

**FORMALDEHİT MARUZİYETİ SONUCU RAT AKCİĞERİNDE
OLUŞAN OKSİDATİF HASARA KARŞI ve DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN KOLON KANSERİ ÜZERİNE KÖPEK BALIĞI
KIKIRDAĞI ve KÖPEK BALIĞI KARACİĞER YAĞININ(SLO)
KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Elvan AKGÜL

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT
Tez No: 2018-003
2018-AFYONKARAHİSAR**

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FORMALDEHİT MARUZİYETİ SONUCU RAT AKCİĞERİNDE
OLUŞAN OKSİDATİF HASARA KARŞI ve DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULAN KOLON KANSERİ ÜZERİNE
KÖPEK BALIĞI KIKIRDAĞI ve KÖPEK BALIĞI KARACİĞER
YAĞININ (SLO) KORUYUCU ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Elvan AKGÜL

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT**

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından **13.SAĞ.BİL.15** proje numarası ile desteklenmiştir.

**Tez No: 2018-003
2018-AFYONKARAHİSAR**

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından


Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/04/2018



Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Dumlupınar Üniversitesi

Jüri Başkanı


Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Artay YAĞCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Dr. Öğr. Gör. Nadir KOÇAK
Selçuk Üniversitesi
Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Elvan AKGÜL' ün “ Formaldehit Maruziyeti Sonucu Rat Akciğerinde Oluşan Oksidatif Hasara Karşı ve Deneysel Olarak Oluşturulan Kolon Kanseri Üzerine Köpek Balığı Kıkırdağı ve Köpek Balığı Karaciğer Yağının Koruyucu Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı tezi .../ .../ günü saat’da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek Kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tezimi sunarken başta tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan ve yol gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT'a;

Veteriner Fakültesi' nde geçen doktora dönemim boyunca eğitimime katkıda bulunmuş olan ve desteğini esirgemeyen Veteriner Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Cevdet UĞUZ, Sayın Doç. Dr. Metin ERDOĞAN ve Sayın Dr. Öğr. Ü. Ömer Faruk LENGER'e;

Tez çalışması sırasında dokuların patolojik incelemesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı Sayın Dr. Öğr. Ü. Mehmet Fatih BOZKURT'a;

Tezimin hücre kültürü çalışmaları aşamasında bana her zaman destek ve yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D. Sayın Dr. Öğr. Ü. Nadir KOÇAK, Tuğçe DURAN, Vasfiye Betül UÇAR'a;

Tezimin biyokimya analizleri ve PCR çalışmaları aşamasında benden yardımını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e;

Tezimi hazırlarken benden desteğini esirgemeyen ve her zaman yardımcı olan kardeşim Erhan AKGÜL'e;

Hayatım boyunca her türlü fedakârlıktan kaçınmayan, sevgi ve destekleriyle bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan sevgili aileme;

Tezimi hazırlarken benden her zaman maddi ve manevi yardımını esirgemeyen, her konuda bana destek olan eşim Cemil ŞAHİN'e;

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL VE ONAY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
GRAFİKLER	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. FA Hakkında Genel Bilgi.....	5
2.1.1. Akciğer Hasarına Neden Olan Etkenler.....	6
2.2. DMH Hakkında Genel Bilgi	7
2.2.1. Kolon Kanserine Neden Olan Etkenler.....	7
2.2.2. Kanser Epidemiyolojisi.....	9
2.2.3. Karsinogenesis	10
2.2.4. Kalın Bağırsak Tümörleri	12
2.2.5. Kolon ve Rektum Kanserlerinin Histolojik Sınıflandırılması:	12
2.2.6. Benign Epitelyal Tümörler.....	13
2.2.7. Malign Epitelyal Tümörler.....	14
2.2.7.1. Adenokarsinom:	14
2.2.7.2. Müsinöz Adenokarsinom:	14
2.2.7.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom:	14
2.2.7.4. Yassı Hücreli Karsinom:	14
2.2.7.5. Adenoskuamöz Karsinom:	14
2.2.7.6. İndiferansiye Karsinom:	15
2.2.7.7. Sınıflandırılmamış Karsinom:	15
2.2.8. Displazi	15
2.2.9. Kolorektal Kanser İnsidansı.....	15
2.2.10. İnsanlarda Kolon ve Rektum Kanserleri	15

2.2.11. Kolorektal Kanser Patolojisi	16
2.2.12. Kolorektal Karsinomanın Evrelendirilmesi	17
2.2.13. Kolorektal Kanser Sağaltımı	18
2.2.14. DMH'in Kolon Kanseri Üzerine Etkisi	19
2.3. FA'in Akciğer Hasarı Üzerine Etkisi	20
2.4. Deney Hayvanı Seçimi.....	21
2.4.1. Ratlar ve Bağışıklık Sistemleri	22
2.5. Alternatif Tedavi ve Yöntemleri	23
2.5.1. Alternatif Tıp Sistemleri:	23
2.5.2. Zihin-Beden Tıbbı:.....	23
2.5.3. Biyoloji Bazlı Terapiler:	24
2.5.4. Manipülatif ve Beden Bazlı Yöntemler:	24
2.5.5. Enerji Terapileri:	24
2.5.6. TAT Yöntemlerinde Tıbbi Bitkilerin Yeri ve Önemi	24
2.5.7. Tıbbi Bitkilerin Tarihi	25
2.5.8. Kansere Hastalarının Kullandıkları Bazı Bitkiler ve Terapi Çeşitleri	26
2.6. Köpek Balığının Bağışıklık Sistemi.....	26
2.6.1. Köpek Balığı Kıkırdağı (SC) ve Koruyucu Etkisi	29
2.6.2. Köpek Balığı Kıkırdağı (SC) Kimyasal Yapısı.....	30
2.6.3. Köpek Balığı Karaciğer Yağı (SLO) ve Koruyucu Etkisi	30
2.6.4. Köpek Balığı Karaciğer Yağı (SLO) Kimyasal Yapısı.....	33
2.7. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi	35
2.8. Endoplazmik Retikulum Stresi:	37
2.8.1. β - ACTİN, TNF- ALFA, P53, ATF4, ATF6, CHOP, EDEM1, GRP78 Genleri:.....	37
2.9. Hücre Kültürü Hakkında Genel Bilgi	47
2.10. Hücre Kültürü Çalışmalarında Yapılan İşlemler.....	49
2.10.1. Hücrelerin Beslenmesi	49
2.10.2. Hücrelerin Pasajlanması.....	50
2.10.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması	51
2.10.4. Hücreleri Çözme	51
2.10.5. Hücre Canlılığı ve Sitotoksite	52

