0,35	34,30 $\pm$ 0,40	35,70 $\pm$ 1,69

Gruplar arasında başlangıç değerleri bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.40 Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-KL21	Post-KL21	Tümör	Pozitif	Negatif
WBC (10 ⁹ h/L)	11,78±1,83	12,03±,56	10,75±0,16	8,84±3,16	7,95±0,62
LYM (10 ⁹ h/L)	6,42±0,93*	6,82±0,14*	5,59±1,34	4,45±0,05	4,31±0,79*
MON (10 ⁹ h/L)	0,56±0,08	0,45±0,20	0,72±0,42*	0,25±0,13	0,12±0,09*
NEU (10 ⁹ h/L)	4,71±2,80	4,55±1,20	4,35±1,13	3,92±3,10	2,91±0,64
RBC (10 ¹² h/L)	9,13±0,07	8,35±0,89	8,54±0,83	8,08±0,46	8,46±0,43
HGB (g/L)	15,20±0,43	13,10±1,84	13,70±1,84	27,40±20,49	13,90±0,71
HCT (%)	44,40±3,42	38,83±9,09	38,70±4,93	38,25±3,18	41,90±1,14
MCV (fl)	48,50±3,53	46,00±5,65	45,00±1,41	48,50±2,12	49,50±3,54
MCH (pg)	16,70±0,56	15,70±0,56	16,10±0,56	16,60±0,14	16,45±0,07
MCHC (g/dL)	34,40±3,53	34,14±3,18	35,55±0,21	43,20±14,28	33,25±2,47
RDWc (%)	19,30±0,85	18,70±0,14	18,10±0,85	18,35±0,07	18,90±0,56
PLT (10 ⁹ hücre/L)	248,65±65,05	345,00±247,49	322,50±14,85	463,00±424,26	588,00±50,91
PCT (%)	0,18±0,06	0,26±0,21	0,19±0,07	0,30±0,23	0,37±0,10
MPV (fl)	7,45±0,35	7,35±1,06	6,05±0,07	7,45±1,76	6,30±0,56
PDWc (%)	36,10±4,38	31,45±0,35	29,05±0,77	35,35±8,84	29,35±0,35

Gruplar arasında bitiş değerleri bakımından istatistiksel açıdan $p<0,05$ seviyesinde farklılık tespit edilmiştir.

Biyokimya parametreleri incelendiğinde gruplar arasında başlangıç değerleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir (Çizelge 3.41). Bitiş parametrelerinde ise negatif kontrol, KL21 pre ve post-implantasyon grupları ile süramin uygulama grubu, alanin aminotransferaz değeri bakımından negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında amilaz parametresi, tümör kontrol ve süramin grubunda artış göstermekle birlikte tümör kontrol, KL21 pre ve post-implantasyon gruplarında fosfat ve glukoz değerlerinde istatistiksel açıdan $p<0,05$ seviyesinde önemli bir azalma saptanmıştır (Çizelge 3.41, Çizelge 3.42).

Biyokimyasal parametrelerin başlangıç ve bitiş değerleri incelendiğinde ise tümör kontrol grubunda amilaz değerinde artış, sodyum değerinde ise azalma saptanmış; süramin uygulama grubunda ise albümin değerinde azalma istatistiksel olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.42).

Çizelge 3.41 Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları

Parametreler	Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-KL21	Post-KL21	Tümör	Pozitif	Negatif
ALB (g/dL)	3,32±0,25	3,96±0,07	4,15±0,21	4,25±0,07	4,15±0,21
ALP (u/L)	85,50±7,77	81,00±2,82	82,00±2,82	79,00±7,07	89,50±9,19
ALT (u/L)	43,00±0,01	67,50±3,53	66,00±1,41	46,00±5,65	64,00±19,79
AMY (u/L)	995,50±159,09	783,50±112,43	670,0±45,25	833,00±178,19	764,00±50,91
TBIL (mg/dL)	0,30±0,14	0,30±0,01	0,35±0,07	0,30±0,01	0,25±0,01
BUN (mg/dL)	11,50±0,70	13,00±2,82	11,50±2,12	15,50±0,70	15,50±3,54
Ca (mg/dL)	10,40±0,56	10,80±0,56	9,80±0,42	9,85±0,49	9,40±0,84
Phos (mg/dL)	8,40±1,13	6,75±0,07	8,50±2,68	8,65±0,77	8,30±0,98
Cre (mg/dL)	0,20±0,01	0,25±0,07	0,30±0,01	0,20±0,01	0,30±0,14
GLU (mg/dL)	230,00±28,28	211,00±1,41	174,50±34,6	214,00±18,38	215,50±6,36
Na (mmol/L)	135,50±2,12	134,00±34,64	132,50±0,70	214,00±18,38	137,00±1,41
K (mmol/L)	6,55±1,48	6,45±2,75	4,60±0,42	7,80±2,26	5,90±0,14
TP (g/dL)	5,75±0,35	5,30±0,42	5,60±0,98	5,70±0,42	5,95±0,35
GLOB (g/dL)	2,60±0,84	1,90±0,56	2,80±0,56	3,00±0,56	2,65±0,63

Gruplar arasında başlangıç değerleri bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur.

Çizelge 3.42 Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları

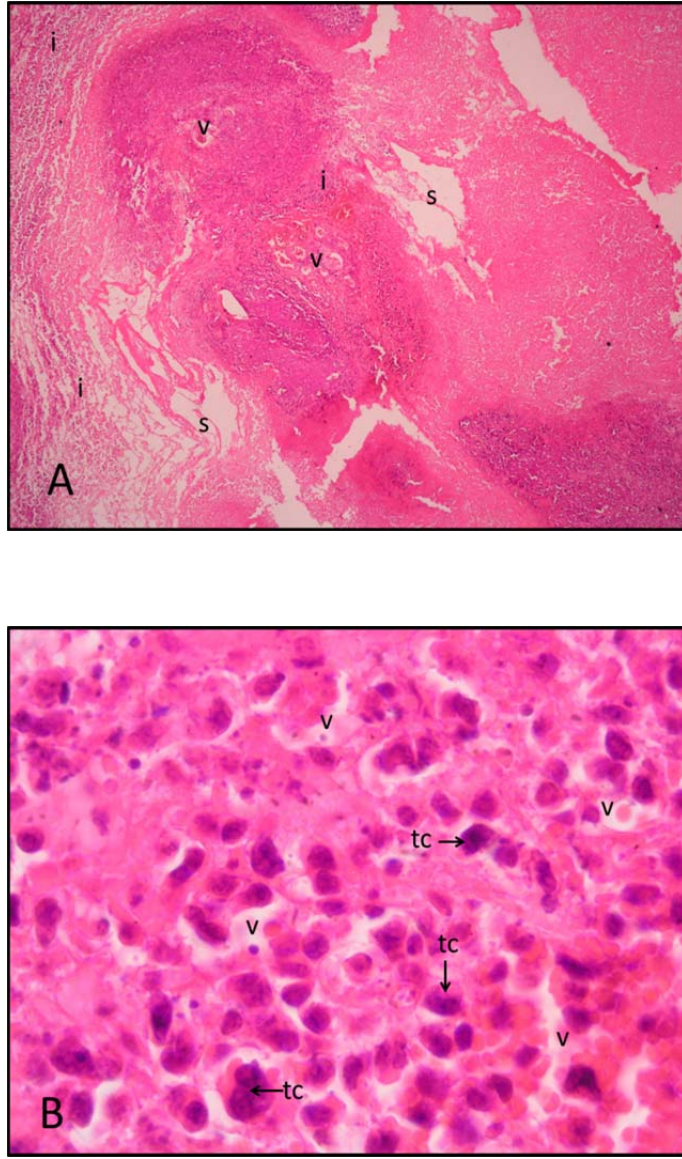
Parametreler	Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-KL21	Post-KL21	Tümör	Pozitif	Negatif
ALB (g/dL)	3,00±0,14	3,75±0,21	3,10±0,56	3,30±0,14*	3,15±0,21
ALP (u/L)	68,50±2,12	87,00±5,65	53,50±28,99	96,00±21,21	95,00±2,82
ALT (u/L)	43,50±7,77*	49,00±11,31*	46,50±3,53*	39,50±2,12*	73,00±2,82
AMY (u/L)	811,50±16,26	831,00±97,58	960,00±46,66*	1077,50±33,23*	793,50±9,19
TBIL (mg/dL)	0,45±0,07	0,45±0,07	0,50±0,01	0,50±0,01	0,50±0,01
BUN (mg/dL)	16,50±0,70	21,00±5,65	18,50±0,70	21,00±0,01	21,00±1,41
Ca (mg/dL)	51,65±59,89	9,55±0,21	9,70±0,28	9,40±0,01	10,35±0,07
Phos (mg/dL)	6,10±0,28*	7,55±1,06*	6,75±1,34*	7,55±0,35	9,90±0,14
Cre (mg/dL)	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01
GLU (mg/dL)	195,00±7,07*	213,00±1,41*	211,00±28,28*	239,50±10,60	251,00±1,31
Na (mmol/L)	144,00±1,41	145,50±0,70	145,00±0,01*	143,50±0,70*	146,00±1,41
K (mmol/L)	4,95±0,07	5,20±0,98	4,70±0,28	4,95±0,35	4,90±0,42
TP (g/dL)	4,75±0,49	5,25±0,07	4,75±0,49	5,00±0,28	4,95±0,07
GLOB (g/dL)	2,15±0,07	1,50±0,28	1,65±0,07	1,65±0,07	1,80±0,28

Gruplar arasında bitiş değerleri bakımından istatistiksel açıdan $p<0,05$ seviyesinde farklılık tespit edilmiştir.

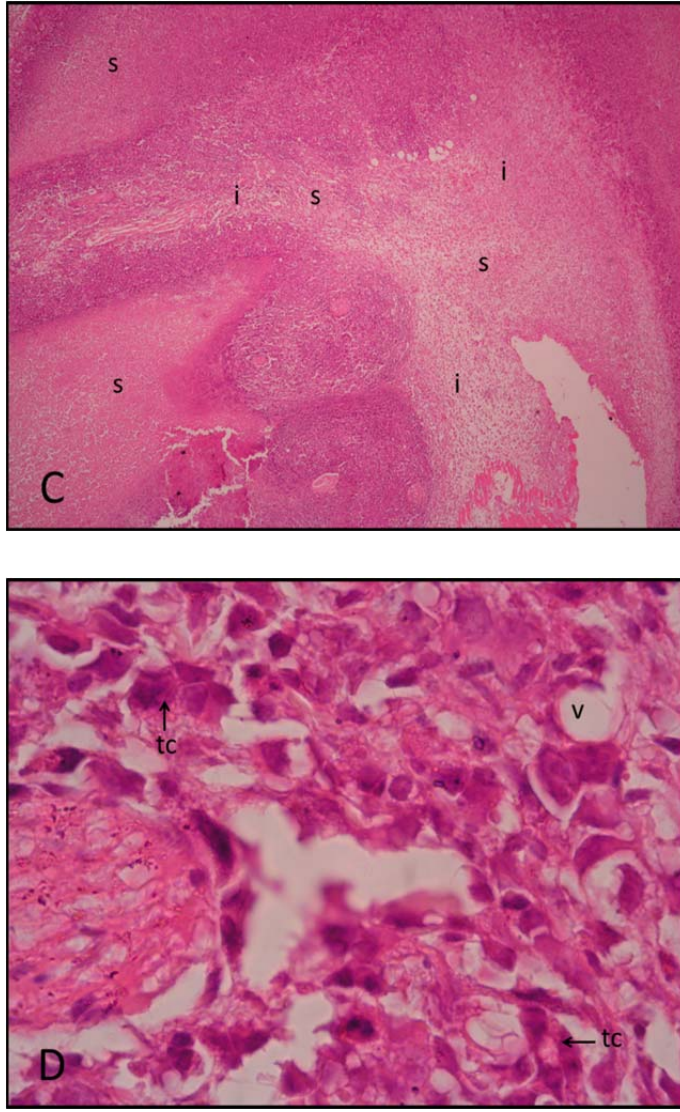
3.4.3.2. Histokimyasal değerlendirme

3.4.3.2.1. Hematoksilen-Eozin boyama sonuçları

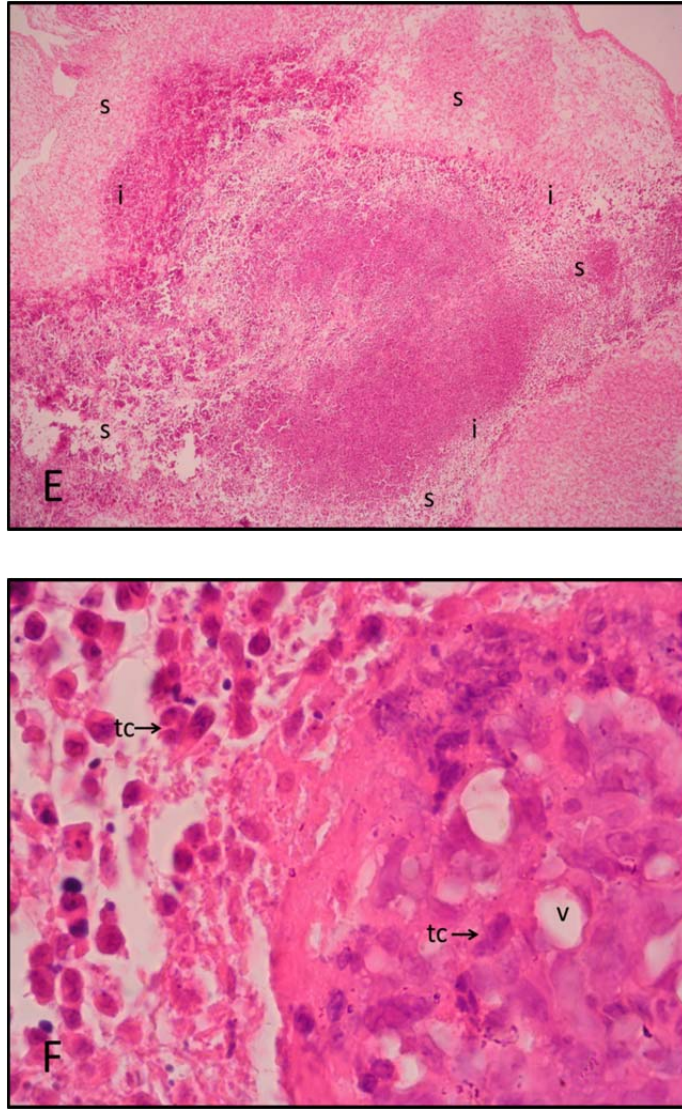
Hematoksilen-Eozin ile boyanmış tümör dokusu kesitleri rutin histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre, genel histolojik görünüm tümör dokusu yaygınlığı ve yoğunluğu, stromal doku, lökosit infiltrasyonu ve damar yoğunlukları açısından deney grupları karşılaştırılarak incelenmiştir. Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde oldukça yoğun (kompakt) ve yaygın tümör dokusu görülmektedir (Şekil 3.60). Ayrıca diğer gruplara göre azalmış stromal doku ve lökosit infiltrasyonu ile birlikte çok sayıda dolgun damarlar izlenmektedir. Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde ise oldukça yaygın stromal doku ve lökosit infiltrasyonu ile çevrelenmiş, daha az bir alanda lokalize non-kompakt tümör dokusu görülmektedir (Şekil 3.61). Ek olarak damar yapıları da oldukça azalmış olarak izlenmiştir. KL21 polih herbal formülasyonu pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesitleri incelendiğinde ise Süramin grubuna benzer şekilde yaygın lökosit infiltrasyonu, stromal doku ile çevrelenmiş az bir bölgede lokalize non-kompakt tümöral doku izlenmektedir. Damar yapıları da oldukça az sayıda görülmektedir (Şekil 3.62). KL21 polih herbal formülasyonu post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesitleri incelendiğinde Süramin ve KL21 pre-implantasyon gruplarına kıyasla tümör dokusu yayılımı ve lokalizasyonu biraz daha fazla gibi görülmektedir. Kontrol grubuna göre tümör dokusu lokalizasyonu ise oldukça azalmıştır. Stromal doku ve lökosit infiltrasyonu miktarı kontrol grubuna göre oldukça yaygın ve tümör dokusunu sınırlamış görülmektedir (Şekil 3.63).



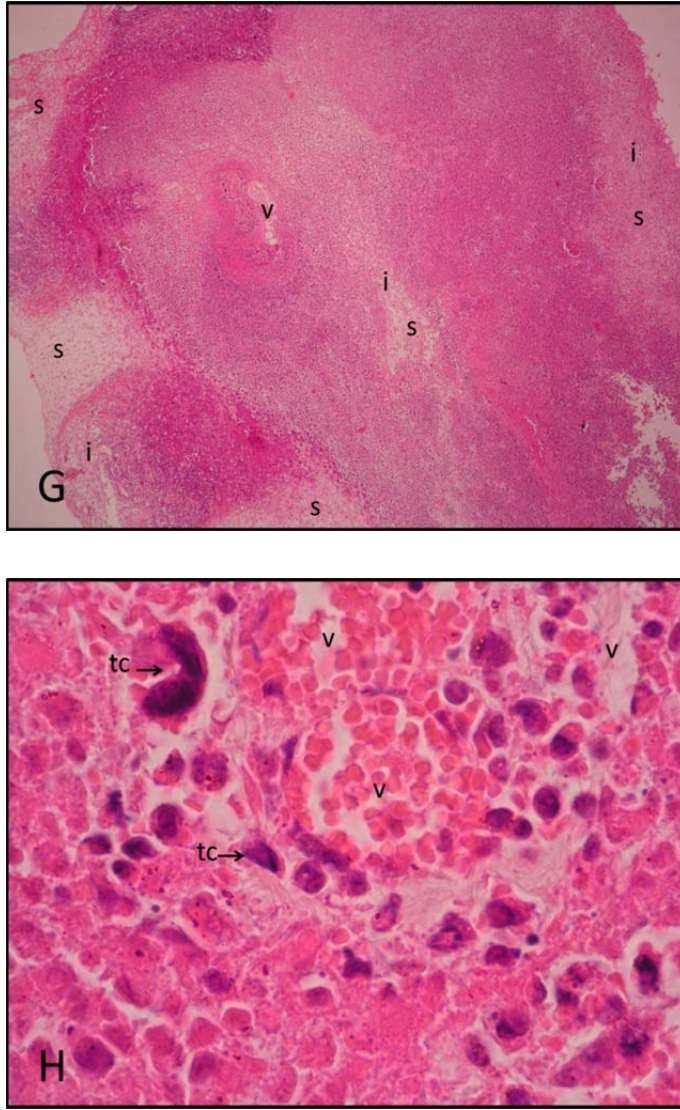
Şekil 3.60 Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça kompaktlaşmış tümör dokusunu saran diğer gruplara göre azalmış stromal dokuda (s) lökosit infiltrasyonu (i) ve çok sayıda hemorajik damar izlenmektedir (v). tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Ax4, Bx100.



Şekil 3.61 Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre azalmış nonkompakt tümör dokusu içerisinde ve etrafındaki stromal doku (s) içerisinde daha az sayıda damar (v) ve yoğun lökosit infiltrasyonu (i) görülmektedir (v). tc: tümör hücresi. Hematoksilen-Eosin boyama; büyütme Cx4, Dx100.



Şekil 3.62 KL21 pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre daha az yaygın kompakt tümör dokusu görülmektedir. Daha az sayıda damar (v) ve artmış lökosit infiltrasyonu (i) görülmektedir. s: stromal doku; tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Ex4, Fx100.



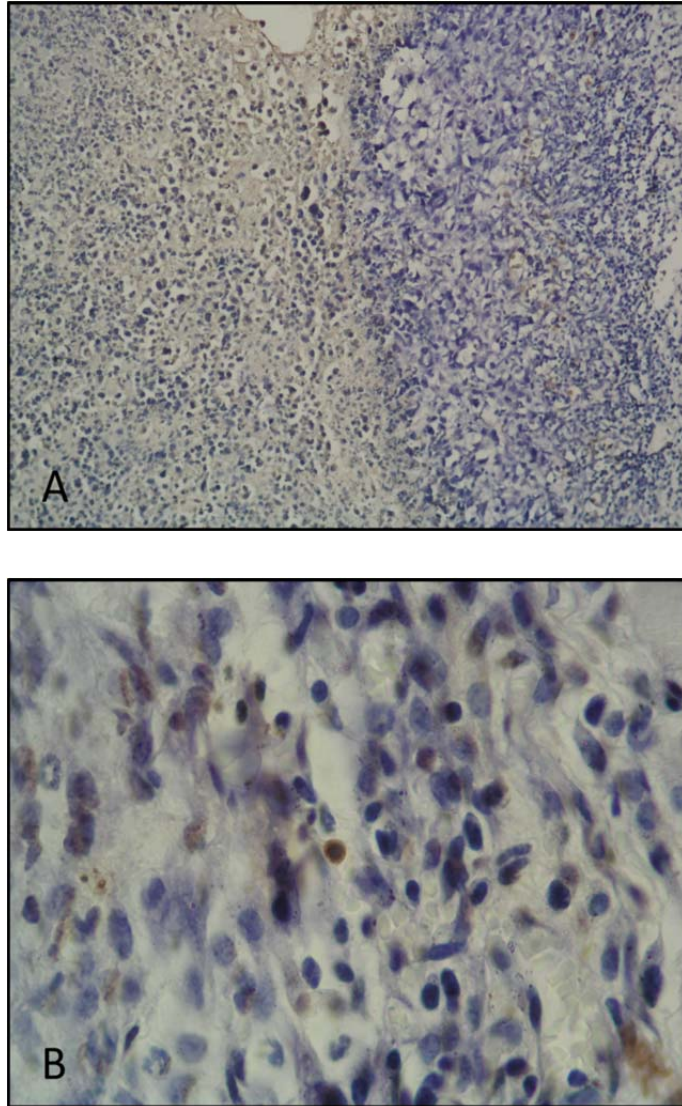
Şekil 3.63 KL21 post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre daha az yaygın kompakt tümör dokusu görülmektedir. Damar (v) ve stromal doku (s) ile çevrilmiş ve artmış lökosit infiltrasyonu (i) görülmektedir. tc: tümör hücresi. Hematoksilen- Eosin boyama; büyütme Gx4, Hx100.