2.10.5.1. Hemositometre ile hücre sayımı	52
2.10.5.2. Trypan blue canlılık testi.....	53
2.10.5.3. Neutral red boyası ile canlılık testi	53
2.10.5.4. Floresan boya tutucularla canlılık sayımı	54
2.10.5.5. MTT testi.....	54
2.11. Hücre Hatları ve Kanser Hücre Hatları:	56
3. MATERYAL ve METOD	59
3.1. Hayvan Materyali.....	59
3.2. Biyokimyasal Analizler.....	61
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması	63
3.2.2. Biyokimyasal Verilerin Analizi	63
3.3. Genetik Analizler	64
3.3.1. Dokudan RNA İzolasyonu	64
3.3.2. Real Time PCR	65
3.3.3. Veri Analizi.....	65
3.4. Patolojik Analizler	68
3.5. İstatistiksel Analiz.....	69
3.6. Hücre Kültürü Analizleri.....	70
4. BULGULAR	71
4.1. Biyokimyasal Bulgular:	71
4.2. Genetik Bulgular:	81
4.3. Patolojik Bulgular:	86
4.4. Hücre Kültürü Bulguları:	91
5. TARTIŞMA	93
5.1. DMH Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	93
5.2. Kolon Kanserinde İyileştirici Etki Gösteren Maddeler Üzerine Yapılmış Çalışmalar	96
5.3. FA Üzerine Yapılmış Çalışmalar	99
5.4. Akciğer Hasarlarında İyileştirici Etki Gösteren Maddeler Üzerine Yapılmış Çalışmalar	102
5.5. SC'nın İyileştirici Etkisi Üzerine Yapılmış Çalışmalar	104
5.6. SLO'nın İyileştirici Etkisi Üzerine Yapılmış Çalışmalar	108

5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	111
6. SONUÇ.....	114
6.1. BİYOKİMYA SONUÇLARI:	114
6.2. GENETİK SONUÇLAR:	116
6.3. PATOLOJİ SONUÇLARI:	117
6.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ SONUÇLARI	118
ÖZET.....	119
SUMMARY	122
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ.....	140

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Tri Fosfat
AFP	: Alfa-fetoproteini
Ark.	: Arkadaşları
BFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CA	: Kanser
CA 19-9	: Karbonhidrat Antijeni 19-9
CA 125	: Karbonhidrat Antijeni 125
CAT	: Katalase
CEA	: Karsinoembriyojenik Antijen
CYP450	: Sitokrom P450
DAG	: Diacylglycerol
DMH	: 1,2-dimetil-hidrazin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EPA	: Eikosa Pentaenoik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK	: Extracellular Signal Regulated Kinase
EVT	: Embriyo Vaskularizasyon Testi
FA	: Formaldehit
FRAP	: Plazmada Demir İndirgeme Kapasitesi
GPX	: Glutathione Peroxidase
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S Transferaz
MAP	: Mitogen Activated Protein
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
PIIBNP	: The Type II Collagen-Derived N-Terminal Propeptide.

P53	: Tumor protein 53
PAF	: Platelet Aktive edici Faktör
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SC	: Shark Cartilage (KÖPEK BALIĞI KIKIRDAĞI)
SLO	: Shark Liver Oil (KÖPEK BALIĞI KARACİĞER YAĞI)
SOD	: Superoxide Dismutase
SPARC	: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
TAT	: Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi
TNF α	: Tumor Nekroz Faktörü- Alfa
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı
ÜSY	: Üst Solunum Yolları
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WHO	: World Health Organization(Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Formaldehit Kimyasal Yapısı	5
Şekil 2. 1,2-Dimethylhydrazine kimyasal yapısı	7
Şekil 3. Tümör Büyüme, yayılma ve metastazda angiogenesis'in rolü.....	11
Şekil 4. Squalen Kimyasal Yapısı.....	33
Şekil 5. Chondroitin Sulfate-4(A)- Shark Cartilage / Chondroitin Sulfate-6 C.....	34
Şekil 6. Tnf- α izlediği yollar açısından kazpazlar üzerinden giderse apoptozise neden olmakta seramidler ve MEKK ler üzerinden (p38 aracılığı ile) giderse gen ekspresyonu ile yaşamsal faaliyetlere sebep olmaktadır.	39
Şekil 7. P53 ün izlediği yollar	41
Şekil 8. Ratların gruplara göre sınıflandırılması.	61
Şekil 9. Kolon Kanseri Oluşturmak İçin DMH Verilen Ratların Patoloji Sonuçları. 86	
Şekil 10. FA Verilerek Akciğer Hasarı Oluşturulan Ratların Patoloji Sonuçları.	88

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Dukes sınıflandırması	17
Tablo 2. DMH Verilerek Kolon Kanseri Yapılan Rat Grubuna Ait Biyokimya Sonuçları	71
Tablo 3. DMH; DMH + SC ve DMH + SLO iyileştirmelerine göre karşılaştırılması.	72
Tablo 4. FA Verilerek Akciğer Hasarı Oluşturulan Rat Grubuna Ait Biyokimya Sonuçları.	73
Tablo 5. FA; FA + SC ve FA + SLO iyileştirmelerine göre karşılaştırılması.	74
Tablo 6. DMH içeren grupların iyileştirmelerine yönelik kontrol grubu ile karşılaştırılması.	75
Tablo 7. FA içeren grupların iyileştirmelerine yönelik kontrol grubu ile karşılaştırılması	76
Tablo 8. FA Verilerek Akciğer Hasarı Oluşumunda Skorlama Tablosu	90
Tablo 9. DMH Verilerek Kolon Kanseri Oluşumunda Skorlama Tablosu	90

GRAFİKLER

Grafik 1. FA verilen ve kontrol grubunun MDA değerlerini gösteren grafik.....	77
Grafik 2. FA verilen ve kontrol grubunun CAT değerlerini gösteren grafik.	78
Grafik 3. FA verilen ve kontrol grubunun GPX değerlerini gösteren grafik.	79
Grafik 4. DMH verilen ve Kontrol grubunun CA19-9 değerlerini gösteren grafik. ..	80
Grafik 5. Rat Beta aktin kontrol geni çalışma profili.....	81
Grafik 6. DMH- Genetik Analiz Grafiği	82
Grafik 7.DMH+SC-Genetik Analiz Grafiği.....	82
Grafik 8. DMH+SLO-Genetik Analiz Grafiği.....	82
Grafik 9.FA -Genetik Analiz Grafiği	84
Grafik 10. FA+SC -Genetik Analiz Grafiği.....	84
Grafik 11. FA+SLO -Genetik Analiz Grafiği	84
Grafik 12. IC50 etkin doz değeri grafiği (6. saatte ve 120mg doz).	91
Grafik 13. IC50 etkin doz değeri grafiği (24. saatte ve 200mg doz).	92

1. GİRİŞ

Kanser hastalığının günümüzde en büyük sağlık sorunlarından biri olduğu bilinen bir gerçektir. Dünyada erkek ve kadınlarda en çok görülen beş kanser türü sırasıyla; mide, akciğer, meme, kolon-rektum ve serviks kanserleri olarak tesbit edilmiştir. Kanser çeşitlerinin görülme oranı; yaş, cinsiyet, kanserin geliştiği organ ve çevresel faktörlere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir.

Tarih boyunca kanser bütün omurgalı canlılarda görülmüştür. Eski dönemlerde dinazorların dahi kansere yakalandığı bilinmektedir. Kanser, anormal ve kontrol dışı hücre bölünmesi sonucu gelişen kötü huylu hücre büyümesi demektir. Dokulara yerleştiği gibi lenf sistemi veya kan dolaşımı yoluyla da diğer organlara yayılabilmektedir. Sindirim sistemi neoplazmaları arasında en sık rastlanılan olgular daha çok kalın barsakta yerleşen tümörlerdir (Perdue ve ark., 2008; Çevikbaş, 2003)

Kolorektal kanserler dünya çapında erkeklerde üçüncü kadınlarda ikincisi sırada görülen, 694.000 kişinin ölümüne neden olduğu bildirilen kanserlerdir. (Globocan, 2012). Son yıllarda bildirilen kanser ve kolon kanseri vakalarının sayısının artması bireylerde sağlık endişesini artırmıştır (Siegel ve ark., 2014). Kolon kanseri oranları diyet modelindeki değişiklikler nedeniyle artmaktadır. Dünya çapında yapılan epidemiyolojik araştırmalar, diyet ile gastrointestinal sistem tümörleri, özellikle kolorektal kanserler arasındaki ilişkiyi gözler önüne sermektedir. Bu araştırmalar et ile zengin bir beslenme şeklinin kanser olgularını artırdığını göstermiştir. (Siddique ve ark., 2017).

Güçlü bir karsinogen olan DMH'nin, insan kolonik epitelyal neoplazmalarının histopatolojisini taklit eden, rat kolonu kanserojenezini indüklediği bilinmektedir. DMH kemirgenlerde kolon kanseri oluşumunu uyarmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aktarul ve ark., 2017).

Neoplastik hastalıkların deneysel hayvan modelleri, insanlarda görülen kanser türlerinin etiolojik ve patofizyolojik süreçleri anlamak için oldukça önemlidir. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH) güçlü bir kolon karsinojeni olup, kolon kanseri üzerine özellikle diyetin etkileri ile ilgili çalışmalarda çok yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Karaca ve ark., 2010).

Hücrelerde, endojen ve eksojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikallerin immün sisteminin koruyucu etkisini aşacak kadar fazla oluşmaları sonucu, metabolizmada zararlı etkiler meydana gelebilmektedir. Serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı önlemek için vücutta antioksidan savunma sistemleri adı verilen savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla hücre zararını, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek yani serbest radikalleri toplayarak engeller.

Başlıca endojen antioksidanlar içerisinde süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, b- karoten, a-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, seruloplazmin, transferin ve ferritini sayabiliriz (Çelikezen ve Ertekin, 2008).

Günlük hayatta bilmeden soluduğumuz dumanlar, gazlar, buharlar, tozlar ve solunan başka maddeler akciğerler ve diğer organlar için toksik etkiler gösterebilmektedir. Bu tip toksik inhalerlere iş ortamında, evde, halka açık alanlarda ve diğer ortamlarda maruz kalınabilmektedir. Bu maruziyetler; üst solunum yollarının hafif irritasyonundan pulmoner ödeme ve ölüme kadar giden tablolara neden olabilmektedir. Amonyak, sülfür dioksit, hidrojen klorid gibi inhalerler üst solunum yollarında(ÜSY) çabuk irritan hasara neden olurlar. ÜSY, cild ve diğer organlarda ortaya çıkan bu akut etkiler, kişiye alandan hemen uzaklaşma ve ilave etkilerden korunma olanağı sağlar. Ozon, fosgen, azot oksitleri gibi inhalerlerin ise ÜSY'larına böyle akut etkileri neredeyse hiç yoktur ya da çok azdır. Bunların toksik etkileri, terminal bronşiol ve alveollerde görülmektedir.