3.4.3.2.2. İmmunohistokimyasal değerlendirme

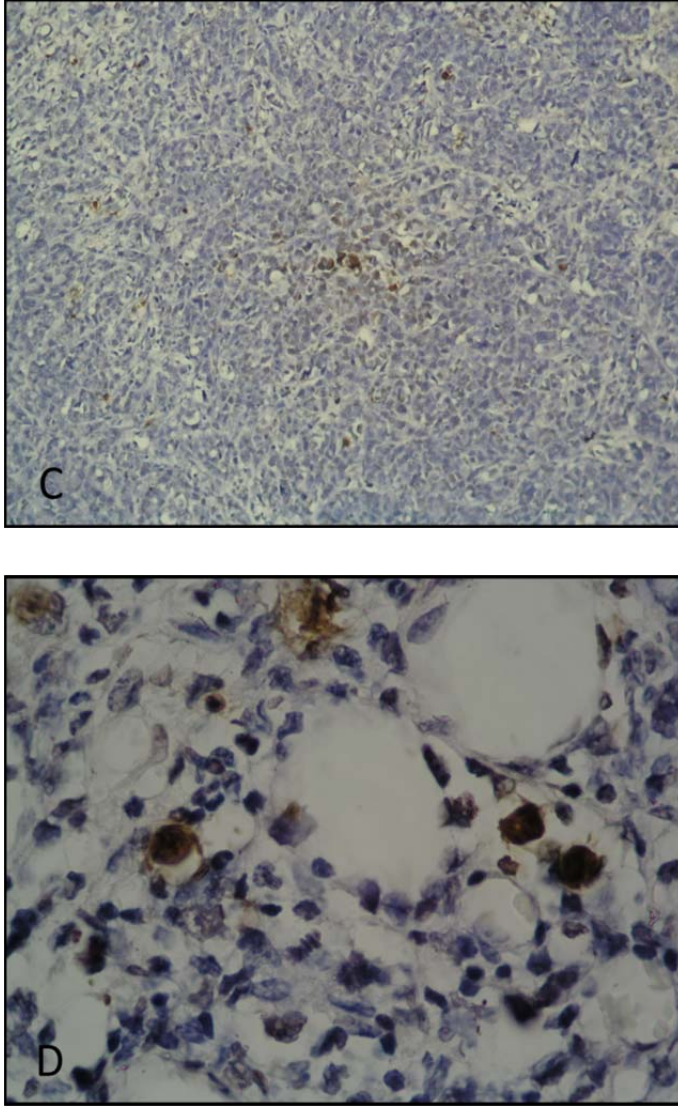
TUNEL ile boyanmış tümör dokusu kesitleri genel apoptotik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre, tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde oldukça az sayıda apoptotik hücrelere rastlanmıştır (Şekil 3.64). Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde ise apoptotik hücreler kontrol grubuna kıyasla oldukça fazla miktarda görülmektedir (Şekil 3.65). KL21 pre-implantasyon ve KL21 post-implantasyon grupları tümör dokuları histolojik kesitleri incelendiğinde ise kontrol grubuna göre daha fazla apoptotik hücrelere rastlanmıştır (Şekil 3.66). KL21 pre ve post-implantasyon grupları kendi

aralarında karşılaştırıldığında ise KL21 pre-implantasyon grubunda daha fazla apoptotik hücreler gözlenmiştir (Şekil 3.67).

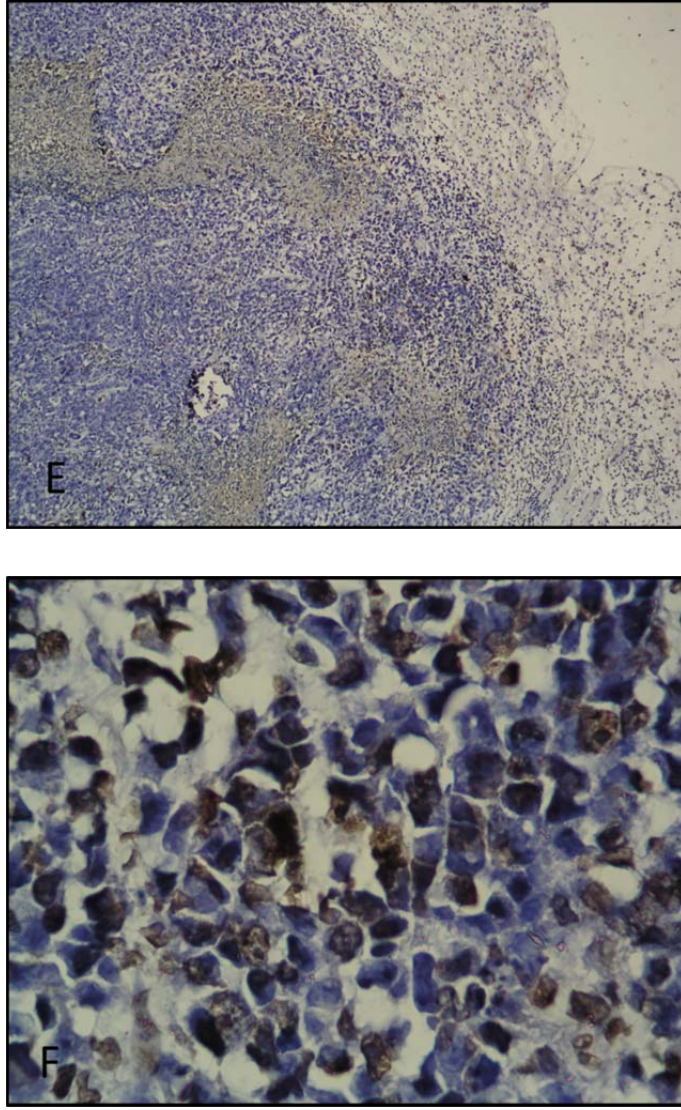
VEGF immunohistokimyasal değerlendirmeler her bir grup için ve gruplar arasında olacak şekilde karşılaştırılmıştır. Buna göre tümör kontrol grubu tümör dokusunda VEGF ekspresyonu oldukça yoğun ve yaygın olarak izlenmiştir (Şekil 3.68). Süramin grubu tümör dokusunda kontrol grubuna göre azalmış VEGF ekspresyonu görülmüştür (Şekil 3.69). KL21 pre-implantasyon grubunda da VEGF ekspresyonu tümör kontrol grubuna göre azalmış olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.70). KL21 post-implantasyon grubunda ise VEGF ekspresyonunun Kontrol grubuna benzer ekspresyonda olduğu izlenmiştir (Şekil 3.71).



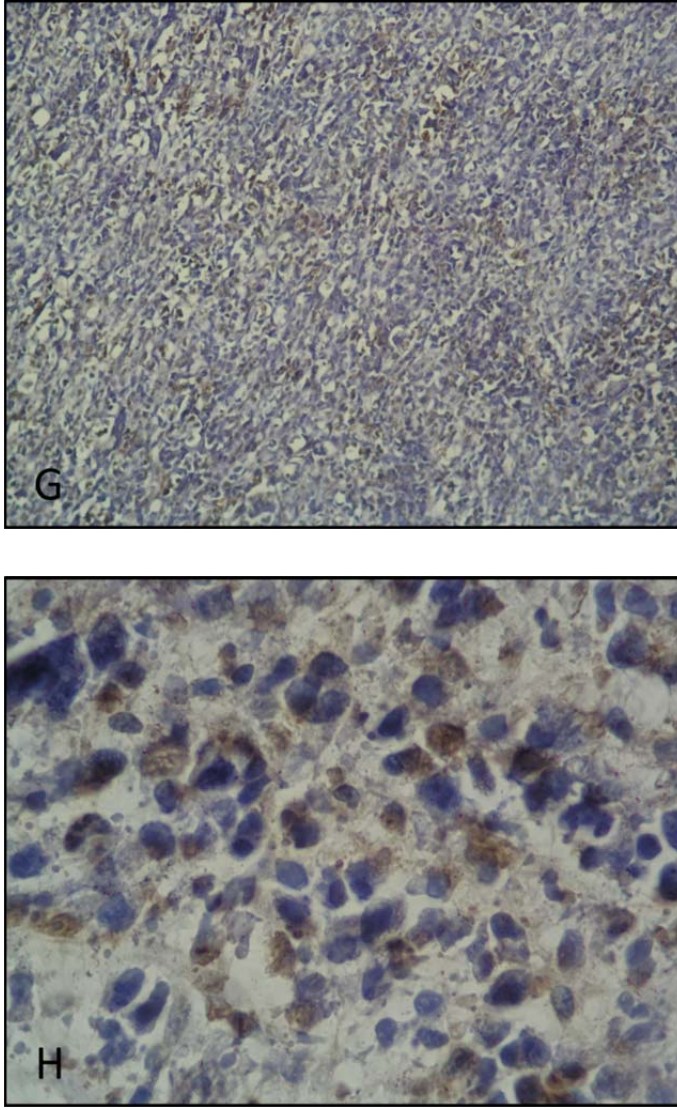
Şekil 3.64 Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça az sayıda apoptotik hücreler görülmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme A x20, B x100.



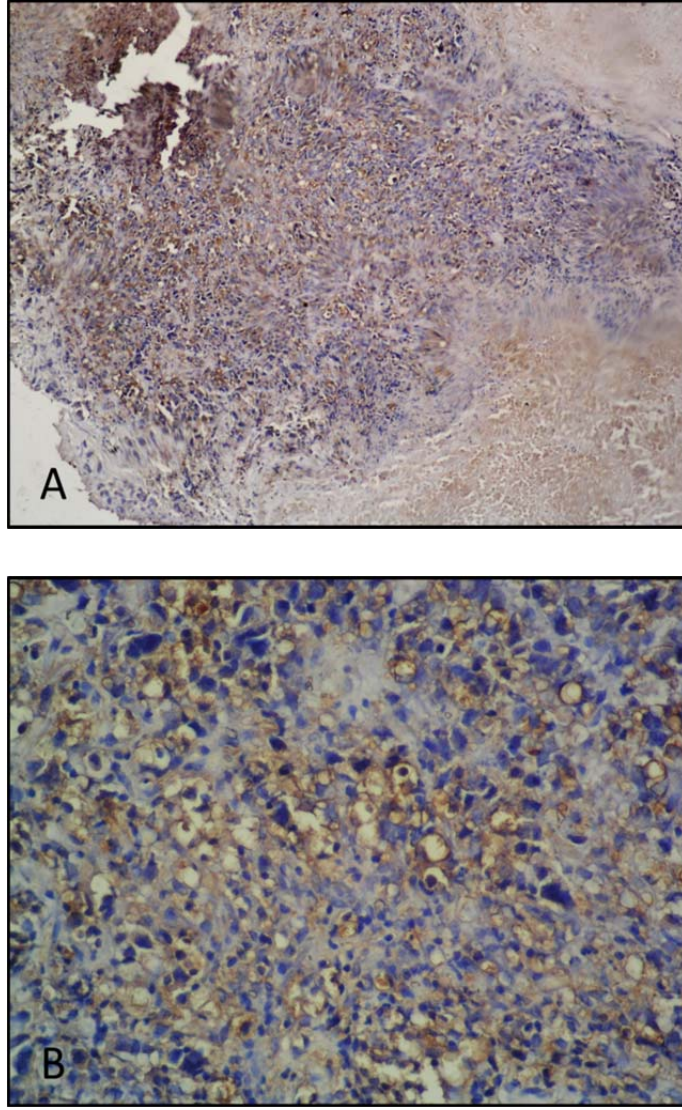
Şekil 3.65 Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler yoğun bir şekilde tümör dokusu içerisinde izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Cx20, Dx100.



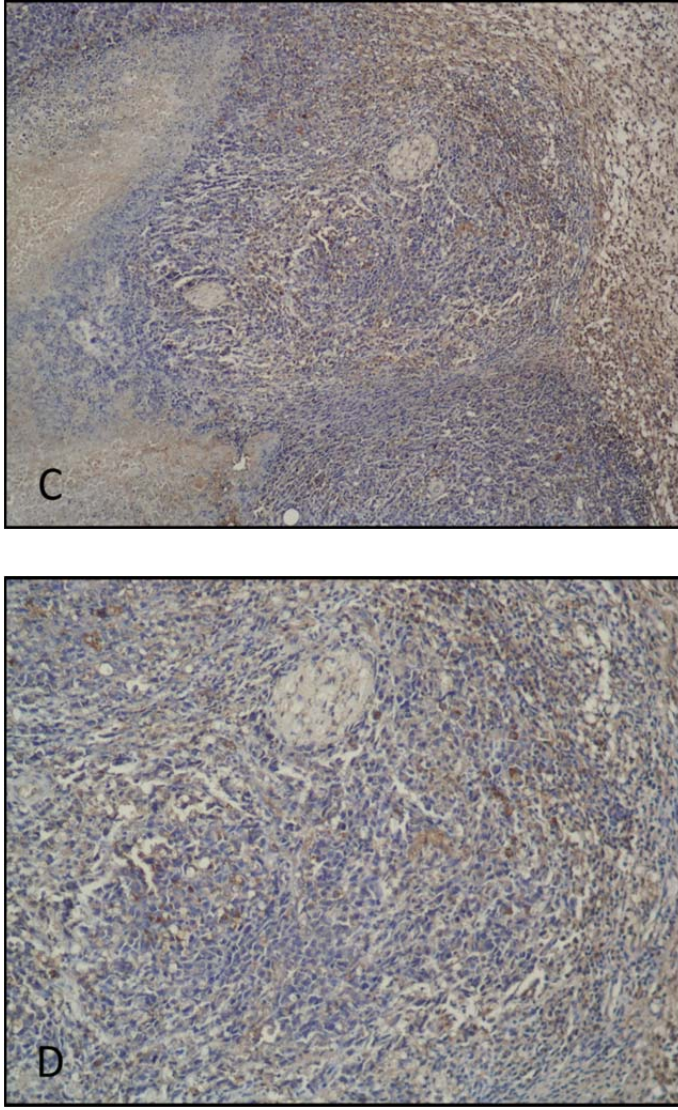
Şekil 3.66 KL21 pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Ex20, Fx100.



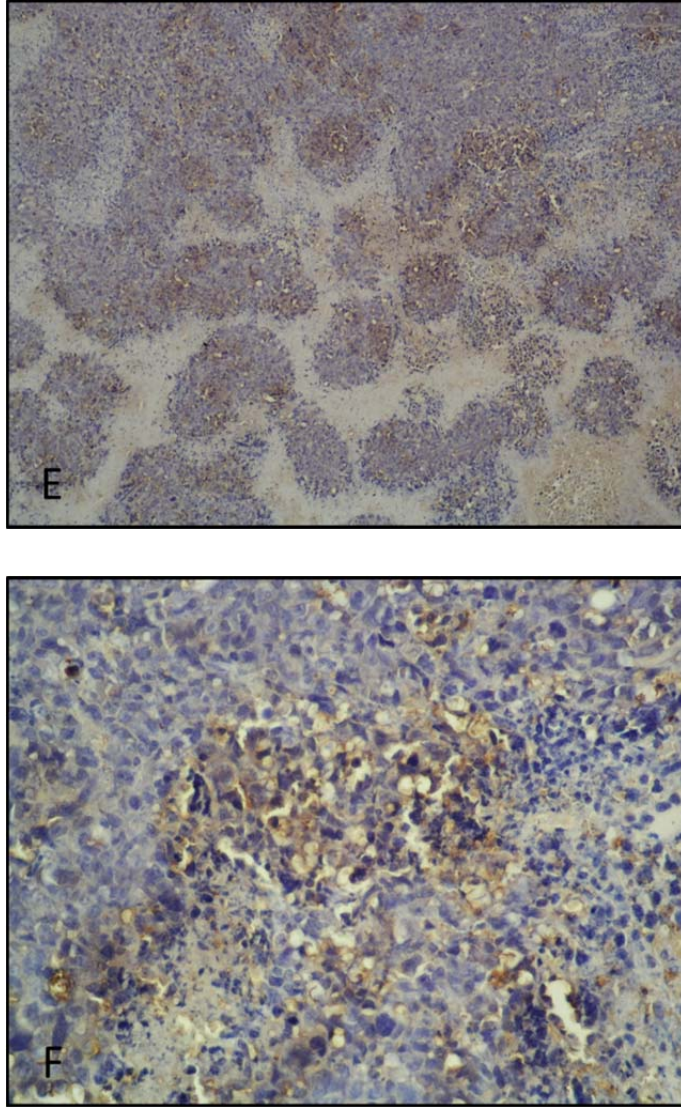
Şekil 3.67 KL21 post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Gx20, Hx100.



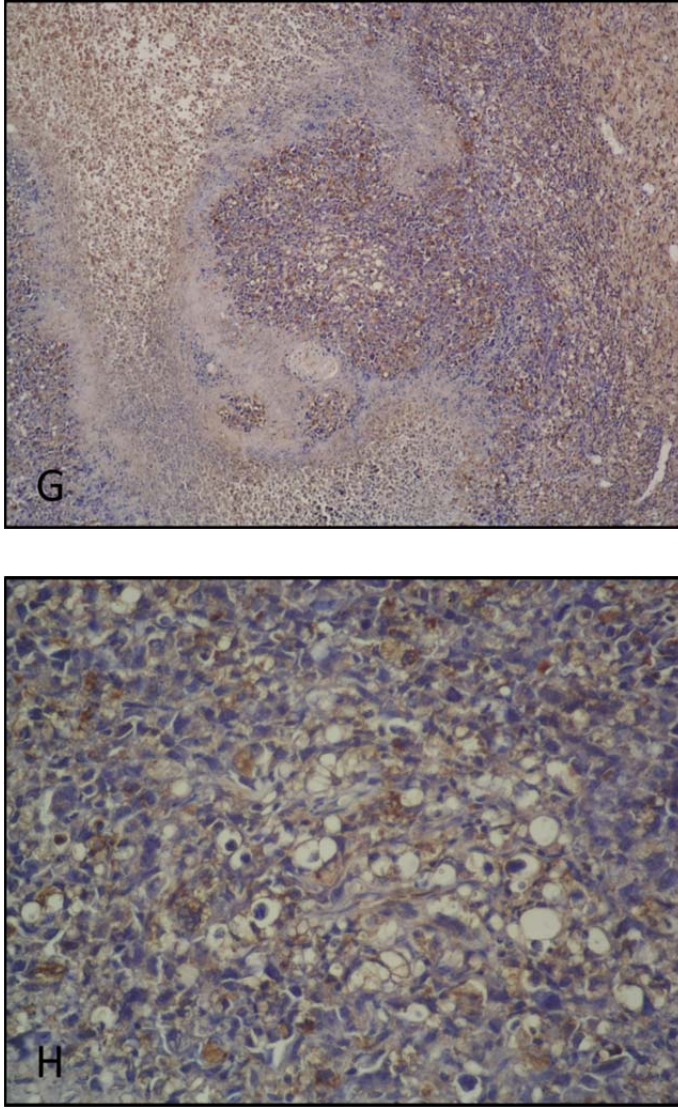
Şekil 3.68 Tümör kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça yoğun ve yaygın VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Ax10, Bx40.



Şekil 3.69 Süramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre azalmış VEGF ekspresyonu görülmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Cx10, Dx20.



Şekil 3.70 KL21 pre-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Ex10, Fx40.



Şekil 3.71 KL21 post-implantasyon grubu tümör dokusu histolojik kesiti. VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Gx10, Hx40.

4. TARTIŞMA

Kullanımları insanlık tarihi kadar eski olan bitkilerden ilaç olarak yararlanan insanların, modern zamanda tıbbi bitkileri tekrar kullanmaya başlamalarında artış gözlemlendiği, bununla birlikte gelişen teknolojinin polih herbal formülasyonların üretimine de gün geçtikçe ivme kazandırdığı görülmektedir. Bunun sebepleri arasında özellikle insan sağlığına olumlu etkileri, hastalıklara hızlı cevap vermeleri, sentetik ilaçlara göre daha az toksik olmaları, nispeten yan etkilerinin azlığı ve kolay elde edilebilirlik gibi pek çok etken bitkilerin kullanımını arttırmaktadır (Chandrasekaran et al., 2010).