Dezavantaj olarak, akut ÜSY irritasyonu semptomları yaşamayan bireyler ortamda bulunmaya ve farkında olmadan maruz kalmaya devam ederler. Formaldehit ise canlılarda aminoasitlerle reaksiyona girerek epitel hücre hasarına neden olan toksik ara ürünler oluşturmaktadır (Balkissoon, 2002; Brooks ve Stuart, 2007; Ryon ve Rom, 2011; Dickson ve Schwartz, 2008; Schwartz, 1987).

Aldehit grubundan olan FA, suda iyi çözünür, renksiz, keskin kokuludur ve kimyasal formülü CH_2O ' dir. Kuvvetli elektrofilik özelliği nedeniyle oldukça reaktif bir maddedir ve oda sıcaklığında gaz haline geçebilir (Zararsız ve ark., 2004a). FA vücuda alındıktan sonra karaciğerde ve eritrositlerde formaldehit dehidrogenaz enzimi (FDH) katalizörlüğünde formik asite metabolize olur. FA vücutta depo edilmez, ya formik asite dönüşerek idrar ve feçes(gaita) yoluyla ya da karbondioksit okside olarak solunum yoluyla vücuttan atılır (Usanmaz ve ark., 2002).

Formaldehit kimyasal özellikleri nedeniyle çok yaygın olarak kullanılan, organizmanın doğal yapısında da yer alan kimyasal bir maddedir. Endüstriyel alanda kontra plak, sunta, yalıtım malzemeleri, boya ve plastik malzemelerin yapımında kullanılmaktadır. Tıp alanında ise, anatomi, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında tespit solüsyonu olarak ve klinikte dezenfeksiyon amaçlı kullanılmaktadır. Özellikle anatomistler ve diseksiyon dersindeki tıp öğrencileri FA gazından çok sık etkilenirler. Ayrıca, günlük hayatta FA içeren ürünlerin ev ve işyerinde kullanılması (duvar boyası, mobilyalar, cila kaplamalar, deodorantlar, temizlik ürünleri v.b), yine çevresel etkenlerle maruziyet (fuel-oil ve odunun yanması ile, ekzos gazı ve sigara dumanı gibi) etkilenmeyi daha da artırmaktadır (Zararsız ve ark., 2004a; Usanmaz ve ark., 2002).

Formaldehitin solunum sistemi toksisitesi, düşük konsantrasyonlarda bile ortaya çıkmaktadır. Akut etkilenmelerde burun ve boğazda yanma hissi, nefes darlığı, öksürük, hırıltılı solunum gibi klinik semptomlara neden olmaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise, pulmoner ödem, inflamasyon ve pnömoni gelişmektedir (Zararsız ve ark., 2004a; Kriebel ve ark., 2001).

Doğal ortamlarda maruz kalınan FA'nın, erişkinlerde ve özellikle çocuklarda solunum yolu hastalıklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu bulguları oluşturan spesifik mekanizmalar henüz belirlenmemiş olmasına rağmen formaldehitin indirekt olarak solunum epitelini etkileyerek inflamatuvar reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Zararsız ve ark., 2004b; Franklin ve ark., 2000; Özen ve Sarsılmaz 2000). Mesleki olarak formaldehite maruz kalan işçiler arasında akciğer kanserinden ölüm oranının %30 daha fazla olduğu belirtilmiştir (Zararsız ve ark., 2004b).

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile, sistemik olarak uygulanan formaldehitin akciğer üzerine toksik etkileri ve bu toksik etkilere karşı SC(shark cartilage- köpek balığı kıkırdağı) ve SLO(shark liver oil-köpek balığı karaciğer yağı)' nun koruyucu etkisini; kolonda tümör gelişimi ile DMH arasındaki ilişki ve SC ve SLO' nun koruyucu etkisini patolojik, genetik ve biyokimyasal düzeylerde araştırmak amaçlanmıştır.

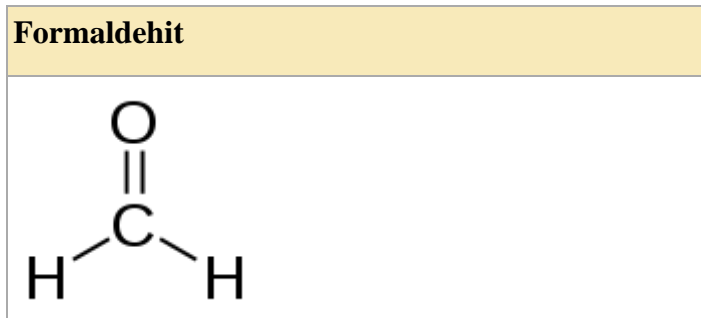
2. GENEL BİLGİLER

2.1. FA Hakkında Genel Bilgi

Sıvı olarak metanolün oksidasyonundan elde edilen FA (CH₂O), aldehit ailesinin önemli bir üyesidir. FA kuvvetli elektrofilik özelliği sayesinde oldukça reaktif bir özelliğe sahiptir. Oda sıcaklığında gaz haline bulunur, yanabilen bir yapısı vardır, suda iyi çözünür, renksizdir, keskin kokulu, irrite edici ve düşük molekül ağırlıklı zehirleyici bir gazdır (Ünsaldı ve Çiftçi, 2010).

Formaldehit inşaat, kağıt ürün, reçine, yalıtım malzemesi, ahşap, kompozit, tekstil, boya, plastik, yapışkan ve kozmetik dahil olmak üzere çeşitli sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. FA aynı zamanda her yerde bulunan mobilya, inşaat malzemeleri ve sunta vb ile de kapalı hava kirleticisidir (Beatriz ve ark., 2015).

Formaldehit yaygın olarak kullanılan bir endüstriyel kimyasal madde ve her yerde bulunan atmosferik kirleticidir. FA, artan risklere dayanarak mesleki açıdan maruz kalmış popülasyonlarda nazofaringeal kanserler için önce insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır. Geçmişte yapılan epidemiyolojik çalışmalarda FA ve lösemi riskleri ile mesleki inhalasyon maruziyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler bulunmuştur (Sara ve ark., 2015).

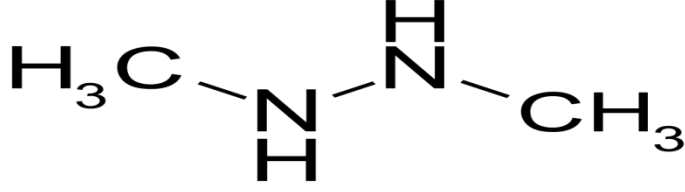


Şekil 1. Formaldehit Kimyasal Yapısı

2.1.1. Akciğer Hasarına Neden Olan Etkenler

İrritanlara maruz kalarak ÜSY'ları hasarlanan kişilerde sıklıkla müköz membranlar ve ciltte de hasar görülür. Maruz kalan ciltte ve korneada yanıklar, rinit, konjunktivit, trakeobronşit ve oral mukozitler mevcuttur. Gözlerde, burunda ve boğazda yanma hissi; gözyaşında ve balgam miktarında artış vardır. Bazı maruziyetlerde yaşamı kısıtlayan mukozal ödeme bağlı ÜSY obstrüksiyonu, aşırı sekresyon, epitel hücrelerinin dökülmesi, laringospazm da görülebilir. Çeşitli gaz ve aerosollere olan maruziyet sonrası gelişen hasar, birincil olarak epitelyum hücreleri arasındaki gevşek yüzeylerde görülür. İrritan ajanlar ilk önce düz kaslarda bronkokonstriktif etki, afferent sinir uçlarında parasempatik stimülasyon yaparlar ve böylece yaygın bronkokonstriksiyon geliştirirler. İrritan gaz ve aerosollere maruziyet bronşlarda fazla hassasiyete sebep olur. Allerjenler ve irritanlarla yapılan inhalasyon çalışmaları sonunda, maruziyetten sonra saatler içerisinde hava yolları ve alveoler mesafede nötrofil ve eozinofillerin toplandığı ve bu birikimin en az 48 saat devam ettiği görülmüştür. (Balkissoon, 2002; Brooks ve Stuart, 2007; Ryon ve Rom, 2011; Dickson ve Schwartz, 2008; Schwartz, 1987).

2.2. DMH Hakkında Genel Bilgi



Şekil 2. 1,2-Dimethylhydrazine kimyasal yapısı

Bir metil hidrazin türevi olan 1,2 dimetilhidrazin (DMH), organizmada metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek sureti ile etkinlik kazanan bir ajandır. DNA moleküllerini metilleyerek mutajenik etki yapan DMH, aynı zamanda RNA ve dolayısıyla protein sentezini de bozar. Bu madde ile karsinogenesisin başlamasındaki esas yol; DMH'in karaciğerde azoksimetan ve azoksimetanol'e dönüşmesidir. (Azoksimetan biyolojik araştırmalarda kullanılan kanserojen ve nörotoksik bir bileşiktir. Azometanın oksitidir ve kolon karsinoması indüksiyonu için özellikle etkilidir). Azoksimetanol daha sonra kolon lümeninde bakteriyel hidrolize uğramak suretiyle aktif karsinojen maddelere dönüşürler. (Kuraguchi, 2001; Newell, 2004; Lai ve Xu, 2007).

2.2.1. Kolon Kanserine Neden Olan Etkenler

Kolorektal kanserlerin etiyolojisi tam anlamıyla bilinmemekle beraber bazı faktörlerin kolorektal kanser oluşumu ile ilgili olduğu bilinmektedir (Erer ve Kıran, 2005).

Diyete bağlı faktörler: Diyetle ilgili en çok dikkati çeken faktörler; emilmeyen bitkisel liflerden fakir içerik, buna karşılık zengin birleşmiş karbonhidrat içeriği yüksek yağ miktarı, A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu vitaminlerin az tüketimidir.

Düşük lif içeriğinin, dışkı hacminin az olmasına, dışkının bağırsakta kalma süresinin uzamasına ve bağırsaktaki bakteriyal floranın değişmesine yol açtığı öne sürülmektedir. Bakteriler tarafından parçalanan karbonhidratların; potansiyel olarak toksik olan oksidatif ürünleri, dışkı içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve kolonik mukoza daha uzun süreyle bunlara maruz kalır. Yüksek yağ tüketimi karaciğer tarafından kolesterol ve safra asitleri üretimini artırır. Bunlar; intestinal bakteriler tarafından potansiyel karsinogen maddelere dönüştürülebilirler (Çevikbaş, 2003).

Yaşam tarzı ile ilgili faktörler: Vücut yapısının kolorektal kanserle ilişkili olduğu ve aşırı kilo ile kolorektal kanser arasında korelasyonun olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Hayvanlarda yapılan çalışmalar kalorik sınırlamanın sıçan ve farelerde tümör oluşumunu azaltabileceğini göstermiştir (Sandler, 1993). Sigara kullanımı da kolorektal kanser için bir risk faktörüdür. Yapılan prospektif çalışmalar uzun süre sigara içme ile kolorektal kanser riskinin arttığını göstermektedir. Bunlara ilaveten boş zamanlarda yapılan aktivite ve mesleki aktivitenin her ikisi de kolorektal kanser riski açısından önem arz etmektedir. Fiziksel aktivitenin kolorektal kanser için önleyici etkisi kolonik motiliteyi artırmasından dolayıdır. Egzersiz kolon içeriğinin geçiş süresini hızlandırarak intestinal içerikteki potansiyonel kanserojenlerin kolon mukozasına temasını azaltmaktadır (Bresalier ve Kim, 1998; Ergenoğlu, 1999).