Bitki ya da bitki ekstrelerinin karışımından oluşan polih herbal formülasyonlar, aktif bileşikler sayesinde birçok hastalığın destekleyici tedavi ajanı olarak iş görmektedir ve alternatif tıbbi sistem içinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre dünya nüfusunun % 80'i primer insan sağlığı korumasında tıbbi bitkilerin yararlı etkilerine güvenmekte ve hastalıkların tedavisinde kullanmayı tercih etmektedir (Ouedraogo et al., 2012).

Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyonlar, çeşitli kanser türlerinin kaçınılmaz ve konvansiyonel tedavisini oluşturmaktadır. Bu girişimler tümör hücrelerinin yok edilmesinde etkili olsa da, uzun süren tedaviler insan sağlığını farklı yönlerden etkilemekte, yaşam kalitesini düşürmekte hatta çoklu-ilaç direnci gibi tedaviyi zorlaştıran şartları da beraberinde getirmektedir. Bu sorunlar özellikle kanser tedavisine yeni yaklaşımlar ile müdahale edilmesi gerektiğinin kanıtıdır (Kong et al., 2006). Tıbbi bitkilerin destekleyici tedavi ajanı olarak kullanımı; kemoterapi, radyoterapi ve diğer anti kanser girişimlerin etkileri arttırdığı, hatta primer ajan olarak belirli kanser türlerinde direkt kullanılabileceği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Hu et al., 2013; Jeong et al., 2011).

Bütün bitkiler metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bitkilerdeki fenolik bileşikler; fenolik asitler (veya fenol karbonik asitler), flavonoidler ile küçük moleküllü ve çoğunlukla uçucu olan bileşiklerdir (Kaur and Mondal, 2014). Bu moleküller, bitkilere kendilerine özgü tatlarını, kokularını ve renklerini vermelerinin yanı sıra kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri bilinmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalar ile enzimatik aktiviteyi düzenleyici, hücre proliferasyonunu inhibe edici, antibiyotik, antiallerjik, antidiarrheal, antiülseratif ve antiinflamatuvar etki gösterdiklerini belirtmektedir (Bravo, 1998). Bitki fizyolojisinde önemli rolü olan

bu biyoaktif bileşiklerin antioksidan özellikleri sayesinde serbest radikal oluşumunu inhibe ettikleri böylece kemopreventif etki gösterici antikanser ajan olarak metabolizmada rol oynadığını kanıtlanmıştır (Jeon et al., 2001). Bu özellikleri sebebiyle bitkisel türevli bileşikleri her zaman çeşitli hastalıkların tedavisi için önemli bir ilaç kaynağı olmuştur. Bu bileşikler, özellikle tedavisi zor olan kanser gibi hastalıklarda sitotoksik ve antikanser etkileri de kapsayan farmakolojik özelliklerinden ötürü dikkate değer bir öneme sahiptir. Son yıllarda, yeni keşfedilen doğal kaynaklı antikanser ajanlar ise yüksek biyoaktif bileşik içerikleri nedeni ile hedef oluşturmaktadırlar (Rafter, 2002; Gonzales and Valerio, 2006; Nogueira et al., 2008; Kunimasa et al., 2009; Li et al., 2011; Mishara et al., 2011).

Çalışma kapsamında 21 tıbbi bitkinin karışım halinde ekstre edilmesiyle hazırlanan ve standardizasyonu üretici firma tarafından yapılan KL21 polih herbal formülasyonun, kanserde destekleyici tedavi ajanı olarak kullanıma sunulabileceği düşüncesinden yola çıkılarak çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir.

Denemelerin başında spektrofotometrik yöntemle KL21 polih herbal formülasyonun total fenolik ve flavonoid içeriği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile etanol ekstresinin fenolik ve flavonoid içeriğinin metanol ekstresine oranla daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmayı destekleyecek benzer bir çalışma yine “Follin Ciocalteu” metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve anti-inflamatuvar etkisi bulunan polih herbal formülasyonun (Dashang lepa) alkol ekstresinin total fenolik içeriği $15,8 \pm 1,14 \mu\text{g}$, flavonoid içeriği ise $22,4 \pm 2,54 \mu\text{g}$ olarak hesaplanmıştır (Ashish et al., 2014). Analizlerin devamında gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) ile KL21 polih herbal formülasyonunun etanol ve metanol ekstraktlarının içeriğinde yer alan fenolik ve flavonoidlerden bazıları tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin başında her iki ekstrede de ana bileşik olarak tespit edilen karvakrol yer almaktadır. Önemli antibakteriyel ve antifungal özelliğe sahip monoterpenik bir fenol olan karvakrol, etanol ekstresinde % 45,091’lik, metanol ekstresinde ise % 42,414’lük alana sahiptir (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010). Özellikle başlıca esansiyel yağ asitlerinden olan karvakrol’ün 0,15 mg/mL oranında bazı insan hayvan ve bitki patojenlerine karşı etkili olduğu ayrıca gıda katkı maddesi olarak kullanımının yanı sıra kozmetik ürünlerde de yer aldığı bilinmektedir (Liang et al., 2013). Karvakrol’ün anti-tümöral etkisi, insan kolon kanseri (Caco-2) ve metastatik göğüs kanseri hücre (MDA-MB 231) hatları üzerinde ile yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuş (Liana-Ruiz-Cabello et al., 2014) ve tedavi ajanı olarak kullanılması yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Arunasree, 2010). Bir

başka araştırmada ise sıçanlarda deneysel olarak oleik asit ile oluşturulan akciğer hasarına karşı antioksidan özelliği olan ve daha önce akciğer, karaciğer, testis tümörlerinde iyileştirici etkisi gösterilmiş olan Karvakrol'un iyileştirici ve koruyucu etkisi ortaya konmuştur (Önal ve ark., 2011). Formülasyonun etanol ekstresinin % 0,954'nü benzer şekilde metanol ekstresinin ise % 0,974'nü oluşturan Eugenol, kısa hidrokarbon zincirli bir fenol bileşiğidir. Güçlü kokuya sahip olup, gıdalarda baharat olarak kullanılmasının yanı sıra deterjan benzeri etkisinden dolayı diş antiseptiği olarak da kullanılmaktadır (Chang et al 2002; Tai et al., 2002). C57BL/6J fareleri ile yapılan bir çalışmada oral Eugenol uygulamasının anti hiperglisemik etki gösterdiği ortaya konmuş, HepG2 ve primer sıçan hepatositlerinde glukagon indüklü gluoz üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca protein ve gen ekspresyon seviyeleri incelenmiş, CREB, CRTC2-CREB kompleksi, PGC-1 α , PEPCK ve G6Paz'da eugenol etkisi ile baskılanma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda eugenol tip 2 diyabette terapötik ajan olabileceğinin kanıtını olabileceği belirlenmiştir (Jeong, et al., 2014). KL21 polihierbal formülasyonun hem etanol (% 1,495) hem de metanol (% 1,479) ekstresinin içeriğinde benzer miktarlarda yer alan bileşiklerden biri olan ve antioksidan (Ak and Gülçin, 2004), antiinflamatuvar (Kawamori et al., 1999) ve antibakteriyal (Mahady et al., 2002) etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konan alfa-kürkümin'in, MCF-7 (metastatik değil) ve MDA-MB-231 (metastatik) insan göğüs kanseri hücre hatlarında anti kanser etkisi ortaya konmuştur (Ke et al., 2014). Membran lipidlerinin peroksidasyonu ve DNA'da meydana gelen oksidatif hasarlar birçok sağlık problemini beraberinde getirmekte ve dejeneratif hastalıklara sebep olmaktadır. Bu sebeple serbest radikaller nedeniyle meydana gelen oksidatif hasar durumlarında koruyucu etkisiyle kurkumin, iyi bir antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır (Deng et al., 2006). Formülasyonun içeriğinde yer alan fenolik bileşiklerden biri olan alfa asaron, etanol içeriğinde % 8,665'lik alana sahip iken metanol ekstresinde % 6,230'lık alana sahiptir. Alfa asaron'un A-tip GABA reseptörleri ile modüle edilen epilepsiye karşı etkili olduğu ve merkezi sinir sistemi üzerinde anti epileptik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Huang et al., 2013). Ayrıca hayvan denemeleri sonucunda alfa asaronun doğal bir radyoprotektif ajan olduğu böylece genotoksik hasarı önlediği belirlenmiştir (Sandeep and Nair, 2011). Fare beyninin çeşitli bölgelerinde stres ile meydana gelen değişikliklerin incelendiği bir çalışmada, alfa asaron uygulanmış hayvanlarda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH), E ve C vitaminleri ile lipid peroksidasyon seviyeleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ile alfa asaronun antioksidan kapasitesi olduğunu gösterdiği var olan hasarı engellediği bildirilmiştir (Manikandan and Devi, 2005). İnsektisit özelliği olduğu belirlenen alfa asaronun

(Park et al., 2003) nöroprotektif, antioksidan ve antikonvülsan etkisi de yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur (Pages et al., 2011). Formülasyonun etanol ekstresinde daha fazla miktarda yer alan α -Tumeron % 17,721'lik, β -Tumeron ise % 9,143'lük alana sahip iken, metanol ekstresinde α -Tumeron % 11,780'lik, β -Tumeron ise % 6,398'lik alana sahiptir. İçerikte yer alan α -Tumeron ve β -Tumeron'un *Listeria monocytogenes*'in 5 suşu ile yapılan antimikrobiyal aktivite teslerinde, bu maddelerin anti-listerial etkisi tespit edilmiş ve DPPH analizi ile antioksidan kapasitesi belirlenmiştir (Al-Reza et al., 2009). Linolenik asit, metanol ekstresinde % 17,807'lik alana sahip iken ve etanol ekstresinin içeriğinde % 10,259'lik alan ile daha az bulunmaktadır. Linolenik asit, poliansatüre bir yağ asidi olup insanlar için esansiyeldir. Vücutta sentez edilmeyen ve dışarıdan alınması gereken linolenik asit, omega-3 grubunda kabul edilir. Epidemiyolojik çalışmalar yeterli olmasa da özellikle linolenik asit ağırlıklı beslenen kadınlarda göğüs kanserine karşı koruma sağlandığı bildirilmiştir (Klein et al., 2000). İnsan K532/ADM çoklu ilaç dirençli lösemi hücre hattı (multidrug-resistant leukemic cell line) üzerinde yapılan MTT hücre kültürü test sonuçlarına göre linolenik asitin bu hücre hattında artan Kaspaz-3 aktivitesine bağlı olarak etkinlik gösterdiği ortaya konmuştur (Kong et al., 2006). Bitki ve hayvanlarda bulunan doymuş yağ asidi grubunun 16 karbonlu üyesi olan ve etanol ekstresinde % 6,056 metanol ekstresinde ise % 12,409 alana sahip olan heksadekanoik asitin antimikrobiyal ve sporosidal aktivitesi çeşitli araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır (Tardy-Laporte et al., 2013; Lekogo et al., 2010). Formülasyonun etanol ekstresinin % 0,615'ini metanol ekstresinin % 0,508'ni oluşturan β -Sesquifelandren, *Zingiber officinale Roscoe* ile yapılan çalışmada bitkinin antioksidan kapasitesinin bu fenolik bileşikten kaynaklandığı ortaya konmuştur (Yeh et al., 2014).

KL21 polih herbal formülasyonun biyolojik aktivitesini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen analizlerin başında antioksidan aktivitenin belirlenmesi gelmektedir. Bu kapsamda DPPH radikalini süpürme kapasitesi ve ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi kullanılmıştır. DPPH yöntemine elde edilen sonuçlar en aktif ekstrenin 36,89 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda α -tokoferolün yaptığı antioksidan aktiviteye eşdeğer bir etkinlik ile metanol ekstresi olduğunu ortaya koymaktadır. DPPH yöntemi antioksidan özellikteki maddeden DPPH kompleksine hidrojen ve elektron transferi aracılığı ile olmaktadır ve radikal süpürücü (radical scavenging) etki olarak açıklanmaktadır. Bu transfer değişik redoks potansiyellerine ve antioksidan özellik gösteren moleküllerin kimyasal yapısına bağlıdır. DPPH süpürücü aktivite, flavonid ve fenolik bileşikler için daha uygun bir yöntemdir (Awika et al., 2003). ABTS yönteminin sonucunda ise her iki ekstre de benzer aktivite göstermişlerdir. ABTS yönteminde ise antioksidan

özellik gösteren maddelerin 734 nm’ de oluşan katyonun rengini açma (bleaching) özelliğine göre bir değerlendirme yapılmaktadır. Bazı bileşikler için katyonun rengini ağartma çok uzun zaman alabilir. DPPH organik fazda özellikle etanolde çözünürken ABTS hem sulu hem de organik fazda çözünebilmektedir. ABTS yönteminde antioksidan aktivite örneklerde bulunan hidrofilik ve lipofilik karakterli bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmektedir. Awika ve çalışma grubu ABTS ve DPPH arasında bir korelasyon olduğunu savunurken, Wang ve çalışma ark. (2007) Moktan ve çalışma ark. (2008) ve Zhu ve çalışma ark. (2008) her iki yöntem arasında bir korelasyon olmadığını göstermişler ve ABTS yöntemine göre aktivite gösteren bileşiklerin DPPH yönteminde aktivite göstermediğini bildirmişlerdir. Polih herbal formülasyonlar ile yapılan birçok çalışma bu tür formülasyonların antioksidan kapasitesini ortaya koymaktadır. Yoğun antioksidan aktiviteye sahip olan bu formülasyonlar, özellikle destekleyici tedavide sentetik ilaçların yol açtığı yan etkiyi gidermede başlıca tercih sebebidir. (Cecchini et al., 2014; Chamundeeswari et al., 2006).

KL21 polih herbal formülasyonda bulunan bitkilerin yoğun fenolik ve flavonoid bileşikler içermesinden dolayı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışma ile desteklenmiştir. Formülasyonun metanol ekstresinin, etanol ekstresine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Benzer şekilde birçok polih herbal formülasyonun bu etkiyi gösterdiği araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Rajasree et al., 2012; Bhengraja et al., 2008; Vuuren and Naidoo, 2010). 39 adet bitkiden oluşan bir karışımın metanol ekstresinin *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecium*’u inhibe ettiği minimum dozu belirlemek amacıyla MIC denemeleri yapılmış, 0,08-0,5 mg/mL dozlarda antibakteriyel etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (Salvat et al., 2004). Hindistan tıbbi bitkileri arasında yer alan *H. tiliaceus*, *N. arbortristis*, *S. rhombifolia* ve *T. procumbens* ile yapılan çalışmalar sonucunda bu bitkilerin metanolik ekstrelerinin antifungal aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Vadlapudi, 2012). Bir başka çalışmada ise *Cinnamomum verum*’un metanol ekstresinin 0,5-2 mg/mL dozlarda antifungal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Mariappan et al., 2013). *Albizia lebbbeck*, *Cyprus rotandus* ve *Solanum xanthocarpum*’dan oluşan bir polih herbal formülasyon ile yapılan antimikrobiyal aktivite denemeleri sonucunda etanol ekstresinin gram negatif, gram pozitif bakteriler ile *Candida* suşları üzerinde etkili bulunmuştur. En etkili suşlar, *Pseudomonas aeruginosa* (16 mg/mL) and *Candida parapsilosis* (15 mg/mL) iken, antimikrobiyal etkinin en az tespit ettiği suş, *Staphylococcus aureus* (6,25 mg/mL) olarak belirlenmiştir (Kajaria et al., 2012). Diğer bir çalışmada ise

Artemisia afra, *Agathosma betulina*, *Eucalyptus globulus* ve *Osmitopsis asteriscoides*'ten oluşan 4 tıbbi bitkinin yer aldığı polih herbal formülasyonda *Enterococcus faecalis*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Cryptococcus neoformans* mikroorganizmaları ile çalışılmış ve etkinlik tespit edilmiştir (Suliman et al., 2010).

KL21 polih herbal formülasyonunun içerik analizleri ile biyolojik aktivite analizlerinin sonuçları değerlendirildiğinde, içeriğinde nispeten daha az fenolik ve flavonoid bileşik tespit edilen metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi, etanol ekstresine göre daha yüksek tespit edilmiştir. GC-MS cihazı ile gerçekleştirilen içerik analizinden elde edilen sonuçlar ile bu durum açıklanabilmektedir. Her iki ekstrede yapılarında benzer fenolik ve flavanoid bileşikleri bulundurmakla birlikte, metanol ekstresinde tespit edilen linolenik asit miktarı daha fazladır. Bu durum metanol ekstresinin mikroorganizmalar üzerinde daha fazla etkili olduğunun kanıtını oluşturmaktadır. Linolenik asitin antimikrobiyal etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Sado-Kamdem et al., 2009; Cao et al., 2014). Benzer şekilde linolenik asitin siyanobakteriler ve mikroalgler üzerine de inhibisyon etkisi tespit edilmiştir (Guedes et al., 2011).

In vitro toksisite denemelerinin başında KL21 polih herbal formülasyonun sitotoksik etkisi ve IC_{50} değeri belirlenmiş, morfolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ortamında, canlı hücrelerin oranın kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanması amacıyla MTT testi uygulanmıştır. Bu çalışma kapsamında MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı), A549 (İnsan Akciğer karsinom hücre hattı), CaCo-2 (İnsan kolon kolektoral adenokarsinom hücre hattı), HEK-293 (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı) ve HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı) hücreleri kullanılmıştır. Gerçekleştirdiğimiz MTT testi sonucuna göre KL21 polih herbal formülasyonunun etanol ekstresinin MCF-7, He-La ve HEK-293 hücre çoğalmalarını inhibe ettiği belirlenmiş ve sırasıyla IC_{50} değerleri 92,09, 44 ve 95,47 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Metanol ekstresinde ise HEK-293 hücre hattında IC_{50} değeri 46 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlarla, her iki ekstrenin de orta seviyede sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir (Meng and Hanrahan, 2013; Suryavanshi et al., 2014). HEK-293 ve COS-7 hücre hatları ile *Aristolochia* türlerinden oluşan ve Çin tıbbında antikanser ajanı olarak kullanılan bitkisel karışımın sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 48 saat IC_{50} değeri COS-7 hücre hattı için 78 μM , HEK-293 hücre hattı için ise 70 μM olarak elde edilmiştir (Li et al., 2014). Etanol ekstresinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saatlik

maruziyet sonucunda sitotoksik etki göstermiş ve elde edilen IC₅₀ değeri 92,09 µg/mL olarak hesaplanmıştır. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler, özellikle *in vivo* deneylere temel oluşturacağından oldukça önem teşkil etmektedir. Ayrıca sitotoksikite çalışmalarından elde edilen veriler ışığında KL21 polih herbal formülasyonu ile etkileşim içerisinde olan kanser ve normal hücre hatları seçilmiş ve insan apoptoz paneli çalışılmıştır.

Genotoksik etkiyi kısa zamanda belirlemek için uygulanan *Salmonella*/memeli mikrozom testi (Ames testi) *in vitro* çalışmalarımızın diğer basamağını oluşturmuştur. Mutasyona uğrayan bir hücreye diğer bir mutasyon ya da geri mutasyon uygulaması yapılarak hücrenin orijinal haline benzer bir duruma getirilmesi temeline dayanan AMES testi kapsamında, *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılmış ve KL21 polih herbal formülasyonunun kullanımının güvenli olduğu ortaya konmuştur. Benzer şekilde geleneksel Hindistan tıbbında sıklıkla kullanılan bitkilerden oluşan ve veteriner alanında uygulanmak üzere geliştirilen bir polih herbal formülasyon ile yapılan çalışmalar sonucunda formülasyonun, yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmış, sitotoksikite ve Ames testleri sonuçlarına göre de güvenli kullanımı olduğu ortaya konmuştur (Chandrasekaran et al., 2010). Bir başka çalışmada ise *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları ile birlikte *Escherichia coli* WP2 uvrA suşu kullanılmış, deneme -S9'lu ve +S9'suz gerçekleştirilmiştir. Ames testi sonucunda revertant koloni sayısında herhangi bir artış tespit edilmemiş ve polih herbal formülasyonun mutajenik etki göstermediği bildirilmiştir (Chaudhary and Payasi, 2013). Mahwangyounpae-tang isimli 22 adet bitki karışımından oluşan polih herbal formülasyon, geleneksel Kore tıbbında, astım gibi özellikle solunum yolları hastalıklarında uzun yıllardır bilinmekte ve kullanılmaktadır. Formülasyon üzerinde Ames, kromozom aberasyon ve fare mikronükleus testi gibi analizler gerçekleştirilmiş ve ürünün genotoksik olmadığı ortaya konmuştur. Ames testi kapsamında *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılmış ve KL21 polih herbal formülasyonuna benzer şekilde en yüksek konsantrasyon 5000 µg/mL olarak belirlenmiştir (Seo et al., 2008).