Kimyasallar: Gıdalarda kullanılan bazı renklendiriciler (E102, E104, E122, E124, E128, E129, gibi) ile kanser insidansı arasında yakın ilişki vardır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, azo boyaları, nitrozaminaller ve nitrozamidler, hidrazo ve azoksi yapılar, karbamatlar, halojenli yapılar, metaller, metalloidler, alkilleyici ajanlar, aldehitler, fenoller ve peroksi yapısında ki maddeler birincil kanser oluşturma yeteneğine sahiptir (Kerbel 2000).

Kalıtsal faktörler: Çevresel faktörlerin yanı sıra kalıtsal faktörlerde kolorektal kanserlerin gelişiminde önemli bir rol oynar. Familial polipozis veya adenomu olanlarda kanserin daha sık görüldüğü bilinmektedir. Kalın bağırsak kanserlerinin % 5-10'u familial eğilimli olan bireylerde görülür. Bu tür kansere yakalananların yaklaşık 1/3'ünün birinci derecedeki yakınlarında kanser vardır. Bu bulgu genetik eğilimi göstermektedir (Çiftlikçi, 2002).

Familial adenomatöz polipoziste profilaktik kolektomi yapılmayanların hepsinde kolorektal kanser gelişir. Kolorektal kanser riskini arttığı diğer bir kalıtsal sendromda herediter nonpolipoid kolorektal kanserdir (Ergenoğlu, 1999; Mecklin, 2008).

2.2.2. Kanser Epidemiyolojisi

Kanser, herhangi bir doku ya da organın etkileyen, yayılıcı ve denetlenemeyen hücre çoğalması ile karakterize bir hastalıktır. Akciğer, kolorektal ve mide kanserleri her iki cinsten dünyada en yaygın görülen kanserlerdir. Erkeklerde akciğer ve mide, kadınlarda meme ve serviks kanserleri en yaygın kanserlerdir. Bir toplumda en çok görülen, en çok sakat bırakan ve en çok öldüren hastalıklar halk sağlığı yönünden en önemli hastalıklar ve halk sağlığı sorunlarıdır. Dünyada her yıl 10 milyondan fazla insana kanser tanısı konmakta, 6 milyon kişi de kanser nedeniyle yaşamını kaybetmektedir. Bu sayı dünyadaki toplam ölümlerin % 12'sidir.

Kanserlerin etyolojileri hakkında çok şey bilinmektedir ve kolorektal kanserlerin karsinogenezisinde iki kritik faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Bunlar oksidatif stres, üretim ve boşaltma işlemlerinin dengelenmesiyle düzenlenen reaktif oksijen, azot türleri ve enfeksiyonlardır. Kalın bağırsak iltahaplanması anlamına gelen kolit'in engellenmesinin, kolon kanseri oluşumunu azatlığı belirtilmektedir. Böylece oksidatif stres ile inflamasyon arasındaki geri besleme döngüsünün kesileceği bilinmektedir(Doi ve ark., 2017).

Çeşitli kanserlerin olası nedenlerini belirlemek ve gelecek için koruyucu önlemler alabilmek amacıyla yapılan coğrafik dağılım araştırmalarının henüz özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetersiz olması ile birlikte dünyanın bazı bölgelerinde, bazı kanser türlerine daha çok rastlandığı da dikkati çekmektedir. Örneğin: Özofagus kanseri Orta Asya, Arap yarımadası, Türkiye'nin doğusundan Kuzey Çin'e kadar uzanan bir kuşak içinde daha sık görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de birçok hastalığın kontrol altına alınmış olması, ortalama yaşam süresinin uzamasına neden olmuştur.

Türkiye'de ölüm kayıtlarında, gerçek ölüm nedeni yerine oldukça sık olarak pnömoni ve kalp yetmezliği gibi nedenlerin belirtilmesi, tedavi merkezlerinden uzakta ölen hastaların yakınlarının kesin tanı hakkındaki bilgilerinin yetersiz olması gibi nedenlerle kanserden ölüm oranları büyük bir olasılıkla gerçek sayıların altında kalmaktadır. Otopsi kayıtlarına göre ölümlerin çoğunun kanser nedeniyle gerçekleştiği bildirilmektedir. Türkiye'de kanserden ölüm hızını diğer ülkelerle karşılaştıracak olursak Türkiye'nin 41 ülke arasında erkeklerde 35. kadınlarda 38. sırayı aldığını görmekteyiz (Akgül ve Dosay Akbulut 2014).