Çalışmamızda *in vivo* toksisite denemelerinin başında oral akut toksisite testi gerçekleştirilmiş ve subakut toksisite için doz aralıklarını tespit etmek amacıyla akut toksisite testi gerçekleştirilmiştir. Bilindiği gibi kimyasal veya biyolojik kaynaklı birçok madde uygun yol ve uygun dozda canlı organizmaya verildiğinde zararlı etki meydana getirme kapasitesine sahiptir. Tıbbi bitkisel ürün kapsamında destekleyici ajan olarak kullanılacak formülasyonunun, vücuda

alındıktan sonra bir etki meydana getirebilmesi için absorbe olması ve belirli bir zaman diliminin geçmesi gerekmektedir. EPA (Environmental Protection Agency)'ya göre bir maddenin toksik özelliğinin belirlenmesinde deney hayvanlarının % 50'sini öldüren dozun bulunması yoluyla akut toksisitesinin ölçülmesi ilk basamağı oluşturmaktadır. Bu amaçla standarda göre 5 hayvan kullanılmış ve en yüksek doz olan 2000 mg/kg uygulaması ile akut toksisite denemesi gerçekleştirilmiş ve 48 saat sonunda herhangi bir ölüm tespit edilmemiştir. Benzer şekilde esansiyel metionin amino asidi yönünden zengin bir polih herbal formülasyonun (Methiorep Premix) OECD Guideline No: 423' e göre akut toksisite çalışması 3 dişi, 3 erkek albino sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. 175, 550, 2000 mg/kg dozlarda oral uygulama yapılmış, 14 gün boyunca hayvanlar kasılma, titreme, depresyon ve diğer davranış değişiklikleri ile birlikte mortalite bakımından gözlem altında tutulmuşlardır ve uygulamaya bağlı ölüm yaşanmamakla birlikte hayvanların davranışlarında da herhangi bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca çalışma kapsamında vücut ağırlığında bir değişim gözlenmezken, plazma toplam proteini, albümin, AST ve ALT gibi değerleri de kontrol grubuna kıyasla farklılık tespit edilmemiştir (Rajurker et al., 2009). Diyabet, karaciğer hasarlarında, romatizma ve romatoid artrit gibi rahatsızlıklarda tedavi amacıyla kullanılan bir polih herbal formülasyonun (Baker Cleanser Bitters) akut toksisite çalışması, albino sıçanlar üzerinde 2000 mg/kg dozda gerçekleştirilmiş, uygulama sonrası ölüm gözlenmediği için formülasyonun kullanımı güvenli olarak bildirilmiştir (Patrick-Iwuanyanwu et al., 2012). Bir başka çalışmada ise veterinerlik alanın kullanılan polih herbal formülasyonun akut toksisite çalışması wistar sıçanlar üzerinde 2000 mg/kg ve 5000 mg/kg dozlarda oral olarak uygulanmış ve en yüksek dozda bile mortalite tespit edilmemiştir (Joshua et al., 2008). Karaciğer koruyucu (hepatoprotektif) etkisi bilinen, 4 tıbbi bitkinin karışımından oluşan ve ticari ismi Zigbir® olan polih herbal formülasyon ile OECD Guideline No: 420'ye göre akut toksisite çalışması kapsamında 2000 mg/kg tek doz uygulaması yapılmış ve çalışmanın hayvanlarda herhangi bir değişiklik gözlenmeden sonlandığı bildirilmiştir (Allan et al., 2012).

Subakut toksisite denemesi kapsamında KL21 polih herbal formülasyonun uzun süreli uygulamasını gerektiren toksisite çalışması gerçekleştirilmiştir. OECD Guideline No: 407 standardı doğrultusunda çalışmada hayvanlar cinsiyetleri göre dişi ve erkek olacak şekilde 2, dozlara göre ise 300 mg/kg, 600 mg/kg, 900 mg/kg ve kontrol grubu olacak şekilde 4 gruba ayrılmışlardır. Toksisite denemelerinde, organ ağırlıkları ve rölatif organ ağırlıkları (organ ağırlığı/total vücut ağırlığı), organ toksisitesini değerlendirmede kullanılan önemli kriterlerdendir (Timbrell, 2000; Crissman et al., 2004). Gelişimsel toksikolojide, doğum öncesi ve doğum

sonrasında organizmanın maruz kaldığı kimyasal veya fiziksel ajanların yaşam boyunca organizma gelişimi üzerindeki yan etkileri incelenmektedir. Genelde kanser riski hesaplamalarında ömür boyunca maruzat (kronik toksisite) için ortalama dozlar kullanılmaktadır. Bazı durumlarda ise (kısa fakat yüksek seviyede maruzat) kısa süreli maruzat sınırlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Gelişimsel toksisitede bu şekilde kısa süreli ya da tek doz maruzat, gelişimsel yan etkiler oluşturmaya yeterlidir (EPA, 1991). Deneme sonunda, KL21 polih herbal formülasyonun farklı dozları uygulanan farelerin final total vücut ağırlıkları, kontrole oranla ve başlangıç ağırlıklarına oranla herhangi değişiklik göstermemiştir. Yine tüm uygulama gruplarında bulunan fareler, iç organ ağırlıkları bakımından ve rölatif karaciğer ağırlığı bakımından da kontrol grubuna göre ve kendi aralarında herhangi bir önemli farklılık göstermemiştir. Benzer şekilde subakut toksisite çalışması yapılan *Ocimum gratissimum*, *Citrullus lanatus*, *Momordica charantia*, *Chrysophyllum delevoiyi* ve *Uncaria tomentosa* türlerinden oluşan bitkisel, antidiyabetik formülasyonun 28 gün uygulamasının ardından hayvanların ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe rastlanmadığı tespit edilmiştir (Ogbonnia et al., 2013).

Çalışmamızda hematolojik ve biyokimyasal parametreler incelenmiş ve bu değerlerde formülasyon uygulamasına bağlı herhangi bir değişiklik olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu kapsamda başlangıçta kuyruk veninden alınan kanlar ile çalışma tamamlandığında kalpten alınan kanlar karşılaştırılmış ve KL21 polih herbal formülasyon uygulamasının neden olabileceği değişiklikler değerlendirilmiştir. Vetscan VS2 cihazı ile yapılan biyokimyasal analizlerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda dişi farelerde başlangıç ölçüm değerleri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. 300 mg/kg doz grubunda yer alan dişi farelerin bitiş parametrelerinden iyon, metabolit, ilaçları bağlayan ve kanser gibi pek çok hastalıkta değeri düşen albüminde kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Özellikle endokrin ve metabolik bozuklukların değerlendirilmesinde kullanılan, kemik kanser metastazı gibi durumlarda düzeyi artan kalsiyum; fagosit ve salgı yapma özelliği olan bazofil değerleri incelendiğinde, 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz grubunda yer alan farelerin kontrol grubuna kıyasla azaldığı, kolesterol değerlerinin ise arttığı belirlenmiştir. Ayrıca dişi farelerde bitiş değerleri başlangıç ile karşılaştırıldığında, 300 mg/kg doz grubunda total protein miktarında artış olduğu; 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz gruplarında ise albümin ve kolesterolün azaldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde erkek farelerde başlangıç ölçüm değerleri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. 900 mg/kg doz grubunda yer alan erkek farelerin bitiş parametrelerinden bazofil

değerinde azalma, 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz grubunda yer alan farelerin kolestrol değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılık, artış olarak tespit edilmiştir. Ayrıca biyokimya başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki karşılaştırmaya göre, erkek farelerde kontrol grubunda total protein, 300 mg/kg doz grubunda soydum, 600 mg/kg ve 900 mg/kg doz gruplarında ise kolestrolün artış gösterişi istatistiksel açıdan tespit edilmiştir. Genel olarak KL21 uygulamasına bağlı en büyük değişiklik kolestrol parametresinde artış olarak saptanmıştır. Bu durum 28 gün boyunca hayvanlara oral uygulamanın yol açtığı stresten kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan biyokimyasal parametreler kapsamında kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta tarafından oluşturulan alkalen fosfataz; karaciğer fonksiyon parametrelerinden biri olan alanin aminotransferaz; karaciğer ve safra kesesi fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan ve bazı metabolik hastalıklar ile kanda değerleri yükselabilen total bilirubin incelenmiştir. Diğer parametreler arasında pankreas fonksiyon parametrelerinden biri olan amilaz; ayrıca protein katabolizmasının başlıca azot içeren metabolik ürünü olan üre, kalsiyum-fosfor metabolizma dengesinin değerlendirmesinde kullanılan fosfor değerlerine bakılmıştır. Böbrek fonksiyonlarının sağlıklı çalışması hakkında bilgi veren kreatinin, karbohidrat metabolizmasının değerlendirmesinde kullanılan glikoz; elektrolit ve su dengesinin değerlendirilmesinde kullanılan sodyum, elektrolit ve asit-baz dengesinin değerlendirilmesi ile böbrek fonksiyonlarının takibinde kullanılan potasyum miktarları incelenmiştir (Akay 2001). Bu parametrelerde KL21 polih herbal uygulamasına bağlı herhangi bir değişiklik tespit edilmezken, benzer şekilde 8 bitki karışımından oluşan bir polih herbal formülasyon ile parasetamol indüklü karaciğer toksisite oluşturulmuş ve karaciğer enzimleri ile lipid profili incelenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında AST, ALT, ALP (U/L) ile bilirubin ve kolestrol değerleri aynı çıkan çalışmada, bir çok bitki karışımından oluşan formülasyonun karaciğer koruyucu etkisini ortaya konmuştur (Saroj et al., 2012). Bir başka çalışmadan ise karbontetraklorür indüklü hepatotoksisite (CCl₄) oluşturulmuş albino sıçanlara *Berberis aristata*, *Cordia myxa*, *Curculigo orchioides*, *Elettaria cardamomum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Piper longum*, *Thespesia populnea* ve *Zingiber officinale*'den oluşan polih herbal formülasyon (Kamilari) 2 ay boyunca en yüksek doz 3000 mg/kg olacak şekilde uygulanmıştır. Formülasyonun koruyucu etkisini belirleme amacıyla AST, ALT, ALP, bilirubin, protein ve kolesterol miktarları ölçülmüştür. Sonuç olarak 750 mg/kg dozda CCl₄ indüklü toksik etkinin azaldığı tespit edilmiştir (Rajesh and Latha, 2004). Doğu Hindistan'da antioksidan özelliği bilinen polih herbal formülasyonun güvenli kullanımına ilişkin yapılan klinik araştırmada, uygulama tamamlanana kadar herhangi bir yan etki tespit edilmemiştir. Bununla birlikte çalışma kapsamında

gönüllerin biyokimyasal ve hematolojik taramaları gerçekleştirilmiştir. 22 dişiden oluşan kontrol gönüllü grubu ile kıyaslandığında hemoglobin, lökosit, nötrofil, lenfosit, eozinofil, bazofil ve monosit miktarları bakımından herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Hasta grubu 89 gönüllüden oluşan çalışmada karaciğer fonksiyon testleri kapsamında total serum proteini, albümin, globülin, aspartat aminotransferaz ve alkanin aminotransferaz parametreleri ile birlikte böbrek fonksiyon testleri ve lipit profili kontrol grubu değerleri ile aynı oranlar tespit edilmiştir (Banerjee et al., 2011). Çalışma sonucunda elde edilen biyokimyasal değerler, KL21 polih herbal formülasyonun güvenli kullanımı hakkında bilgi vermektedir.

Canlının metabolizma gereksinimlerinin karşılanması, vücudun iç kısımlarında hücre ve dokuların besin, su ve oksijen ihtiyacının giderilmesi zorunludur. Özelleşmiş bir sıvı olan kan, kan dokusunu oluşturan çeşitli hücreler yardımı ile canlının oksijen ve karbondioksit alışverişinin yanı sıra bağışıklık sistemini desteklemede ve çeşitli patojenlerle mücadelesinde önemli yer tutmaktadır. “Tam Kan Sayımı” diğer bir deyişle hemogram testi ile genel sağlık durumu tespit edilebilmektedir. Subakut toksisite testine başlamadan önce gruplara ayrılan dişi ve erkek farelerin Vetscan HM 5 cihazı kullanılarak 15 kan parametresi incelenmiştir. Bu kapsamda incelenen değerlerden biri, beyaz kan hücreleri olan lökositler (akyuvar), hemoglobin taşımadıkları için renksiz olmalarının yanı sıra kemik iliğinde üretilirler ve vücut savunmasında görevlidirler. Kanda 5 çeşit olarak bulunan lökositler; nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfosit ve monosit olarak ayrılırlar. Özellikle sindirim sırasında ve aktif hareketten sonra sayısı artan lökositlerin, patolojik durumlarda da sayısı artabilir (lökositoz) ya da azalabilir (lökopeni). Kırmızı kan hücreleri olan eritrositler, ağır egzersiz ve yüksek rakımda sayıları artarken düşük olması kansızlık (anemi) veya kan kaybını göstermektedir. Diğer bir parametre olan hemoglobin ise kanda var olan oksijenle birleşmiş alyuvarlardır. Anemi, kan kaybı, polistemi (eritrosit sayısının normalden fazla olması) v.b. durumların değerlendirilmesinde kullanılır. Kandaki hemoglobin ve eritrosit miktarını gösteren hematokrit, bir başka ifadeyle kanın şekilli elemanlarının tüm kana oranıdır. Anemi ve kan kaybı gibi durumlarda miktarı azalır. Buna karşılık vücut su kaybederse ya da yüksek rakımda hematokrit miktarı artar. İncelenen diğer bir parametre eritrositlerin ortalama büyüklüğü olan MCV, tam kan sayımında önemli olan bir bulgudur ve kırmızı kan hücrelerinin çapı anlamına gelir. Eritrosit hemoglobin konsantrasyonunun yüzde olarak ifadesi, hemoglobin miktarı ve eritrositlerin dağılım genişliği de incelenen diğer parametreler arasındadır. Pıhtılaşmayı önleyen trombositler ile trombositlerin ortalama büyüklüğü ve dağılım genişliği

de koagülasyon sistemi ve hemostaz bozukluklarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Demir eksikliği anemisi ve akut enfeksiyonlarında trombosit sayısı artarken lösemiler, bazı enfeksiyonlar ve kemik iliğinin baskılanması ile trombosit sayısı düşmektedir (Akay T., 2001).

Dişi ve erkek farelerin kuyruk veninden alınan kan örnekleri incelendiğinde başlangıç ve bitiş parametrelerinin gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık göstermediği tespit edilmiştir. 28 gün KL21 polih herbal formülasyon uygulamasının, fareler üzerinde sağlık problemlerine yol açmadığı aksine bağışıklık sistemini destekleyici etkisi olduğu yapılan hemogram testi ile desteklenmiştir. Polih herbal terapiler, farmakolojik ürünlerin etkilerini sinerjik, kuvvetlendirici, agonistik veya antagonistik olarak değiştirebilecekleri gibi birlikte çalışarak terapötik etkinliği arttırmada dinamik bir rol oynarlar (Tiwari and Rao, 2002). Göğüs kanseri tedavisinde etkili olan 9 bitkiden oluşan bir polih herbal formülasyon (Joloo), subkronik toksisite çalışması kapsamında gruplara ayrılan farelere 400, 800 ve 1600 mg/kg dozlarda oral olarak uygulanmıştır. Çalışma tamamlandığında vücut, rölatif organ ağırlıkları, hematoloji, biyokimyasal parametreleri ile antioksidan aktivitesi ve histolojik değişiklikleri incelenmiştir. KL21 polih herbal formülasyonunun 28 günlük subakut toksisite denemesine benzer şekilde uygulamada herhangi bir yan etki tespit edilmemiş; vücut, rölatif organ ağırlıkları ve hematoloji parametrelerinde değişiklik saptanmamıştır (Oloyede et al., 2012). Geleneksel kore tıbbında kullanılan ve 22 bitki karışımından oluşan herbal formülasyonun (Mahwangyounpae-tang) 28 günlük toksisite çalışması kapsamında sıçanlara 800, 400 ve 200 mg/kg dozlarda uygulanmıştır. Kanda biyokimyasal ve hematolojik analizler gerçekleştirilmiş ve bulgular doğrultusunda 400 ve 200 mg/kg doz uygulamalarında değişiklik tespit edilmemiştir (Park et al., 2010).

Histopatolojik incelemeler doğrultusunda gerçekleştirilen hematoksilen-eosin boyama sonuçlarına göre herhangi bir major patolojik bulgu tespit edilmemiştir. Buna göre, karaciğer dokusu genel histolojik görünümü tüm gruplarda normal olarak değerlendirilmiş, sentral ven, interlobular portal ven, hepatik arter ve safra kanalları normal görünümde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sinüzoidler ve stromal doku normal histolojik görünümde izlenmiştir. Savunma hücreleri olarak bilinen kuffer hücrelerinde sayısal bir artış izlenmemiştir. Benzer şekilde geleneksel Kore tıbbında kullanılan ve 13 bitki karışımından oluşan CGX kodlu polih herbal formülasyonun farmakolojik açıdan güvenli olduğu ve hepatoprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma kapsamında sıçanlara 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarda 6 ay boyunca CGX uygulaması

yapılmış, davranışsal değişimler ile organ ve vücut ağırlıkları, idrar, biyokimya ve hematoloji analizleri ile histopatolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Uygulamaya bağlı herhangi bir değişiklik tespit edilmezken CGX polih herbal formülasyonunun güvenli ve etkili yapısı da ortaya konmuştur (Shin et al., 2010). Bir başka çalışmada ise 13 hafta boyunca 500, 1000 ve 2000 mg/kg uygulanan 18 bitkiden oluşan içeriğinde KL21 polih herbal formülasyonunda yer alan *Zingiber officinale*'de bulunan Bangpungtongsung-san (BPTS) isimli herbal karışımın, toksikolojik profili belirlenmiş ve histopatolojik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Histoloji çalışmaları kapsamında yapılan nekropside hematoksilen&eosin boyama ile makroskopik herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (Lee et al., 2012).

Bu kısma kadar olan analizler, total fenolik & flavonoid içeriğin ve biyolojik aktivitenin belirlenmesi ile toksisite testleri olmak üzere 3 başlık altında toplanmaktadır. KL21 polih herbal formülasyonunun biyolojik etkinliğini ortaya koymak bunun yanı sıra kullanımın herhangi bir toksik etkiye yol açmadığı belirlemek bu çalışmaların majör hedeflerinden birini oluşturmaktadır. Denemelerin devamında özellikle anti-kanser etkinin; apoptoz mekanizması, anti-anjiyogenik etki ve solid tümör modeli kullanılarak ortaya konması, varolan biyolojik aktivitenin nasıl etki gösterdiği konusunda destekleyici bilgiler sunmaktadır. Bu kapsamda KL21 polih herbal formülasyonun *in vitro* yöntemler ile apoptotik gen profilinin belirlenmesi, anti-anjiyogenik ve yara iyileşme etkilerinin saptanması, tümör inhibisyon mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir. Ayrıca *in vivo* Ehrlich ascites tümör modeli ile tümör oluşturulan hayvanlarda TUNEL boyama ve VEGF markerı ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Böylece formülasyonun kanser alanında terapötik olabilme potansiyeli konusunda da veriler elde edilmiştir.

Anti-kanser etkinin belirlenmesi kapsamında yapılan çalışmaların başında KL21 polih herbal formülasyonun kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisi saptanmış, sonrasında etki gözlenen hücre hatları ile 84 gene ilişkin veriler ortaya konmuştur. Formülasyonun sadece etanol ekstresinin sitotoksikite çalışmaları ve apoptotik gen profilinin çıkartılması için seçilen insan orjinli kanser hücre hatları, MCF-7 kanser hücre hattı ve HEK-293 normal hücre hattı kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan insan apoptotik panel içeriğinde, DFFA (DNA Fragmentasyon faktörü, alt ünite- α) geni yer almaktadır. Hücrelerdeki DFFA gen aktivitesinin varlığı, hücrelerin Tip I programlı hücre ölümü, yani diğer adı ile apoptozisi seçtiğinin önemli bir göstergesidir. Bu genin literatürde sıklıkla kullanılan sinonimi ICAD (Caspase-Activated DNase)'dir (Tang and Kidd, 1998;

Lechardeur et al., 2000). Endonükleaz enzimi ailesinin üyesi olan DNA fragmentasyon faktörü (DFF); 40-kD'luk DFFB ve 45-kD'luk DFFA alt ünitelerinden oluşan heterodimerik yapı bir DNaz'dır. Bu gen ürünü çoğalan hücrelerde inaktif formda iken (heterodimerik form; DFFB-DFFA), apoptotik hücrelerde efektör kaspaz-3'ün aktive ettiği, mitokondriden salınan ve pro-apoptotik protein işlevi gören, hücre içi apoptotik bir marker olma özelliğindedir. DFF aktivasyonu; DFFA'nın kaspaz-3 tarafından işlenmesi ve DFFB alt ünitesinden ayrılması ile gerçekleşir. DFF, 45-kD'luk alt ünitelerden oluşan, enzimin aktif formudur. Aktive DFF, kromozomal DNA'yı oligonükleosomal fragmentlere yani nükleosomal parçaçıklara ayırarak, apoptotik hücreye özgü DNA fragmentasyonunun oluşmasını sağlar (Lechardeur et al., 2005; Otake et al., 2006; Elmore, 2007; Morin et al., 2012). Çalışmanın yürütüldüğü HEK-293 ve MCF-7 hücre hatlarında saptanan DFFA gen aktivitesi, KL21 polimeral formülasyonunun etanol ekstresinin sitotoksitesinin bu hücreleri apoptotik mekanizmalar aracılığı ile öldürdüğünü doğrulamaktadır. Ayrıca hücre kültür temelli çalışmalarda hücrelerin apoptoz ile öldüğünün doğrulanmasında sıklıkla kullanılan TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) ve VEGF markerı gibi histokimyasal teknikler çalışma düzeneğine eklenmiştir (Jurisic and Bumbasirevic, 2008).

Kontrol olarak kullandığımız insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK-293 ve meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de 48 saat KL21 polimeral formülasyon maruziyetinin, hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksite hesaplanmış (IC_{50} 44 μ g/mL Etanol, 49 μ g/mL Metanol) ve apoptozu tetiklediği görülmüştür. Her iki hücre hattı da panelde çalışılan genler ile benzer sonuçlar verse de gen ekspresyonlarında bazı değişiklikler tespit edilmiştir. Çalışmalar kapsamında formülasyonun hangi yolları aktive ederek işlev gördüğü belirlenmeye çalışılmıştır.

Bilindiği gibi reseptör ilişkili ekstrinsik apoptotik yolak; TNF, Fas ve TRAIL yolağı olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır. Bütün yolların ortak özelliği, spesifik ligandların hücre membranındaki spesifik ölüm reseptörlerine bağlanmaları ile ilişkilidir. Bu kapsamda HEK-293 VE MCF-7 hücre hatlarında ekstrinsik yolda yer alan, aslen makrofajlar tarafından üretilen çok fonksiyonlu pro-inflamatuvar sitokinlerden olan Tümör nekrotik faktör (TNF) domaini genlerinden FASLG ve TNF genlerinde 1 kat down regülatif değişiklik tespit edilmiş ancak domainin geri kalan üyeleri olan TNFSF8, TNFSF10 ve TNFSF11 genlerinde herhangi bir aktivasyon belirlenmemiştir. Özellikle FASLG ve TNF genlerinde 1 kattan biraz daha fazla etkilediği down regülatif değişiklik,

formülasyonun etanol ekstresinin her iki hücre hattında da ekstrinsik apoptotik yolakta yer alan TRAIL domain genleri aracılığı ile hareket etmediği göstermektedir. Benzer şekilde HEK-293 hücre hattında KL21 polihherbal formülasyon maruziyetinin TNFRSF10A ve TNFRSF11B genlerinde bir aktivasyon sebep olmadığı tespit edilmiştir. Bu genlerinde TRAIL yolağında faaliyet göstermeleri, formülasyonun normal hücrelerde bu apoptotik yolağı kullanmadığını gösteren diğer bir bulgudur.

Bununla birlikte HEK-293 hücre hattının ekstrinsik apoptotik yolakta görev alan TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6 ve TRAF7 genlerinde değişiklik göstermiş olup TRAF domaini genleri ile apoptoza uğradığının kanıtını oluşturmuştur. Benzer şekilde KL21 polihherbal formülasyonun etanol ekstresinin MCF-7 kanser hücre hattı ile maruziyeti sonucunda TNFR ve TRAF ölüm reseptörleri aracılı elimine edebileceği saptanmıştır. Bu gruba ait genlerdeki artış 1 kat olup, ekstrinsik apoptotik yolakta iş göre genleri kapsamaktadır. Özellikle bu gruba ait genler ile otoimmün ve nörodejeneratif hastalılar, kanser gibi birçok hastalığın progresyonu TNF aracılığı ile apoptoz gerçekleşeceğinden, yolak elemanlarındaki aktivasyon formülasyonun etkinliğini göstermektedir. Ancak bu grup hücre ölümünü spontan bir şekilde indükleyemez. TNF tarafından aktive edilen NF-kB (Nüklear Faktör Kappa-B, TRAF3'ü aktive eder) güçlü bir öncül hayatta kalım sinyal yolağıdır. Yolağın aktive olması hücre için öncül yaşam sinyallerinin açığa çıkmasına neden olur. NF-kB yolağı CFLAR (cFLIP), BIRC2 (cIAP1), BIRC3 (cIAP2) ve BCL2L1 (BCL-xL) gibi birçok anti-apoptotik faktörü hedef alır. TNF'in sitotoksik etkisi yalnızca NF-kB aktivasyonu bloklandığında ortaya çıkmaktadır. Bu genlerde tespit edilen aktivasyon başka bir inhibötrün araya girdiğinin kanıtıdır. Çünkü aktif olan NF-kB sinyal yolakları elemanları ile hayatta kalım için gerekli olan mekanizma aktif olarak belirlenmiştir. Panel sonuçlarına göre her iki hücre hattında gözlenen bu değişim literatür ile uygunluk göstermektedir (Wajant et al., 2003).

Fas proteini aracılı apoptoz, hücre ölümünün diğer yolaklarından biridir. Ölüm indüklü sinyalleme kompleksi, DISC, ilk olarak FasL (CD95L)-Fas (CD95; TNFRSF6) apoptotik sinyalleme yolağı olarak ifade edilmiştir (Kischkel 1995). FasL-Fas bağlantısının kurulması, reseptör trimerizasyonunu başlatarak ölüm domainlerinin hücre içinde kümelenmesine neden olur. Bu içsel endozomal yolak, FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) olarak adlandırılan bir adaptör protein aracılığına ihtiyaç duyar. Adaptör, Fas-FADD kompleksi ile prokaspaz-8'in bir birleri ile interaksiyonlarından sorumludur. Fas sinyallemesinin asli başlatıcı kaspazı olan kaspaz-8 ve adaptör molekül FADD, Fas-DISC kompleksinin ve Fas

ilişkili apoptozis sürecinin anahtar iki bileşenidir. Kaspaz-8'in otoproteolitik işlenmesine neden olan bu bağlanma, aktif proteazların serbest kalmasını sağlar. Sürecin sonunda aktif bir heterotetramer olarak kaspa-8'in DISC kompleksinden ayrılması gözlemlenir (Medema et al., 1997; Wong 2011). Kaspaz-8 aktivasyonu ile hücrel efektör kaspazların tetiklenmesinde iki farklı yol dikkat çeker. Kaspaz-8'in diğer efektör kaspaz aile üyelerini doğrudan aktive etmesinin yeterli olduğu koşullarda, tanımlanan bu substratların aktivasyonu, apoptozis sürecinin yıkım fazına geçmesine neden olur. Fakat bazen apoptozun uyarımı daha karmaşık etkileşimlere ihtiyaç duyar. Bu tip koşullar, reseptör yolağının mitokondri aracılı kaspa-9 aktivasyonuna gereksinim gösterir. Bu aktivasyon için ise bir amplifikasyon ilmeğindeki BID proteininin kaspa-8 aracılı yıkımı ve daha sonra da Smac/DIABLO ya da sitokrom c gibi mitokondri apoptotik faktörlerin serbest kalması gerekmektedir. Bu faktörlerin serbest kalması ile oluşan apoptozom, aktif bir kaspa-9 üretir (Scaffidi et al., 1998). Aktive kaspa-9, efektör bir kaspaz olan kaspa-3'ü ardından da kaspa-8'i aktive ederek, pozitif feedback ilmeğini tamamlar. Fas reseptör sinyalleme ile başlayan apoptotik uyarım, mitokondri prokürörlerinin sitosole çıkışını, böylece ekstrinsik ve intrinsik yolağın birlikte uyarılmasını ve apoptozun son adımını yöneten kaspa-3'ün aktivasyonunu kapsayan alternatif bir apoptoz indükleyici yolağın oluşmasını tetikler (Stennicke and Salvesen, 2000; Wong 2011). Bu kapsamda HEK-293 ve MCF-7 hücre hatlarında aktivasyon gösteren KL21 polihedral formülasyonun ekstrinsik apoptotik yolaklardan başlıcaları olan TNF ve Fas aracılı genler ile hücre ölüme götürebileceği kanıtlanmıştır.

İntrinsik apoptotik yolda yer alan BCL2 aile üyeleri incelendiğinde, pro-apoptotik BAK1, BAX ve BOK genlerinde her iki hücre hattında da 1'er katlık aktivasyon tespit edilmiştir. Bu genler Multi-BH(123) domaini içerenler olup pro-apoptotik BAK1 gen ürünü, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini düzenleyici fonksiyonu nedeni ile intrinsik apoptotik yolda önemli bir multi-BH(123) elemanıdır. Bu genlerin ekspresyonu ile mitokondri dış zar (MOM) geçirgenliğinin değiştiği ve sitokrom c ile birlikte diğer mitokondriyal öncüllerinde sitosole salındığı bilinmektedir (Li et al., 2001; Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Li et al., 2004; Green and Kroemer, 2004). Mitokondriyal öncüllerden olan DIABLO, endoG ve HTRA2 genlerindeki ifadenme düzeyinin de MCF-7 hücrelerinde benzer kat değişim oranları literatürdeki bu veriyi destekleyici niteliktedir (Donovan and Cotter, 2004; Jin and El-Deiry, 2005; Wong 2011). Bu değişiklikler her iki hücre hattında da KL21 polihedral maruziyetinin benzer sonuçlar ile gen ifadesinde değişikliğe neden olduğunun göstergesidir. Ayrıca BH3 domainini içeren pro-apoptotik BCL2 ailesi

üyelerinden olan pro-apoptotik BAD, BBC3, BID, BIK, HRK, BCL2L11, BCL2L1 ve PMAIP1 genlerinde tespit edilen 1 katlık artış, KL21 polihherbal formülasyon maruziyetinin oluşturduğu sitotoksik etkinin her iki hücre hattında da BCL2 gen ailesinin aktivasyonu ile de ilişkili olduğunun bir göstergesidir. İntrinsik kaspaz grubunu kodlayan gen aktivitelerine bakıldığında intrinsik başlatıcı kaspaz-2 ve kaspaz-9 gen aktivasyonlarının 1-kat up-regülatif, kaspaz-9 ve onunla ilişkili pro-apoptotik adaptör, kaspaz etkinleşmesine yardımcı regülatör protein APAF1 kodlayan genin benzer bir kat değişim oranında, yine up-regülatif değişim gösterdiği belirlenmiştir. Bu genlerdeki benzer değişimler de mitokondri aracılı apoptotik yolağın aktive olduğunu göstermektedir. Mitokondri aracılı intrinsik yolağın genlerini kodlayan BCL2 gen süperaile elemanlarında madde maruziyetinden sonra HEK-293 kontrol hücrelerine kıyasla MCF-7 hücrelerinde farklı bir gen aktivasyon profili olduğu gözlemlenmemiştir.

KL21 polihherbal formülasyonun etanol ekstresinin HEK-293 ve MCF-7 hücre hatları ile maruziyeti sonucunda panelde çalışan gen profillerinden pro-survival grubunda yer alan, anti-apoptotik NF-kB sinyal yolağı elemanları olan Sınıf 1; NFKB1, NFKB2, Sınıf 2; REL, RELA, RELB genlerinin tümünde 1 katlık aktivasyon tespit edilmiştir. RELA geninin p50 koaktivatörü ile nükleer pordan geçerek sağ kalımda rol oynadığını bilinmektedir (Sun C.S., 2011). Benzer şekilde her iki hücre hattı içinde anti-apoptotik instrinsik yola elemanları olan BAG, BCL2 (Mitokondri aracılı), NF-kB yolağının hedefi BCL2L1, BCL2L2, MCL1 ve BCL2L10 genlerinde de aktivasyon gözlenmiştir. BCL2 süper ailenin üyeleri olan bu genlerde aktivasyon, bu hücrelerin KL21 polihherbal formülasyonun sitotoksitesinin indüklediği apoptotik mekanizmalardan kaçma girişimleri olduğu söylenebilir.

Hayatta kalım ve sitotoksik ajanlara karşı korunma yollarından PTEN sinyal yolağına ait AKT1, PTEN ile pro-apoptotik TP53 ve TP53I5 gibi apoptoz inhibisyon araçlarını kodlayan gen aktivasyonlarındaki kat değişimlerinin saptanması HEK-293 ve MCF-7 hücrelerindeki KL21 polihherbal formülasyon maruziyetinin hücre üzerinde oluşturduğu etkilerden biri olduğunu tespit edilmiştir. Benzer şekilde instrinsik apoptotik yolağın yer alan ve hayatta kalım sürecinde görev alan STAT sinyal yolağı elemanlarının tamamı her iki hücre hattında da 1'er katlık aktivasyon göstermiştir. Sitokin Reseptörleri ve JAK/STAT yolağındaki sinyal molekülleri, yani sitokinler, özellikle kan ve bağışıklık sistemindeki hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Lodish et al., 2011-672 s). Sitokinler bazı özel hücre tiplerinin büyüme ve farklılaşma gibi özelliklerini pek çok açıdan kontrol eden, nispeten

küçük salgılanan bir sinyal molekül ailesini oluştururlar. Sitokin reseptörleri benzer yapıya sahip olmakla birlikte benzer sinyal yollarını aktive ederler. Tüm bu yollar transkripsiyon faktörlerinin aktive olmasına ve özel bazı hedef genlerin ifadesinde artış ya da azalmaya yol açar (Lodish et al., 2011-673 s). Sitokin reseptörlerinin sitozolik domaini, sitozolik protein tirozin kinaz ailesi üyesi olan JAK kinazlara sıkıca bağlanır. Aktive olmuş JAK kinazlar, daha sonra, STAT (Sinyal Transdüksiyonu ve Transkripsiyonun Aktivasyonu) ailesi üyesi olan transkripsiyon faktörlerini doğrudan fosforile eder ve uyarır. (Lodish et al., 2011-672 s). JAK kinazlar tarafından aktive olan STAT transkripsiyon faktörleri, farklı hücrelerde farklı genleri aktive ederler. Aktif STAT'lar tarafından uyarılan temel protein bu öncü hücrelerin programlı hücre ölümlerini yani apoptozunu engellerler (Lodish et al., 2011-676 s.). Bu kapsamda incelendiğinde KL21 polihherbal formülasyonun HEK-2934 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde apoptozu intrinsik apoptotik yolak elemanları olan pro-apoptotik regülatör STAT1 geni ile anti-apoptotik SOCS2, SOCS3, STAT5A ve STAT5B gen ifadelerinin hayatta kalım mekanizması ile indüklediğini ortaya koymaktadır.

Potansiyel bir anti-anjiyogenik ajanın belirlenmesinde kullanılan yöntem olan HET-CAM metodu, kolay uygulanabilirliği ve hızlı sonuçların elde edilmesi bakımından sıklıkla tercih edilmektedir (Sandhya et al., 2012). Bu amaçla KL21 polihherbal formülasyonun anjiyogenez inhibisyonu üzerine etkileri, döllenmiş tavuk yumurtalarının koryoallantoik membran üzerinde araştırılmıştır. Koryoallantoik Membran, Kuş ve reptil yumurtalarında bulunan vasküler fetal membran türüdür. Mesodermden kökenlenen membran, allantois ve thechorion adı verilen iki yapıdan oluşmaktadır. Memelilerdeki formu ise plasentadır. Membran, embriyonik gelişimin kemik oluşum safhasında kalsiyum transportunda önemli rol oynamaktadır. Bu membran sinir içermediğinden işlem sırasında embriyoda herhangi bir stres faktörü oluşturmaz (Vargas et al., 2007).

Çalışmamızda negatif ve çözügen kontrol olarak kullanılan maddelerde herhangi bir etki saptanmazken, anti-anjiyogenik bir ajan olduğu bilinen süramin, pozitif kontrol olarak gereken etkiyi göstermiştir. Bununla birlikte KL21 polihherbal formülasyonun etanol ve metanol ekstraktlarının en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 900 µg/mL'de güçlü bir anti anjiyogenik etki tespit edilirken orta ve düşük dozlarda (600-300 µg/mL) herhangi bir etkiye rastlanmamıştır. Benzer şekilde Çin halk tıbbında kullanılan, 24 adet bitki ile yapılan HET-CAM denemeleri sonucunda anti-anjiyogenik etki tespit edilmiştir (Wang et al., 2004). Bir başka çalışmada ise oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen polihherbal formülasyonun HET-CAM metodu ile anti-

anjiyogenik ve anti-inflamatuvar etkileri ortaya konmuştur (Velpandian et al., 2013).

Tümörün odağını hedefleyen lokalize terapiye (cerrahi, radyoterapi) ek olarak, kullanılan sitotoksik ilaçlar ve sistemik terapilerin (kemoterapi) yanı sıra anti-anjiyogenik etkisi ortaya konmuş bitkisel kökenli prototip formülasyonların kullanımı, kanser terapilerine ek olarak yeni ve konvansiyonel uygulamaları da beraberinde getirmektedir. Özellikle bu tür destekleyici ürünler ile tedavi sürecinin hızlı ve etkili olması, dikkati tıbbi bitkilerin kanser alanında ki kullanımına çevirmiştir. Bu kapsamda KL21 polih herbal formülasyonunun etanol ve metanol ekstraktları ile yapılan çalışma sonucuna gösterdiği güçlü anti-anjiyogenik etki literatür ile uygunluk göstermektedir.

Yara iyileşmesi, yara oluşumundan sonra başlayıp, bir süre sonra dokunun tekrar eski durumunu almasına kadar geçen süredeki tüm olaylar yara iyileşmesi kapsamında girmektedir. Bu sürecin temelini hücre büyümesi ve rejenerasyon oluşturmaktadır. Yaralı dokular oldukça kompleks bir yapıya sahip olmalarının yanı sıra iyileşme süreci de bir o kadar karmaşık prosesleri içermektedir. (Kılınç Z., 2003). Anjiyogenik faktörler tarafından indüklenen vaskülarizasyon, hücre proliferasyonunda artış ve ekstraselüler matriks depozisyonu gibi biyolojik olay bu sürecin basamaklarını oluşturmaktadır. Yara iyileşme evreleri, Hemostaz, İnflamatuvar, Proliferatif (Fibroblastik) ve Maturasyon Evresi (Remodeling) olmak üzere 4' e ayrılmaktadır (Diegelmann and Evans, 2004). Yara iyileşmesinin başlangıç basamağı olan akut inflamasyon, hemostazın sağlanması, immun sistem komponentlerinin göçü, mekanik, bakteriyel ve kimyasal etkilere karşı cevabın oluşmasını sağlar. Bu dönemin en önemli elemanı, kan damarlarıdır. Bu evrede, trombositler başlangıç trombositini oluşturup, aracılar (mediatörler) ve büyüme faktörleri salgırlar. İnflamatuvar evrede, yara oluşumu ile başlayan uyarıya karşı vasküler ve hücreyel yanıt oluşur. Fibroblast proliferasyonu ve anjiyogenezis olmak üzere iki ana evreden oluşan Proliferasyon evresinde ise ana hücreler fibroblast ve endotel hücreleridir. makrofajlardan salgılanan TGF- β , fibroblastları yaraya doğru harekete geçirir ve proliferatif evrenin başlangıç sinyalini oluşturur. Makrofajlardan salgılanan diğer growth faktörler ve sitokinler bu evrede anjiogenezi stimüle ederler. Son evre olan maturasyon (remodeling) evresinde ise akut ve kronik imflamatuvar hücreler yavaş yavaş azalır, anjiogenezis sonlanır ve fibroplazi biter. Yaralanmanın ilk haftasında sentezlenen kollajen, remodelizasyon fazında yerini daha çok stabil örgü halindeki kollajene bırakır. Lifler arasındaki kovalent bağlar artarak stabilizasyon sağlanır (Brunicardi C.F., 2005). Yara iyileşme modeli, GTPaz ailesinden olan Rho faktörünün rolü ile hücre polaritesi

ve aktin sitoiskeletindeki düzenlenmeler, mikrotübüllerin ve golgi aparatının oryantasyonu, p53'ün hücre migrasyonunda görevi gibi birçok fizyolojik süreci kapsayacak bir çalışma modelidir. “The CytoSelect™ 24-well Wound Healing Assay Kit” ile gerçekleştirilen analiz ile hücre migrasyon ve proliferasyon oranları hesaplanmış, mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir. *In vitro* yara iyileşme proseüdürü özellikle HET-CAM metodunu destekleyici olmasının yanısıra KL21 polih herbal formülasyonun anti-kanser etkisinin aydınlatılmasına yardımcı analizlerden biridir. Elde edilen sonuçlar % 28,8 yara kapatma yüzdesi ile KL21 polih herbal formülasyonun etanol ekstresinin orta seviyedeki etkisi tespit edilmiştir. Çin tıbbında Astragali Radix (AR) and Rehmanniae Radix (RR) adlı formülasyonlar diyabet ve ona bağlı rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Yapılan *in vitro* yara iyileşme ve hücre migrasyon denemesine göre, cilt fibroblast hücrelerinde TGF-1 geninin dahil olduğu proseste uygulamaya bağlı aktive olduğu tespit edilmiştir. Bu durum Ras/MAPK yolağı ile birlikte gen ekspresyonunu aktive etmiştir. Böylece formülasyonun yara iyileşmesinde aktif rol oynadığı kanıtlanmıştır (Zhang et al., 2012). Bir başka çalışmada ise, içeriğinde *Wrightia tinctoria*, *Aloe vera*, *Terminalia chebula* ve KL21 polih herbal formülasyonun içeriğinde yer alan bitkilerden biri olan *Curcuma longa* bulunan bitkisel formülasyon ile kompleks ve dinamik bir süreç olan ve hücre migrasyonu ile proliferasyonu kapsayan süreçte yara iyileşme modeli çalışılmıştır. Anjiyogeneziste, epitelizasyon ve kollajen oluşumunda anahtar rol oynayan fibroblastlar ile polih herbal formülasyonun etkili bir şekilde aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Krishnamoorthy et al., 2012). Birçok doğal kaynaklı ürünün hücre migrasyon mekanizmasını indükleyerek proliferasyon uyarıcı etki gösterdiği böylece yara iyileşme modellerinde olumlu sonuçlar verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Shrimanker and Patel, 2013; Morgan and Nigam, 2013).