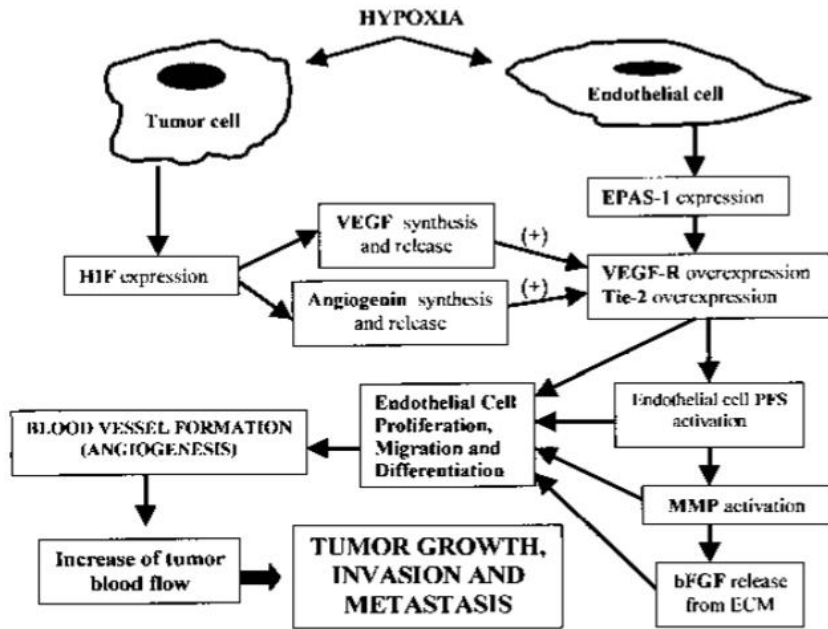
2.2.3. Karsinogenesis

Hücre çekirdeği DNA sentezi evresinde dış etkenlere açıktır. Bu evrede DNA sentezinde gelişen bir takım değişiklikler ve bu hücrenin mitozuyla doğan atipik hücreler kanserli hücreler olarak ortaya çıkar. Bu hücreler kontrolsüz bir biçimde çoğalırlar. Her kromozom bir DNA molekülü ile destekleyici proteinden oluşmuştur. Kalıtımın asıl birimleri ise kromozomların üzerindeki genlerdir ve her gen DNA molekülünün bir bölümüdür (Akgül ve Dosay Akbulut 2014).

Karsinogeneziste genetik hasar; çevresel faktörler, radyasyon, virüsler veya germ hattındaki kalıtım ile kazanılabilir. Üç tip regülatör gen büyümeyi teşvik eder. Protoonkogen, tümör supresör gen ve apoptozis genetik hasarın temel hedefidir. Protoonkogenlerde mutant aleller dominant olarak kabul edilir çünkü normal alel olmasına rağmen hücreleri transforme edebilir. Ancak tümör supresör genlerde her iki allelin mutant olması gerekir ki transformasyon devam edebilsin.

Kanser, X ışınları, kozmik ışınlar ya da diğer kanserojen etkenlerle DNA'daki baz sıralanışında meydana gelebilecek değişiklikler sonucu çekirdekdeki genetik sistemin tamamının ya da bir bölümünün mutasyona uğraması ile ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyon bazen kendiliğinden oluşabilmektedir. Böylece sınırsız oluşan ve üreyen bir kanser hücresi ortaya çıkmaktadır.

Kanserli dokular besin bakımından da normal dokulara ortak olur ve sayıları giderek arttığı için vücudun normal dokularını besin yetersizliği ile karşı karşıya bırakırlar (Akgül ve Dosay Akbulut 2014).



Şekil 3. Tümör Büyüme, yayılma ve metastazda angiogenesis'in rolü (González ve ark., 2001)

2.2.4. Kalın Bağırsak Tümörleri

Bağırsak tümörleri tüm dünyada önemli bir morbitide ve mortalite sebebidir. Rektum da dahil olmak üzere kolon, vücuttaki diğer organlardan daha fazla primer neoplazmin kaynak noktasıdır. Kolorektal kanserler ölümcül kanserler arasında, bronkojenik kanserlerden sonra ikinci sırada gelmektedir. Adenokarsinomlar, kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunu, gastrointestinal yoldan kaynaklanan tüm malignitelerin ise % 70'ini oluşturmaktadır (Perdue ve ark., 2008; Çevikbaş, 2003).

2.2.5. Kolon ve Rektum Kanserlerinin Histolojik Sınıflandırılması:

I) Epitelyal Tümörler

A) Benign (iyi huylu)

1) Adenom

a) Tubuler b) Villöz c) Tubulo-villöz

2) Polipozis sendromları

B) Malign (kötü huylu)

1) Adenokarsinom

2) Müsinöz adenokarsinom

3) Taşlı yüzük hücreli karsinom

4) Yassı hücreli Karsinom

5) Adenoskuamöz Karsinom

6) İndiferansiye Karsinom

7) Sınıflandırılmamış karsinom

II) Karsinoid Tümörler

III) Epitelyal Olmayan Tümörler

IV) Hemopoetik ve Lenfoid Neoplazmalar

V) Sınıflandırılmamış Tümörler

VI) Sekonder Tümörler

VII) Tümör Benzeri Lezyonlar (Canda, 1988).

2.2.6. Benign Epitelyal Tumorler

Polip ve polipoid lezyonlar içi boş organlarda lümene kabaran, yer kaplayan lezyonlardır. Patolojik açıdan polip benign ve malign mukozal gelişimler için kullanılırken, polipoid lezyon olarak tanımlananları iltihabi kitle, hamartom ve submukoza veya kas tabakasından kabaran tumorleri kapsar. Kolorektal polipler alışkanlık olarak iki major grupta kategorize edilirler, bunlar non-neoplastik ve neoplastiktir. Bütün epitelyal polipler kolon mukoza bezlerindeki kriptlerin derinindeki hücrelerden kaynaklanır. Normal olarak kolon mukozasındaki hücre bölünmesi kriptin en derin üçte birinde sınırlıdır. Muhtemelen epitelyal polip oluşumunda hücre bölünmesini kontrol eden mekanizma bozulur ve hiperplastik veya neoplastik lezyon oluşumuna yol açar.

Böylece kript hücrelerinin hafifçe genişlediği düzeyde gelişim kontrolündeki bazı kayıpların hiperplastik poliplere yol açtığı ileri sürülmektedir. Tüm kript boyunca kontrolün daha fazla kaybı neoplastik poliiple sonlanır. Non-neoplastik polipler kolon tumorleri sınıflandırılmasında tumor benzeri lezyonlar grubu içine yer alır. Bunların çoğu mukoza üzerinde küçük, meme başı benzeri, yarım küre şeklinde, düzgün çıkıntılar olarak izlenen hiperplastik poliplerdir. Tek tek görülebilirler fakat genelde çok sayıda olurlar. Histolojik olarak, bu polipler iyi diferansiye goblet hücreleri ya da absorptif epitel hücreleri ile döşeli, dar lamina propria ile birbirlerinden ayrılan çok sayıda kripta içerirler. Hiperplastik poliplerin büyük çoğunluğu malignite potansiyeline sahip değildirler (Çevikbaş, 2003; Erer ve Kıran, 2005).