Kanser alanında uygulanan tedaviler önceki öğretiler dikkate alınarak sistemli ilaç uygulamaları ile günümüze kadar büyük gelişme kaydetmiştir. Bu çalışmalar kapsamında hangi metot kullanılırsa kullanılsın, mevcut tedavilere alternatif ya da destek olacak yeni formülasyonların keşfi ve ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak zorunluluk göstermektedir. Özellikle son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modellerinin kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Çeşitli kimyasal ajanları, deney hayvanlarına değişik yollarla vererek birbirinden farklı özellikte tümör modelleri oluşturulabilmektedir. Ancak hazırlanmış şekilleri, uygulama yolları, uygulama sonrası karsinogenin etki mekanizması iyi

belirlenerek en verimli çalışma modeli ortaya konmalıdır (Kumar et al., 2011; Abdin et al., 2014).

Transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Spontan tümörler genelde idiopatikdir (oluşumunda bir sebep gösterilemeyen). Geç dönemde ölçülebilir hale gelen bu tümörler insan kanser tiplerine kinatik özellik açısından benzerlik gösterirler. Ayrıca karsinogenezin biyolojisinin anlaşılmasında, kemopreventif ve kemosüpresif ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynayan modellerdir. Solid tümörler, subkutan, intradermal, intramuskuler, intraperitoneal veya intravenöz yolla hücre süspansiyonlarının inokülasyonu sonucunda transplante edilirler. Transplante edilen tümör hücreler kendilerine özgü histokompatibilite antijenlerine sahiptir. Bu antijenlere, Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri (Tumor Associated Transplantation Antigens, TATA) adı verilmektedir. TATA'ların yüksek immünite meydana getirme kapasiteleri vardır. Spontan veya transplante edilebilen tümörlerin çoğunluğunda TATA bulunmaktadır (Zeybek Ü., 2012).

Çalışmamızda kullandığımız Solid Ehrlich Ascites Tümör Modeli, Ehrlich ve Apolant tarafından 1907 yılında bir farenin meme bezinden çıkarılmış olan Ehrlich Mouse Carcinoma'dan türetilmiştir. Farelere özgü olan (Mouse spesifik Tumor) ve günümüze kadar diferansiye olmadan gelmiş, yaygın olarak kullanılan bir tümör modelidir. % 100'e yakın transplante edilme oranına sahip olmasının yanı sıra tümöre spesifik antijenleri (TATA) bulunmamaktadır. Hiçbir regresyon göstermediği gibi virulan özelliğindedir. 1 hafta gibi kısa bir sürede hızlı büyüme özelliği ortaya koymasının yanı sıra malign ve % 100 ölüme götürür. Tümör hücreleri eşit değildir ve 20-30 mikron çapındadır. Ayrıca herhangi bir tedavi uygulanmaz ise 35-40 gün içinde hayvanlarda ölüm gözlenir. Loewenthal ve Jahn 1930'lu yıllarda bu tümörün asit şeklini elde etmişlerdir. İntraperitoneal yolla inokule edilen hücrelerin farelerde asit formda tümör oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca tümörü bu yolla pasajlayarak, devamını da sağlamak mümkündür. Tümör pasajlandıkça virulansı artar. Metastatik özelliği olan Ehrlich asit tümörü heterotransplantabilite yeteneğine sahiptir (Zeybek Ü., 2012).

KL21 polih herbal formülasyonunun anti-kanser özelliğinin değerlendirilmesinde son analizlerden biri olan Ehrlich ascites tümör modeli, en az 20 kardeş çiftleşmesi sonucu oluşan inbred soydan gelen balb-c fareler üzerine gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, enjektör yardımıyla donör farenin periton boşluğundan, Ehrlich ascites tümörü hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınarak,

deney grubu farelerine (tümör kontrol, pre ve post implantasyon grubu) subkutan yolla tümör hücresi transplante edilmesi ile solid tümör oluşumu gerçekleştirilmiştir (Osman et al., 1993; Sarı vd., 2010). Tümör kontrol grubunda solid tümör oluşumu başarıyla tespit edilmiştir. Pre-implantasyon grubunda EAC hücreleri enjekte edilmeden önceki 7 gün boyunca 900 mg/kg dozda KL21 polih herbal formülasyonu oral olarak uygulanmıştır. Bu aşamada formülasyonun “koruyucu” etkisi araştırılmıştır. Post-implantasyon grubunda ise EAC hücreleri enjekte edildikten 3 gün sonra başlayacak şekilde 7 gün boyunca 900 mg/kg dozda KL21 polih herbal formülasyonu oral olarak uygulanmıştır. Bu grupta da formülasyonun “iyileştirici-tedavi edici” aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonlandığında pre-implantasyon grubunda KL21 polih herbal formülasyonun tümör gelişimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanırken KL21 post-implantasyon grubu ile tümör kontrol grubu kıyaslandığında tümör haciminde azalma tespit edilmiştir. Benzer şekilde geleneksel Çin tıbbında (PCHM) kullanılan birçok bitkisel formülasyonun düşük toksisiteye sahip güvenli ürünler olduğu ve bu ürünlerin akciğer, yumurtalık, kolon, rektum, mide gibi çeşitli solid tümör kanserlerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Wang et al., 2012). Aynı zamanda en ölümcül kanser türlerinden biri olan akciğer kanserinde çeşitli bitkisel karışımların etkili olduğu kanıtlanmıştır (Jeong et al., 2011). İçeriğinde *Ginseng* ve *Carthamus tinctorius* ihtiva eden formülasyon ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise meme kanseri tedavisinde etkin olabileceği araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Loo et al., 2004).

Ehrlich asit tümör modelinde farelerin vücut ağırlıklarının başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında tümör kontrol, KL21 pre ve post-implantasyon grupları ile süramin grubunda çalışma sonlandığında bir artış tespit edilmiştir. Biyokimyasal ve hematolojik analizler hem çalışmanın başında hemde çalışma sonlandığında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda analiz sonlandığında, KL21 pre ve post implantasyon gruplarında ki lenfosit artışının sebebi, antikör üreten bağışıklık sistemi elemanı olan lenfositlerin madde uygulamasına bağlı kandaki değerlerinin yükselebileceği şeklinde açıklanabilir. Benzer şekilde monosit değerlerinde negatif kontrol grubu ile tümör kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan artış saptanmıştır. Bu durumda monositlerin, bağışıklık sistemini direkt veya indirekt yolla regüle ettiğinin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Çalışmanın başında alınan kanlar ile analizler sonlandığında toplanan kanlar arasında hematoloji parametrelerinde ki istatistiksel değişiklikler belirlenmiştir. Bunlar arasında negatif kontrol grubunda, eritrosit hemoglobin konsantrasyonunun yüzde olarak ifadesi olan MCHC parametresi ile tümör kontrol grubunda, trombositlerin dağılım genişliği olarak adlandırılan PDWc

parametresinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde KL21 pre-implantasyon grubunda MCHC ve eritrositlerin dağılım genişliği olan RDWc parametresi ile KL21 post-implantasyon grubunda lenfosit değerinde, süramin grubunda ise MCHC değerinde artış belirlenmiştir.

Biyokimya parametreleri incelendiğinde gruplar arasında başlangıç değerleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Analiz sonlandığında, KL21 pre ve post-implantasyon grupları ile süramin uygulama grubunda karaciğer fonksiyon enzimi olan alanin aminotransferazın değeri azalmıştır. Ayrıca pankreas fonksiyon testlerinden biri amilaz, tümör kontrol grubu ile süramin uygulama grubunda artış göstermiştir. Kalsiyum-fosfor dengesinin değerlendirilmesinde kullanılan fosfor ile karbonhidrat metabolizmasının değerlendirme parametresi olan glukoz değerlerinin tümör kontrol, KL21 pre ve post-implantasyon gruplarında önemli bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Bu azalmanın tümör hücre enjeksiyonunun anabolizma ve katabolizma dengesinde yol açtığı değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Biyokimyasal parametrelerin başlangıç ve bitiş değerleri incelendiğinde ise tümör kontrol grubunda amilaz değerinde artış, sodyum değerinde ise azalma saptanmış; süramin uygulama grubunda ise albümin değerinde azalma tespit edilmiştir.

Farelerden solid tümör dokuları, hematoksilin-eosin boyama ile incelenmiştir. Hematoksilin-eosin boyamada, hematoksilin boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilmiştir. Özellikle tümör kontrol grubunun histolojik kesitlerinde oldukça yoğun ve yaygın tümör dokusu tespit edilmiştir. Bununla birlikte azalmış stromal doku, lökosit infiltrasyonu ile çevrelenmiş tümör dokusu elde edilmiştir. Hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanase olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi, parçalara bölünmesi gibi değişiklikler tümör dokularının spesifik özelliğini oluşturmaktadır (Güleş ve Eren, 2008). Süramin uygulama grubunda 7 hayvandan sadece 3 tanesinde tümör dokusu tespit edilmiştir. Bu gruptan alınan dokuları incelendiğinde ise benzer şekilde stromal doku ve lökosit infiltrasyonu tespi edilmiş farklı olarak ise daha az bir alanda non-kompakt tümör dokusu görülmüştür. KL21 polih herbal formülasyonu pre-implantasyon grubunda süramin grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Damar yapıları daha az sayıda görülmekle birlikte yaygın lökosit infiltrasyonu, non-kompakt tümöral doku tespiti söz konusudur. KL21 polih herbal formülasyonu post-implantasyon grubunda, tümör hacmi ve ağırlığında tespit edilen azalma tespit edilmiş ayrıca histolojik incelemeler tümör kontrol grubuna kıyasla yaygın tümör

dokusunun sınırlandığı belirlenmiştir. TUNEL ekspresyonu incelemelerinde ise, KL21 Poliherbal formölasyonu post ve pre-implantasyon uygulama grupları incelendiğinde tümör periferinde ve merkezinde ayrı ayrı değerlendirilen apoptotik hücreler, tümör kontrol ve süramin grubuna kıyasla daha fazla tespit edilmiştir. VEGF markerı ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmeler ise, KL21 Poliherbal formölasyonu post implantasyon grubunda tümör kontrol grubuna benzer şekilde oldukça yoğun ve yaygın VEGF ekspresyonu izlenmiştir. Bu veriler KL21 poliherbal formölasyonunun kanser hücrelerini apoptotza sürüklediğinin hemde anti-anjiyogenik etki göstererek tümör hücrelerini öldürdüğünü desteklemektedir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında KL21 polih herbal formülasyonun içeriğinde yer alan fenolik ve flavonoid maddelerden dolayı yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu bununla birlikte gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* toksisite testleri, biyokimyasal, hematolojik ve histolojik incelemeler ile kullanımının güvenli olduğu belirlenmiştir.

KL21 polih herbal formülasyonun ekstrinsik apoptotik yolak aracılığı ile kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği ayrıca anti-anjiyogenik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Formülasyonun anti-kanser etkisi, *in vivo* solid tümör modelinden elde edilen veriler ile desteklenmiştir. Ayrıca tümör dokusu üzerinde gerçekleştirilen histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler ile apoptoza uğrayan hücreler bir kez daha gözlemlenmiştir.

Yapılan analizler doğrultusunda KL21 polih herbal formülasyonun kanserde hem destekleyici tedavi ajanı olarak, hem de yan etki bakımından kullanımı güvenli bir anti-kanser ürünü olabileceğinin potansiyeli ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdin, A. A., Soliman, N.A., Saied, E.M.**, 2014, Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice, *Pharmacological Reports*, 66, 1114–1121 pp.
- Abu-Al-Basal A. M.**, 2010, Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 443–450p.
- Ak, T. and Gülçin, I.**, 2004, Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, *Chem. Biol. Interact.*, 17, 27–37 pp.
- Allan, J.J., Bhide, M.R. and Agarwal, A.**, 2012, Safety Assessment of Zigbir®: A Polyherbal Formulation in Sprague-Dawley Rats, *Journal of Toxicology*, doi:10.1155/2012/589520, 10 p.
- Al-Rezaa, M. S., Bajpai, K., V. and Kang, C. S.**, 2009, Antioxidant and antilisterial effect of seed essential oil and organic extracts from *Zizyphus jujuba*, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2374–2380 pp.
- Amaral P. G., Carvalho R. N., Barcelos P. R., Dobrachinski F., Portella L. R., Silva H. M., Lugokenski H.T., Dias M. R. G., Luz A. C. S., Boligon A. A., Athayde L. M., Villetti A. M., Soares A. A. F. and Fachinetto R.**, 2013, Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 48–55p.
- Arceusz, A. and Wesolowski, M.**, 2013, Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 215-220 pp.
- Arunasree, M.K.**, 2010, Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231, *Phytomedicine*, 17(2), 581-588 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ashish, S., Gupta, S.J., Amit, K. and Tripathi, Y.B.**, 2014, Estimation of total phenolic and flavonoid content of polyherbal formulation dashang lepa, *Int. J. Ayur. Pharma Research*, 2(3), 69-73 pp.
- Awika, J.M., Rooney, L.W. and Wu, X.**, 2003, *Cisneros zevallos* L. Secreening methods to measure antioxidant activity of sorghum bicolor and sorghum products, *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 6657-6662 pp.
- Babu, B. and Wu, J.T.**, 2010, Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria, *Science of The Total Environment*, 408, 69-497 pp.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C. S., Shao, X. and Pan, M. H.**, 2010, Flavonoids and phenolic compounds from *rosmarinus officinalis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5363-5367 pp.
- Banerjee, P., Maitya, S., Das, T. and Mazumder, S.**, 2011, A double-blind randomized placebo-controlled clinical study to evaluate the efficacy and safety of a polyherbal formulation in geriatric age group: A phase IV clinical report, *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 429-433 pp.
- Baretta, I. P., Felizardo, R. A., Bimbato, V. F., Santos, M. G. J., Kassuya, C. A. L. and Junior, A. G.**, 2012, Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. Extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 46-54 pp.
- Baumler S.**, 2007, *Heilpflanzen Heute*, Verlag Urban & Fischer, Münih, 421-413 pp.
- Baydar N. S.**, 2006, *Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi*, Palme Yayıncılık, (221-225s), Ankara, 336s.
- Baytop T.**, 1999, *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 231-232s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bellik, Y.**, 2014, Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 40-44 pp.
- Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z. and Ferencik, M.**, 1999, Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sci.*, 65, 1865-1874pp.
- Berman, T., Hochner-Celnikier, D., Calafat, A., Needham, L., Yona Amitai, Y., Wormser U. and Richter E.**, 2009, Phthalate exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: Results of a pilot study, *Environment International*, 35, 353-357 pp.
- Bhengraja, A.R., Dar, A.S., Talwar, G.P. and Mittal, A.**, 2008, Potential of a novel polyherbal formulation BASANT for prevention of *Chlamydia trachomatis* infection, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 84-88 pp.
- Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, A.D. and Kimchi, A.**, 2010, Systems biology analysis of programmed cell death, *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 556-564 pp.
- Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, V. M. S., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi, E. S., Taghavi, J. M. and Bankehsaz Z.**, 2013, Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*), *Fish & Shellfish Immunology*, 36, 46-51 pp.
- Block, G., Peterson, B. and Subar, A.**, 1992, Fruit, vegetables, and cancer prevention - A review of the epidemiologic evidence, *Nutr. Cancer*, 18, 1-29 pp.
- Boskabady M.H. and Takaloo N. L. M.**, 2010, Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients, *Phytomedicine*, 17, 707-713p.
- Bravo L.**, 1998, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.*, 56, 317-333 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brunicardi, C.F.**, 2005, Schwartz's Principles Of Surgery, 8th Edition, McGraw-Hill Medical Publishing: New York, 1950p.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Sökmenc, A.**, 2010, Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220 pp.
- Cao, Y., Shi, H.L., Yu, H.X., Wang, F.C. and Wang, J.H.**, 2014, Conjugated linolenic acid polymer dressings impregnated with silver nano-crystals: Fabrication and dual inhibition functions assessment on tumor cells and microorganisms, *Chemical Engineering Journal*, 245, 150-157 pp.
- Carpenter, C. D., O'Neill, T., Picot, N., Johnson, A. J., Robichaud, A. G., Webster D. and Gray, A. C.**, 2012, Anti-mycobacterial natural products from the Canadian medicinal plant *Juniperus communis*, *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 695-700 pp.
- Cecchini, S., Paciolla, M., Caputo, A.R. and Bavoso, A.**, 2014, Antioxidant Potential of the Polyherbal Formulation "ImmuPlus": A Nutritional Supplement for Horses, *Vet Med Int.*, doi: 10.1155/2014/434239, 5 p.
- Chaitali, H. V., More, N. S., Bharate, S. S. and Bharate S. B.**, 2010, Cytotoxic screening of selected of Indian medicinal plants using Brine-Shrimp lethality bioassay, *Advances in Natural Applied Science*, 4, 389-395 pp.
- Chamundeeswari, D., Vijayanthi, V., Umamaheswari, S., Gandhimathi, C., Karna, S.L., Meignanam, E. and Vasantha, J.**, 2006, Antioxidant activity of Arthritin a polyherbal formulation, *Indian J Exp Biol.*, 44(5), 403-407 pp.
- Chan Park, C., Soon-Il Kim, I.S. and Ahn, J.Y.**, 2003, Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects, *Journal of Stored Products Research*, 39, 333-342 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chandrasekaran, C.C., Sundarajan, K., David, K. and Agarwal A., 2010,** In vitro efficacy and safety of poly-herbal formulations, *Toxicology in Vitro*, 24, 885-897 pp.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002,** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Analysis*, 10, 178-182 pp.
- Chang, S. J., Wang, C. K., Yeh, F. C., Shieh, E. D. and Chiang C. L., 2013,** Fresh ginger (*Zingiber officinale*) has anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines, *Journal of Ethnopharmacology*, 145, 146-151 pp.
- Chaudhary, M. and Payasi, A., 2013,** Evaluation of genotoxicity of Trois through Ames and *in vitro* chromosomal aberration tests, *Asian Pac. J. Trop.*, 3(11), 902-906 pp.
- Cheung, S. and Tai, J., 2007,** Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*, *Oncology reports*, 17, 1525-1531 pp.
- Choedon, T., Dolma, D. and Kumar, V., 2011,** Pro-apoptotic and anticancer properties of Thapring - A Tibetan herbal formulation, *J. Ethnopharmacol.*, 137(1), 320-326 pp.
- Chuang S., Cheng A., Lin K. J. and Kuo L. M., 2000,** Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, in ammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 38, 991-995 pp.
- Chuang S., Cheng A., Lin K. J. and Kuo L. M., 2000,** Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, in ammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 38, 991-995p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G. and Snowden, R.T.**, 1994, Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes, *Journal of Immunology*, 153, 507-516 pp.
- Colasanti A., Kisslinger A., Liuzzi R., Quarto M., Riccio P., Roberti G., Tramontano D. and Villani F.**, 2000, Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 54(2-3), 103-107 pp.
- Crissman, J.W., Goodman, D.G., Hildebrandt, P.K., Maronpot, R.R., Prater, D.A., Riley, J.H., Seaman, W.J. and Thake, D.C.**, 2004, Best practice guideline: toxicologic histopathology, *Toxicologic Pathology*, 32, 126-131 pp.
- Cuvrelier, M. E., Richard, H. and Berset, C.**, 1992, Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols, structure-activity relationship, *Biosci. Biotech. Bioch.*, 56, 324-325 pp.
- Dall'Acqua S., Bolegob C., Cignarella A., Gaion M.R. and Innocenti G.**, 2011, Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract, *Phytomedicine*, 18, 1031-1036 pp.
- Demirer, E., Ayten, Ö. ve Dilaver, T.**, 2012, Anjiogenez ve Anti angiogenik Tedaviler, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, DOI:10.4328/jcam.1310.
- Deng, L.S., Chen, F.W., Zhou, B., Yang, L. and Liu, L.Z.**, 2006, Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells, *Food Chemistry*, 98:112-119 pp.
- Denicourt, C. and Dowdy, S.F.**, 2004, Medicine targeting apoptotic pathways in cancer cells, *Science*, 305(5689):1411-1413 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A. M., Alves, C. R., Oliveira, P. P. B. M., Santos-Buelga, C. and Ferreira, C. F. R. I.,** 2013, Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. And bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction, *Food Chemistry*, 141, 4152-4160 pp.
- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C.,** 2004, Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Frontiers in Bioscience*, (9), 283-289 pp.
- Donovan, M. and Cotter, T.G.,** 2004, Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644:133-147 pp.
- Durukan, H.A., Özgürtaş, T., Erbil, K.M., Aydın, İ., Mumcuoğlu, T., Tapan, S. ve Karagül, S.,** 2008, Bevakizumab ve Pegaptanip sodyum'un civciv karyoallantoik membrandaki *in vivo* anjiogenes üzerine etkisi, *Gülhane Tıp Dergisi*, (50), 19-22 s.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U. and Kimchi, A.,** 2009, Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them, *Cell Death Differentiation*, 16, 966-975 pp.
- El-Daly E.S.,** 1998, Protective effect of cysteine and Vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats, *Journal of Pharmazie de Belgique*, 53, 87-95 pp.
- El-Kamali, H.H., Ahmed, A.H., and Mohammed A.A.M.,** 1998, Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts, *Fitoterapia*, 69, 77-78 pp.
- Elmore, S.,** 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516 pp.
- El-Nekeety A. A., Mohamed R. S., Hathout S. A., Hassan S. N., Alya E.S. and Abdel-Wahhab A. M.,** 2011, Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats, *Toxicon*, 57, 984-991 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- El-Tahir K.E.H., Ashour M.M.S. and Al-Harbi,M.M.,** 1993, The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea-pigs: elucidation of the mechanism(s) of action, *General Pharmacology*, 24, 1115-1122 pp.
- Fatokis, G.,** 2006, *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160, 171-177 pp.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. and Counter, J, L.,** 2003, The biology of VEGF and its receptors, *Nat. Med.*, 9, 669-676 pp.
- Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K.,** 2005, Apoptosis-based therapies and drug targets, *Cell Death and Differentiation*, 12, 942-961 pp.
- Folkman, J.,** 2003, Angiogenesis and apoptosis, *Sem. Cancer Biol.* 13,159-167 pp.
- Gaidhani, S. N., Lavekar, G. S., Juvekar, A. S., Sen, S., Singh, A. and Kumar S.,** 2009, In vitro anti cancer activity of standart extracts used in Ayurveda, *Pharmacognosy Magazine*, 5, 425-429 pp.
- Garcia, D., Ramos, A. J. , Sanchis, V. and Marín, S.,** 2012, Effect of Equisetum arvense and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity, *International Journal of Food Microbiology*, 153, 21-27 pp.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A.,** 1992, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.*, 119, 493-501 pp.
- Gilani A.H., Aziz N., Khan M.A., Shaheen F., Jabeen Q., Siddiqui B.S., and Herzig J.W.,** 2000, Thnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 161-167 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gonzales G.F. and Valerio Jr. L.G.**, 2006, Medicinal plants from Peru: A review of plants as potential agents against cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(5), 429-444 pp.
- Gothoskar, S.V. and Ranadive, K.J.**, Anticancer screening of SAN-AB; An extract of marking nut, *Semicarpus anacardium*, 1971, *Indian J. Exp. Biol.* 9, 372- 75 pp.
- Greenberg, M. I.**, 2003, Occupational, industrial, and environmental toxicology, Elsevier Health Sciences, 180 pp.
- Guedes, C.A., Amaro, M.H., Barbosa, R. C., Pereira, D.R. and Malcata, X.F.**, 2011, Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses, *Food Research International*, 44, 2721-2729 pp.
- Gupta, G., Kazmi, I., Afzal, M., Rahman, M., Saleem, S., Ashraf, S., Khusroo, J. M., Nazeer, K., Ahmed, S., Mujeeb, M., Ahmed, Z. and Anwar, F.**, 2012, Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Viscum album* L. (Loranthaceae) in mice and rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 810-816 pp.
- Güleş, Ö ve Eren, Ü.**, 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78 pp.
- Hadjur C., Richard M.J., Parat M.O., Jardon P. and Favier A.**, 1996, Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells, *Photochem Photobiol*, 64(2), 375-381 pp.
- Haidara, K., Zamir, L., Shi, W. and Batist, G.**, 2006, The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action, *Cancer Letters*, 242, 180-190 pp.
- He, C. and Klionsky, D.J.**, 2009, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy, *Annual Review of Genetics*, 43, 67-93 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Herraiz, T., Gonzalez, D., Ancin-Azpilicueta, C., Aran, J. V. and Guillen H.,** 2010, β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO), *Food and Chemical Toxicology*, 48, 839-845 pp.
- Horii, H., Suzuki, R., Sakagami, H., Umemura, N., Ueda, J.Y. and Shirataki, Y.,** 2012, Induction of Non-apoptotic Cell Death in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines by *Rhinacanthus nasutus* Extract, *In vivo*, 26(2), 305-309 pp.
- Hossain, M. A., AL-Raqmi, S. A. K., AL-Mijizy, H. Z., Weli, M. A. and Al-Riyami Q.,** 2013, Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 3(9), 705-710 pp.
- Hseu, Y.C., Yang, H.L., Lai, Y.C., Lin, J.G., Chen, G.W. and Chang, Y.H.,** 2004, Induction of apoptosis by *Antrodia camphorata* in human premyelocytic leukemia HL-60 cells, *Nutr. Cancer*, 48(2), 189-97 pp.
- Hu, Y., Wang, S., Wu, X., Zang, J., Chen, R., Chen, M. and Wang, Y.,** 2013, Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: A focus on hepatocellular carcinoma, *Journal of Ethnopharmacology*, 149, 601-612 pp.
- Huang, C., Li, G. W., Zhang, B. X., Wang, L., Xu, L. T., Wu, D., and Li, Y.,** 2013, Alpha-asarone from *Acorus gramineus* alleviates epilepsy by modulating A-Type GABA receptors, *Neuropharmacology*, 65, 1-11 pp.
- Huett, A., Goel, G. and Xavier, R.J.,** 2010, A systems biology viewpoint on autophagy in health and disease, *Current Opinion in Gastroenterology*, 26, 302-309 pp.
- Hussain T., Siddiqui H. H., Fareed S., Vijayakumar M., and Rao V. C.,** 2012, Evaluation of chemopreventive effect of *Fumaria indica* against *N*-nitrosodiethylamine and CCl₄-induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 623-629 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jemal, A., Bray, F., Center, M. N., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D.,** 2011, Global Cancer Statistics, *A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90 pp.
- Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Lee, M.K., Nam, K.T. and Park, Y.B.,** 2001, Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits, *Life Sciences*, 69, 2855-2866 pp.
- Jeong, J.K., Kim, Y.D., Quan, Y.H., Jo, K.H., Kim, W. G. and Chung, H.S.,** 2014, Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice, *Fitoterapia*, 93, 150-162 pp.
- Jeong, J.S., Koh, W., Kim, B. and Kim, H.S.,** 2011, Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites, *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 652-661 pp.
- Ji, K., Kho, L.Y., Park, Y. and Choi, K.,** 2010, Influence of a five day vegetarian diet on urinary levels of antibiotics and phthalate metabolites: A pilot study with “Temple Stay” participants, *Environmental Research*, 110, 375-382 pp.
- Jin, Z. and El-Deiry, W. S.,** 2005, Overview of Cell Death Signaling Pathways, *Cancer Biology and Therapy*, 4(2), 139-163 pp.
- Joshua, A. J., Goudar, K. S., Damodaran, A., Sameera, N. and Amit, A.,** 2008, Acute Oral Toxicity Evaluation of Some Polyherbal Formulations in Albino Wistar Rats, *International Journal of Pharmacology*, 4(5), 388 p.
- Journal of Neuroscience Methods,** 2000, Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neural apoptosis, 96, 147-152 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Juniora S.G.J., Monte M.H.F., Blanco M.M., Lanziotti B.N.M.V., Maia D.F. and Leal A.K.L.,** 2005, Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of *Equisetum arvense* L. with demonstrated antioxidant properties in vitro, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 593 - 600p.
- Jurisic, V. and Bumbasirevic, V.,** 2008, *In vitro* assays for cell death determination, *Archive of Oncology*, 16, 49-54 pp.
- Kajaria, K.D., Gangwar, M., Kumar, D., Sharma, K.A., Tilak, R., Nath, G., Tripathi, B. Y., Bhusan, Y., Tripathi, J.S. and Tiwari, S.K.,** 2012, Evaluation of antimicrobial activity and bronchodialator effect of a polyherbal drug-Shrishadi, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 46, 905-909 pp.
- Kalimuthu, S. and Kwon, K.S.,** 2013, Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2334-2354 pp.
- Kalimuthu, S. and Kwon, K.S.,** 2013, Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2334-2354 pp.
- Kamdem, P. J., Adeniran, A., Boligon, A. A., Klimaczewski, V. C., Elekofehinti, O. O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuk, P. E., Meinerz, F. D. and Athayde, L. M.,** 2013, Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection, *Industrial Crops and Products*, 51, 26-34 pp.
- Kang, K., Lee, H.J. and Kim C.Y.,** 2007, The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2352-2359 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kapan, M., Aslanmirza, M., Karip, A., Bozkurt, Y., Evsen, M., Sak, E. ve Öngören A.**, 2008, Lokal Fenitoin ve Üre Uygulamasının Yara iyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması, *Yeni Tıp Dergisi*, 25, 209-212 pp.
- Karabay, N.Ü.**, 2000, Bazı Sinerjistik Etkili İnsektisitlerin Memeli Sistemleri Üzrinde Toksik Etkilerinin Araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi.
- Kaur, S. and Mondal, P.**, 2014, Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants, *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(1), 5 p.
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Kaskey, R.B., Rao, C.V. and Reddy, B.S.**, 1999, Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer, *Cancer Res.*, 59, 597-601 pp.
- Ke, S.C., Liu, S.H., Yen, H.C., Huang, C.G., Cheng, C.H., Huang, F.Y.C. and Su, L.C.**, 2014, Curcumin-induced Aurora-A suppression not only causes mitotic defect and cell cycle arrest but also alters chemosensitivity to anticancer drugs, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(5), 526-539 pp.
- Kenny, O., Smyth, T.J., Walsh, D., Kelleher, C.T., Hewage, C.M. and Brunton, N.P.**, 2014, Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts, *Food Chemistry*, 161:79-86 pp.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R.**, 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26, 239-257 pp.
- Khan K.H., Codesido, M.B. and Molife, R.**, 2014, Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 10, 1826-1016 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khelifi, D., Sghaier, M. R., Amouri, S., Laouini D., Hamdi, M. and Bouajila, J.,** 2013, Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L., *Food and Chemical Toxicology*, 55, 202-208 pp.
- Kılınç, Z.,** 2003, Yara İyileşmesi, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Patoloji Birimi, 24s.
- Kim, K.H., Lee, H.J., Jeong, S.J., Lee, H.J., Lee, E.O., Kim, H.S., Zhang, Y., Ryu, S.Y., Lee, M.H., Lü, J. and Kim, S.H.,** 2011, Galbanic Acid Isolated from *Ferula assafoetida* Exerts *In vivo* Anti-tumor Activity in Association with Anti-angiogenesis and Anti-proliferation, *Pharm. Res.*, 28(3), 597-609 pp.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E.,** 1995, Cytotoxicity-dependent Apo-1 (FAS/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *The EMBO Journal*, 14, 5579-5588 pp.
- Klein, V., Chajes, V., Germain, E., Schulgen, G., Pinault, M., Malvy, D., Lefrancq, T., Fignon, A., Floch, L. O., Lhuillery, C. and Bougnoux, P.,** 2000, Low alpha-linolenic acid content of adipose breast tissue is associated with an increased risk of breast cancer, *European Journal of Cancer*, 36, 335-340 pp.
- Kleinwächter, M., Paulsen, J., Bloem, E., Schnug, E. and Selmar, D.,** 2015, Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*), *Industrial Crops and Products*, 64, 158-166 pp.
- Kong, X., Ge, H., Hou L., Shi, L. and Liu, Z.,** 2006, Induction fo apoptosis in K562/ADM cells by gamma-linolenic acid involves lipid peroxidation and activation caspase-3, *Chemico-Biological Interactions*, 162, 148-148 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kontogianni, G. V., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, P. I. and Tzakos, G. A., 2013,** Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity, *Food Chemistry*, 136, 120-129 pp.
- Kozics, K., Klusová, V., Srancíková, A., Mucaji, P., Slamenová, D., Hunáková, L. Kusznierevicz, B. and Horváthová, E., 2013,** Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells, *Food Chemistry*, 141, 2198-2206 pp.
- Krenn, L. and Paper, 2009,** Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.), *Phytomedicine*, 16, 1083-1088 pp.
- Krishnamoorthy, J.R., Sumitira, S., Ranjith, M.S., Gokulshankar, S., Ranganathan, S., Mohanty, B.K. and Prabhakaran, G., 2012,** An *in vitro* study of wound healing effect of a poly-herbal formulation as evidenced by enhanced cell proliferation and cell migration, *Egyptian Dermatology Online Journal*, 8(1), 1 p.
- Kumar, A., D'Souza, S.S., Tickoo, S., Salimath, B.P. and Singh, H.B., 2009,** Antiangiogenic and proapoptotic activities of allyl isothiocyanate inhibit ascites tumor growth *in vivo*, *Integr Cancer Ther.*, 8(1), 75-87 pp.
- Kunimasa, K., Kobayashi, T., Kaji, K. and Ohta, T., 2009,** Antiangiogenic effects of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane are associated with their differential regulation of ERK1/2 and Akt in tube-forming HUVEC, *Journal of Nutrition*, 140(1), 1-6 pp.
- Kwack, S.J., Kim, K.B., Kim, H.S. and Lee, B.M., 2009,** Comparative Toxicological Evaluation of Phthalate Diesters and Metabolites in Sprague-Dawley Male Rats for Risk Assessment, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 72:1446-1454 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- L. Sado-Kamdem, S., Vannini, L. and Guerzoni, E. M.,** 2009, Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Microbiology*, 129, 288-294 pp.
- Larson, R. A.,** 1998, The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27, 969-978 pp.
- Laubenbacher, R., Hower, V., Jarrah, A., Torti, S.V., Shulaev, V. and Mendes, P.,** 2009, A systems biology view of cancer, *Biochimica Biophysica Acta*, 1796, 129-139 pp.
- Lechardeur, D., Dougaparsad, S., Nemes, C. and Lukacs, G.L.,** 2005, Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 216-225 pp.
- Lechardeur, D., Drzymala, L., Sharma, M., Zylka, D., Kinach, R., Pacia, J., Hicks, C., Usmani, N., Rommens, J.M. and Lukacs, G.L.,** 2000, Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD), *The Journal of Cell Biology*, 150(2), 321-334 pp.
- Lee, Y.M., Shin, S.I., Seo, S.C., Kim, H.J., Han, S.R. and Shin, K.H.,** 2012, Subchronic oral toxicity studies of the traditional herbal formula Bangpungdongseong-san in Crl: CD (SD) rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 144, 720-725 pp.
- Leist, M. and Jaattela, M.,** 2001, Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 589-598 pp.
- Lekogo, M.B., Coroller, L., Mathot, G.A., Mafart, P. and Leguerinel I.,** 2010, Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 242-247 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, M., Au, Ka-Y., Lam, H., Cheng, L., But, Pui-Hay, P. and Shaw, C.P.,** 2014, Molecular identification and cytotoxicity study of herbal medicinal materials that are confused by Aristolochia herbs, *Food Chemistry*, 147, 332-339 pp.
- Li, Y., Sun, W.G., Liu, H.K., Qi, G.Y., Wang, Q., Sun, X.R., Chen, B.Q. and Liu, J.R.,** 2011, γ -Tocotrienol inhibits angiogenesis of human umbilical vein endothelial cell induced by cancer cell, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(12), 1127-1136 pp.
- Liana-Ruiz-Cabelloa, M., Gutiérrez-Praenaa, D., Pichardoa, S., Javier Moreno, F., Bermúdez, M. J., Aucejo, S. and Cameán, M. A.,** 2014, Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2, *Food and Chemical Toxicology*, 64:281-290 pp.
- Liang, W.Z., Chou, T., C., Lu, T., Chi, C. C., Tseng, L. L., Pan, C.C., Ling, L. K., Kuo, C. C. and Ren Jan, C.,** 2013, The mechanism of carvacrol-evoked $[Ca^{2+}]$ rises and non- Ca^{2+} triggered cell death in OC2 human oral cancer cells, *Toxicology*, 303, 152-161 pp.
- Lin, M.T., Yen, M.L., Lin, C.Y. and Kuo, M.L.,** 2003, Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis by Resveratrol through Interruption of Src-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation, *Mol. Pharmacol*, 64, 1029-1036 pp.
- Liu L., Xiong H., Ping j., Ju Y. and Zhang X.,** 2010, *Taraxacum officinale* protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 392-397 pp.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.,** 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, *Methods*, 25, 402-408 pp.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, A.C., Krieger, M., Scott, P.M., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P.,** 2011, Moleküler Hücre Biyolojisi, Palme Yayıncılık-Ankara, 1150 s. Özkan Matbaacılık, ISBN: 978-605-4414-94-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Loo, W.T.Y., Cheung, M.N.B. and Chow, L.W.C.,** 2004, The inhibitory effect of a herbal formula comprising ginseng and carthamus tinctorius on breast cancer, *Life Sciences*, 76, 191 - 200 pp.
- Lust, J.,** 2000, Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi, Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul, (84-355s), 560 p.
- Madhusudan, S. and Middleton, M. R.,** 2005, The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 31, 603-617 pp.
- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Yun, G. and Lu, Z.Z.,** 2002, Turmeric (*Curcuma longa*) and cur-cumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen, *Anticancer Res.*, 22, 4179-4181 pp.
- Manikandan, S. and Devi R.S.,** 2005, Antioxidant property of alpha-asarone against noise-stress-induced changes in different regions of rat brain, *Pharmacological Research*, 52, 467-474 pp.
- Mariappan, M.P., Sabesan, G., Koilpillai, B., Janakiraman, S. and Sharma, K.N.,** 2013, Chemical characterisation and antifungal activity of methanolic extract of *Cinnamomum verum* J. Presl bark against *Malassezia* spp., *Pharmacognosy Journal*, 5, 197-204 pp.
- Martin, S.J. and Green, D.R.,** 1995, Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts, *Cell*, 82, 349-352 pp.
- Martinsa, N. E., Pessano, T. C. N., Leal, L., Roos, D. H., Folmer, V., Puntel, O. G., Rocha, T. B. J., Aschner, M., Ávila, S. D. and Puntel, L. R.,** 2012, Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice, *Brain Research Bulletin*, 87, 74-79 pp.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G.,** 2005, Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chem.*, 91, 571-577 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E.,** 1997, Flice is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *The EMBO Journal*, 16, 2794-2804 pp.
- Meng, Q., Roubin H.R. and Hanrahan R.J.,** 2013, Ethnopharmacological and bioactivity guided investigation of five TCM anticancer herbs, *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 229-238 pp.
- Middleton, E. and Kandswami, C.,** 1994, The Flavanoids: Advances in Research Since 1986, ed by JB Harborne 1st edn. Chapman & Hall, London, 619-652 pp.
- Mignogna, M. D., Fedele, S., and Russo, L.,** 2004, The World cancer report and the burden of oral cancer, *European Journal of Cancer Prevention*, 13(2), 139-142 pp.
- Mishra, T., Khullar, M. and Bhatia, A.,** 2011, Anticancer potential of aqueous ethanol seed extract of *Ziziphus mauritiana* against cancer cell lines and ehrlich ascites carcinoma, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 52, 11 pp.
- Moktan, B., Saha, J. and Sarkar, P.K.,** 2008, Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema, *Food Res. Int.*, 41, 586-593 pp.
- Monte, M.H.F., Santos G.J., Russi M., Lanziotti B.N.M.V., Leal A.K.L. and Cunha A.M.G.,** 2004, Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice, *Pharmacological Research*, 49, 239-243 pp.
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P. and Cillard, J.,** 1993, Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures, *Biochem. Pharmacol.*, 4, 13-19 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morgan, C. and Nigam, Y.**, 2013, Naturally derived factors and their role in the promotion of angiogenesis for the healing of chronic wounds, *Angiogenesis*, 16(3), 493-502.
- Morin, A., Fritsch, L., Mathieu, J.R., Gilbert, C., Guarmit, B., Firlej, V., Gallou-Kabani, C., Vieillefond, A., Delongchamps, N.B. and Cabon, F.**, 2012, Identification of CAD as an androgen receptor interactant and an early marker of prostate tumor recurrence, *The FASEB Journal*, 26(1), 460-467 pp.
- Mouhajir F., Pedersen J.A., Rejdali M., and Towers G.H.N.**, 1999, Antimicrobial thymohydroquinones of Moroccan *Nigella sativa* seeds detected by electron spin resonance, *Pharmaceutical Biology*, 37, 391-395 pp.
- Murphy, K., Kubin, J. Z., Shepherd, J. N. and Ettinger, R. H.**, 2010, *Valeriana officinalis* root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats, *Phytomedicine*, 17, 674-678 pp.
- Münter K., Mayer D. and Faulstich H.**, 1986, Characterization of a transporting system in rat hepatocytes. Studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 860(1), 91-98 pp.
- Naggar T.B., Gómez-Serranillos M.P., Carretero M.E. and Villar A.M.**, 2003, Neuropharmacological activity of *Nigella sativa* L. Extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 63-68 pp.
- Nair S.C., Salomi M.J., Panikkar B. and Panikkar K.R.**, 1991, Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 75-83 p.
- Nallamilli, R. B., Kumar, P. S., Reddy, V. K., Prasanna, L. M., Maruthi, V. and Sucharita P.**, 2013, Hepatoprotective activity of *Cichorium intybus* (Linn.) root extract against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino Wistar rats, *drug invention today*, 1 - 4 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2003, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Eighth edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Newmeyer, D. D. and Ferguson-Miller S.**, 2003, Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell*, 112, 481-490 pp.
- Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, C. F. R. I., Calhelha, C. R., Fernandes, Markovic, T., Markovic, D., Giwelie, A. and Sokovic, M.**, 2014, Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils, *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190 pp.
- Nogueira, I. A, Leão, A. B., Vieira, S., Benfica, P. L, Cunha, L. C. and Valadares, M. C.**, 2008, Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax., *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), 474-478 pp.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals No : 408**, 1998, Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Ogbonnia, S., Mbaka, G.O., Emordi, J., Nkemhule, F., Joshua, P., Usman, A., Odusanya, P. and Ota, D.**, 2013, Antimicrobial evaluation and acute and sub-acute toxicity studies on a commercial polyherbal formulation, “Ade & Ade Antidiabetic®” used in the treatment of diabetes in southwestern Nigerian, *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(11), 423-432 pp.
- Oh H., Kim H.D., Chob H. J. and Kim C. Y.**, 2004, Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 421-424p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oh, S.J., Cho, J.H. and Son, C.G.,** 2015, Systematic review of the incidence of herbal drug-induced liver injury in Korea, *Journal of Ethnopharmacology*, 159, 253-256 pp.
- Okpanyi N.S. and Arens-Corell M.,** 1990, Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of dried extracts of populus tremula, solidago virgaurea and fraxinus excelsior, *European Journal of Pharmacology*, 183(6), 2276-2277 pp.
- Oloyede, A. M., Okpuzor, J. and Omidiji, O. O.,** 2012, 91-day Oral Toxicity Evaluation of a Herbal Preparation Used in the Management of Breast Tumour in Southwestern Nigeria using Mice, *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 7(4), 199-205 pp.
- Osman, A el-M., O., Ahmed, M.M., Khayyal, M.T., and el- Merzabani, M.M.,** 1993, Hyperthermic potentiation of cisplatin cytotoxicity on solid Ehrlich carcinoma, *Tumori*, 79(4), 268-272 pp.
- Otake, Y., Mims, A. and Fernandes, D. J.,** 2006, Merbarone induces activation of caspase-activated DNase and excision of chromosomal DNA loops from the nuclear matrix, *Molecular Pharmacology*, 69(4), 1477-1485 pp.
- Ouedraogo, M., Baudoux, T., Stévigny, C., Nortier, J., Colet, M.J., Efferth, T., Qu, F., Zhou, J., Chan, K., Shawj, D., Pelkonen, O. and Duez, P.,** 2012, Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms, *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 492-512 pp.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu,B. and Bao, J.K.,** 2012, Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation*, 45, 487-498 pp.
- Önal, Ö., Erden, A., Akıncı, B. S., Erden, G., Karabulut, İ., Zeybek, D. N., Fadılhoğlu, E., Müftüoğlu, S., Sarıcalıoğlu, F., Balkancı, D. Z., Başer, C. H. K. ve Ayper, Ü.,** 2011, Sıçanlarda Karvakrol’un oleik asitle oluşturulan akut akciğer hasarına etkisi, *Journal of Anesthesia*, 19(2), 90-98 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özata N.**, 2009, Fitoterapi ve Aromaterapi, Doğan Kitap-Mega Basım, (35-145s), İstanbul, 174s.
- Özdemir, E. and Alpınar, K.**, 2015, An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde - Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, 166, 53-65 pp.
- Özen, T. and Korkmaz, H.**, 2003, Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice, *Phytomedicine*, 10, 405-415p.
- Pages, N., Maurois, P., Bac, P., Eynde, V.J.J., Tamariz, J., Labarrios, F., Chamorro, G. and Vamecq, J.**, 2011, The alpha-asarone/clofibrate hybrid compound, 2-methoxy-4-(2-propenyl)phenoxyacetic acid (MPPA), is endowed with neuroprotective and anticonvulsant potentialities, *Biomedicine & Aging Pathology*, 1, 210-215 pp.
- Park, M. Y., Choi, Y. H., Kim, D. J., Lee, S. H. and Ku, K. S.**, 2010, 28 Days repeated oral dose toxicity test of aqueous extracts of mahwangyounpae-tang, a polyherbal formula, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2477-2482 pp.
- Patrick-Iwuanyanwu, K.C., Amadi, U., Charles, I. A. and Ayalogu E.O.**, 2012, Evaluation of acute and sub-chronic oral toxicity study of baker cleansers bitters a polyherbal drug on experimental rats, *EXCLI Journal*, 11, 632-640 pp.
- Paulo, M., Hoff, K. and Kalil, M.**, 2012, Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 38, 825-833 pp.
- Piyaviriyakul, S., Shimizu, K., Asakawa, T., Kan, T., Siripong, P. and Oku, N.**, 2011, Anti-angiogenic Activity and Intracellular Distribution of Epigallocatechin-3-gallate Analogs, *Biol Pharm Bull.*, 34(3), 396-400 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Potrich B.F., Allemand A., Silva M.L., Santos C.A., Baggio H.C., Freitas S.C., Mendes D.A.G.B., Andre E., Werner M.F.P. and Marques A. C. M.,** 2010, Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system, *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 85-92 pp.
- Prisilla, H. D., Balamurugan, R. and Shah, R. H.,** 2012, Antidiabetic activity of methanol extract of *Acorus calamus* in STZ induced diabetic rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S941-S946 pp.
- Rafter J.J.,** 2002, Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *British Journal of Nutrition*, 88(2), 219-224 pp.
- Rajasree, P.H., Vishwanad, V., Cherian, M., Eldhose, J. and Singh, R.,** 2012, Formulation and evaluation of antiseptic polyherbal ointment, *Int. J. of Pharm. & Life Sci*, 3(10), 2021-2031 pp.
- Rajesh, M.G. and Latha, M.S.,** 2004, Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation, *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 99-104 pp.
- Rajput, B. S., Tonge, B. M. and Karuppayil, M.,** 2013, An overview on traditional uses and pharmacological profile of *Acorus calamus* Linn. (Sweet flag) and other *Acorus* species, *Phytomedicine*, 21(3), 268-276 pp.
- Rajurker, S., Rekhe, D.S., Maini, S. and Ravikanth, K.,** 2009, Acute toxicity studies of polyherbal formulation (Methiorep Premix), *Veterinary World*, 2(2), 58-59 pp.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P.,** 2010, Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 614-619 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rehman, K., Mashwani, R. Z., Khan, A. M., Ullah, Z. and Chaudhary, J. H.,** 2015, An ethno botanical perspective of traditional medicinal plants from the Khattak tribe of Chonthra Karak, Pakistan, *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 251-259 pp.
- Rehman, S., Latief, R., Bhat, A. K., Khuroo A. M., Shawl, S. A. and Chandra, S.,** 2013, Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques, *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.015>.
- Rodríguez-Landa J. F. and Contreras C. M.,** 2003, A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts, *Phytomedicine*, 10, 688-699 pp.
- Saddique Z., Naeem I. and Maimoona A.,** 2010, A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 511-521p.
- Salomi N.J., Nair S.C. and Jayawardhanan K.K.,** 1992. Antitumour principles from *Nigella sativa* seeds, *Cancer Letters*, 63, 41-46p.
- Salvat, A., Antonacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y. and Godoy, H.M.,** 2004, Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina, *Phytomedicine*, 11, 230-234 pp.
- Sánchez-Muniz F.J., Olivero-David R., Triki M., Salcedo L., González-Muñoz J.M., Cofrades S., Ruiz-Capillas C., Jiménez-Colmenero F. and Benedi J.,** 2012, Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage, *Food Research International*, 48, 909-915p.
- Sandeep, D. and Nair, K.K.C.,** 2011, Radioprotection by -asarone: Prevention of genotoxicity and hematopoietic injury in mammalian organism, *Mutation Research*, 722, 62-68 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sandhya, S., Sai Kumar, P., Vinod, K.R., Banji, D., Kumar, K. and Rajeshwar, T.**, 2012, In ova angiogenesis analgesic and anti inflammatory potency of *Aerva monsoniae* (Amaranthaceae), *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 385-389 p.
- Sankari, L., Masthan, K.M.K., Babu, A.N., Bhattacharjee, T. and Elumalai, M.**, 2012, Apoptosis in Cancer - An Update, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13 (10), 4873-4878 pp.
- Saroj, K.B., Mani, D. and Mishra, K.S.**, 2012, Scientific validation of polyherbal hepatoprotective formulation against paracetamol induced toxicity, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 1742-1746 pp.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E.**, 1998, Two CD95 (Apo-1/FAS) signaling pathways, *The EMBO Journal*, 17:1675-1687 pp.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J.**, 2008, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nature Protocols*, 3:1101-1108 pp.
- Sela-Bar, G.**, 2011, White-Berry Mistletoe (*Viscum album L.*) as complementary treatment in cancer: Does it help, *European Journal of Integrative Medicine*, 3, e55-e62p.
- Seo, J.Y., Park, M.Y., Jung, T.Y., Choi, H.Y., Kim, J.D., Lee, H.S. and Ku, S.K.**, 2008, Genotoxicity testing of aqueous extracts of Mahwangyounpae-tang, a polyherbal formula, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3827-3831p.
- Shaikh, T., Rub, A. R. and Sasikumar, S.**, 2012, Antimicrobial screening of Cichorium intybus seed extracts, *Arabian Journal of Chemistry*, doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.012.
- Shin, W.J., Kim, G.H., Park, J.H., Sung, W.N. and Son, G.C.**, 2010, Safety of the traditional Korean herbal medicine CGX: A 6-month repeated-dose study in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 221-229 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shrimanker, M. and Patel, N.M.**, 2013, Preparation and *in vitro* evaluation of polyherbal formulation for wound healing, *Am. J. PharmTech Res.*, 3(6), 764-767 pp.
- Sills, A.K., Williams, B.M., Epstein, D.S., Sipos, E.P., Davis, J.D., McLane, M.P., Pitcford, S., Cheshire, K., Gannon, F.H., Kinney, W.A., Chao, T.L., Donowits, M., Laterra, J., Zasloff, M. and Brem, H.**, 1998, Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature, *Cancer Research*, 58, 2784-2792 pp.
- Singh N. and Muthuraman A.**, 2012, Acute and sub-acute oral toxicity profile of *Acorus calamus* (Sweet flag) in rodents, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1017-S1023p.
- Singh, R. B. and Downing, D.**, 1995, Antioxidants and coronary artery disease, *J Nutr Environ Med*, 5, 219-224 pp.
- Singh, V. K., Mishra, V., Tiwari S., Khaliq, T., Barthwal, K. M., Pandey, P. H., Palit, G. and Narender, T.**, 2013, Anti-secretory and cyto-protective effects of peganine hydrochloride isolated from the seeds of *Peganum harmala* on gastric ulcers, *Phytomedicine*, 20, 1180-1185 pp.
- Souza de P., Crestani S., Silva R., Gasparotto F., Kassuya A.L.C., Silva-Santos E.J. and Junior G.A.**, 2013, Involvement of bradykinin and prostaglandins in the diuretic effects of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 149, 157-161 pp.
- Starks, M. C., Williams, B. R., Goering, G. M., O'Neil-Johnson, M., Norman, L. V., Hu, F. J., Garo, E., Hough, W. G., Rice, M. S. and Eldridge, R. G.**, 2010, Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*), *Phytochemistry*, 71, 104-109 pp.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S.**, 2000, Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 299-306 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stewart, B. and Wild, C.P.**, 2014, World Cancer Report , *International Agency for Research on Cancer*, 2, 26-69 pp.
- Su, S.J., Yeh, T.M., Chuang, W.J., Ho, CL., Chang, K.L., Cheng, H.L., Liu, H.S., Cheng, H.L., Gsu, P.Y. and Chow, N.H.**, 2005, The novel targets for antiangiogenesis of genistein on human cancer cells, *Biochemical Pharmacology*, 69, 307-318 pp.
- Suliman, S., Vuuren, S.F. and Viljoen, A.M.**, 2010, Validating the in vitro antimicrobial activity of *Artemisia afra* in polyherbal combinations to treat respiratory infections, *South African Journal of Botany*, 76, 655-661 pp.
- Sun, C. S.**, 2011, Non-canonical NF- κ B signaling pathway, *Cell Res.*, 21(1), 71-85 pp.
- Suryavanshi, S., Zanwar, A., Hegde, M. and Kaul-Ghanekar, R.**, 2014, Standardization of a polyherbal formulation (HC9) and comparative analysis of its cytotoxic activity with the individual herbs present in the composition in breast cancer cell lines, *Pharmacognosy Journal*, 6(2), 87-95 pp.
- Şekeroğlu, A. Z. ve Şekeroğlu, V.**, 2012, Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells, *Mutation Research*, 746, 56-59 pp.
- Tai, K.W., Huang, F.M., Huang, M.S. and Chang, Y.C.**, 2002, Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an *in vitro* mammalian test system, *J. Biomed. Mater. Res.*, 59, 73-77 pp.
- Tang J., Colacino J.M. and Larsen S.H.**, 1990, Virusidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruse, *Antiviral Res.*, 13 (6), 313-325p.
- Tang, D. and Kidd, V.J.**, 1998, Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 549-552 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tardy-Laporte, C., Arnold, A.A., Genard, B., Gastineau, R., Morançais, M., Mouget, L.J., Tremblay, R. and Marcotte, I.,** 2013, A 2H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 614-622 pp.
- Taşkın, E.İ., Dar, A.K., Kapucu, A., Osañç, E., Doğruman, H., Eraltan, H. and Ulukaya, E.,** 2009, Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice, *Cell Biochemistry&Function*, 27, 542-546 pp.
- Taviano, M. F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghier, V., Melchini, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Mondello, L., Güvenç, A., Pasquale, R. and Miceli, N.,** 2013, *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities, *Food and Chemical Toxicology*, 58, 22-29 pp.
- Terman, B.I. and Stoletov, K.V.,** 2001, VEGF and tumor angiogenesis, Eintein Quart., *J. Biol. Med.*, 18, 59-66 pp.
- Thiem B. and Goslinska O.,** 2002, Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from in vitro cultures, *Fitoterapia*, 73, 514-516p.
- Thippeswamy, G. and Salimath, B.P.,** 2006, Curcuma aromatica extract induces apoptosis and inhibits angiogenesis in Ehrlich Ascites Tumor cells *in vivo*, *my Science*, 1(1), 79-92 pp.
- Timbrell J.A.,** 2000, Biomarkers of organ toxicity, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, 33, 295-302 pp.
- Tiwari, A. K. and Rao, J. M.,** 2002, Diabetic mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: present status and future prospects, *Curr. Sci.*, 83(1), 30-37 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, I.E., Guney, E., Yilmaz, T.V., 2011,** Anti-cancer activity of a novel palladium (II) Complex on human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4957-4963 pp.
- Üstün Ç., 1998,** Santral sinir sistemi üzerine etkili tıbbi bitkilerin tarihsel süreç içinde ve günümüzde tedavideki yeri, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst., Doktora Tezi, İzmir.
- Vadlapudi, V., 2012,** Absence of anti fungicidal activity of few Indian medicinal plants methanolic extracts, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 393-395 pp.
- Valadares, M.C., de Carvalho, I.C., de Oliveira, Junior, L., Vieira, M., de S, Benfica, P.L., de Carvalho, F.S., Andrade, L.V., Lima, E.M. and Kato, M.J., 2009,** Cytotoxicity and antiangiogenic activity of grandisin, *J. Pharm. Pharmacol.*, 61(12), 1709-14pp.
- Van Acker, S., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W. J. F. and Bast, A., 1996,** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Bio. Med.*, 20, 331-342 pp.
- Van, Acker, SABE, Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van der Vijgh, W.J.F. and Bast, A., 1996,** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Bio. Med.*, 20, 331-342 pp.
- Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R. and Delie, F., 2007,** The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1162-1176 pp.
- Velpandian, T., Gupta, P., Ravi, A.K., Sharma, H.P and Biswas, N.R., 2013,** Evaluation of pharmacological activities and assessment of intraocular penetration of an ayurvedic polyherbal eye drop (Itone™) in experimental models, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vuuren, S.F and Naidoo, D.**, 2010, An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections, *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 552-558 pp.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P.**, 2003, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differentiation*, 10, 45-65 pp.
- Wang, C. P., Rana, H. X., Chen, R., Li, C. L., Xiong, S. S., Liu, Q. Y., Luo, R. H., Zhou, J. and Zhao, X. Y.**, 2010, Volvalerenone A, a new type of mononorsesquiterpenoid with an unprecedented 3,12-oxo bridge from *Valeriana officinalis*, *Tetrahedron Letters*, 51, 5451-5453 pp.
- Wang, L.J., Li, D., Zou, X.D. and Yong-Qiang, C. C.**, 2007, Antioxidative activity of Douchi (A Chinese traditional salt fermented soybean food) extracts during processing, *Int. J. Food Properties*, 10, 385-396 pp.
- Wang, S., Wu, X., Tan, M., Gong, J., Tan, W., Bian, B., Chen, M. and Wang, Y.**, 2012, Fighting fire with fire: Poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy, *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 33-45 pp.
- Wang, S., Zheng, Z., Weng, Y., Yu, Y., Zhang, ., Fan,W., Dai, R. and Hu, Z.**, 2004, Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts, *Life Sciences*, 74, 2467-2478 pp.
- Wong, R.S.**, 2011, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(87), 14p.
- Yabushita, H., Shimazu, M., Noguchi, M., Kishida, T., Narumiya, H. and Sawaguchi, K.**, 2003, Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascitic Xuid during peritoneal dissemination of ovarian cancer, *Oncology Rep.*, 10, 89-95 pp.
- Yalçın A.**, 2005, Fitoterapi Öldüren / Yaşatan Bitkiler, 2. Bası, Geçit Yayınevi, (44-254s), İstanbul, 383 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yeh, H., Chuang, C., Chen, H., Wan, C., Chen, T. and Lin, L., 2014**, Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts, *LWT - Food Science and Technology*, 55, 329-334 pp.
- Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T. and Mohamed, B., 2013**, Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. typicus Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity, *Industrial Crops and Products*, 43, 412-419 pp.
- You, J., Shan, Y., Zhen, L. and Zhang, L., 2003**, Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 2-(9-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 313, 17-27 pp.
- You, Y., Yoo, S., Yoon, H. G., Park, J., Lee, H. Y., Kim, S., Oh, K. T., Lee, J., Cho, H. Y. and Jun, W., 2010**, *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1632-1637 pp.
- Yücel N.K., 2006**, Kantaron Otundan Elde edilen Hyperisin maddesinin insan lenfosit kültürlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi, Süleyman Demirel Üniveristesi Sağlık Bilimleri Enst., Yüksek Lisans Tezi, Tez no 33, Isparta.
- Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N. Alaoui K., Amarouch H. and Hassar M., 2002**, Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil, *Phytomedicine* 9, 69-74p.
- Zeybek, U. ve Haksel, M., 2011**, Kullanımları, Argefar & Helvacızade Sağlık Yayınları - I, 2. Baskı, İzmir, (27-209s), 222s.
- Zeybek, Ü., 2012**, Kanser Araştırmaları ve Deneysel Modeller, *İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2(5), 1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang, Q., Fonga, C.C., Yua, W.K., Chena, Y., Wei, F., Koon, C.M., Lau, K.M., Leung, P.C., Lauc, C.B.S., Fung, K.P. and Yang, M.,** 2012, Herbal formula *Astragali tadix* and *Rehmanniae tadix* exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF-) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition, *Phytomedicine*, 20, 9-16 pp.
- Zhu, Y.P., Fan, J.F. and Cheng, Y.Q.,** 2008, Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara using *Bacillus substilis*, *BZ. Food Cont*, 19, 654-661 pp.
- Zuzarte, M., Goncalvesa, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Benzarti, A., Marongiud, B., Maxiae, A., Pira,s A. and Salgueiro, L.,** 2013, Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils, *Industrial Crops and Products*, 44, 97-103 pp.

ÖZGEÇMİŞ

02.12.1983 yılında Samsun’da doğan Çinel Köksal Karayıldırım 2002 yılında Samsun Anadolu Lisesinden mezun olmuştur. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitimi sırasında Samsun Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ondokuz Mayıs Tıp Fakültesi Mikoloji Laboratuvarı ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankasında staj eğitimlerini tamamlamış 2008 yılında üniversiteden mezun olmuştur. Sokrates/Erasmus burs programı kapsamında Italia Università Politecnica delle Marche, Facoltà di Scienze, Dipartimento di Biochimica Biologia e Genetica’da Genotoksisite analizleri üzerine 3 ay süreyle staj yapan Köksal, 3 Ocak 2011 tarihinden itibaren Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezinde (ARGEFAR) Biyosidal Ürünler Biyolojik Analizler Laboratuvarı Birim Sorumlusu ve Çevre & Gıda Laboratuvarları Mikrobiyolojik Analizler Birim Sorumlusu görevlerini sürdürmektedir.