Adenomlar

Adenomlar, genelde saplı küçük tumorlerden, çoğunlukla sesil büyük lezyonlara kadar değişen çeşitli yapı ve büyüklüklerde neoplastik poliplerdir. Adenomatöz polipler epitelyal karakterleri temel alınarak 3 gruba ayrılmıştır: villöz, tubulöz ve tubulovillöz (Çevikbaş, 2003; Erer ve Kıran, 2005).

2.2.7. Malign Epitelyal Tümörler

Kolon kanserleri hem erkek ve hem de dişide oldukça sık görülen bir kanser türü olması nedeni ile önemli onkolojik sorunlardan biridir. Kolon ve rektumun malign tümörlerinin ortalama %98'i histolojik olarak karsinom özelliğinde yani epitelyal kökenlidir (Çiftlikçi, 2002; Erer ve Kıran, 2005).

2.2.7.1. Adenokarsinom:

Tubuler, asiner veya papiller yapılar içeren bez epitelinin malign tümörüdür. Kolon ve rektum karsinomalarının çoğu uniform yapıya sahip olup mukus salgılar. Adenokarsinomda genellikle az sayıda, dağınık paneth ve argentaffin hücreler bulunur.

2.2.7.2. Müsinöz Adenokarsinom:

Tümörde genellikle makroskopik olarak görülebilen belirgin miktarda müsinin olduğu adenokarsinomdur. İki gelişim manzarası ile karşılaşılabılır. Bezler ve interstisyel aralıkta müsin vardır veya müsinle çevrili hücre grubu ve zincirleri bulunur. Sıklıkla tümör her iki gelişim manzarasını gösterebilir.

2.2.7.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom:

Mukusla dolu izole taşlı yüzük hücrelerinin belirgin olduğu malign tümördür.

2.2.7.4. Yassı Hücreli Karsinom:

Tamamen yassı hücrelerden oluşan kolon tümörü olup çok az görülür.

2.2.7.5. Adenoskuamöz Karsinom:

Bazı kanserler, özellikle anüse bitişik distal kolondakiler, yassı hücre diferansiyasyon odaklarına sahip olup bu nedenle adenoskuamöz karsinom olarak isimlendirilir.

2.2.7.6. İndiferansiye Karsinom:

Belirgin bez yapısının bulunmadığı malign epitelyal tümördür. Mukus salgısı gibi hücre tipini gösteren diğer bulgular yoktur. Muhtemelen nöroendokrin hücrelerden kaynaklanan küçük hücrelerden oluşur. Böyle neoplazmalar değişik hormonal sekretör ürünler salgılar.

2.2.7.7. Sınıflandırılmamış Karsinom:

Yukarıdaki kategorilerin hiçbirine girmeyen karsinomlar için kullanılır (Patroğlu, 1994).

2.2.8. Displazi

Genel tanımlamayla displazi basitçe anormal büyüme anlamına gelir. Prekanseroz lezyon olarak displazi belirli hücresel ve yapısal değişimlerle tanımlanmış dokudaki anormal durumlar olarak tarif edilir. Displazi malign dönüşüm eğilimindedir (Bresalier ve Kim, 1998; Çevikbaş, 2003).

2.2.9. Kolorektal Kanser İnsidansı

Küçük hayvanlarda kolon ve rektum kanserleri: Kedi ve köpeklerde, ağız boşluğunda oluşan tümörlerden sonra en yaygın gastrointestinal sistem tümörleri kolon ve rektumda meydana gelir. Bu tümörlerin görülme yaşı ortalama 6-9 yaş arasındadır (Slawiensk, 1997). Adenomatöz polipler kanin rektumunda görülen en yaygın tümör çeşididir (Holt ve Kucke, 1985). Bunların %40'ı iyi huylu ve %60'ı kötü huylu tümörlerdir (Wolf ve ark., 1997).

2.2.10. İnsanlarda Kolon ve Rektum Kanserleri

Kolorektal karsinomaların insidansı 60-70 yaşlarında en yüksek düzeyine ulaşır.

Hastaların %20'sinden daha azı 50 yaşın altındadır. Genç bir hastada kolorektal kanser tanısı konulduğunda, bu hastada daha önceden ülseratif kolit veya polipozis sendromlarından birinin varlığından şüphelenilmelidir (Bernstein, 2008; Çevikbaş, 2003).

Kolorektal kanserlerin görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre bir hayli değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Yeni Zelanda, İskandinavya ve batı Avrupa'da sık görülürken; Asya ve Afrika ülkelerinde daha az görülmektedir (Bresalier ve Kim, 1998).

Kolorektal kanserlerin gelişiminde hastalığın insidansında görülen bölgeler arasındaki farklılıklar coğrafik yatkınlığa işaret ederken, farklı hayat tarzlarının hastalık üzerindeki etkisi çevresel faktörlerin etkinliğini göstermektedir (Bresalier ve Kim, 1998).

2.2.11. Kolorektal Kanser Patolojisi

Kolon tümörleri denince akla adenomlar ve kolorektal karsinomlar gelir. Karsinomlar çoğunlukla tek başına oluşup sıklıkla kaynaklandıkları adenomatöz lezyonu yok ederler. Birden fazla karsinom mevcut ise, bunlar genellikle kolonun değişik bölgelerinde ve birbirlerinden uzakta yerleşirler. Bütün karsinomlar insitu lezyonlardan gelişmelerine rağmen, değişik morfolojilere sahiptirler. Proksimal kolon yerleşimli tümörler polipoid ve mantarimsi kitleler halinde büyüme eğilimindedirler.

Distal kolondaki karsinomlar duvarı çevreleyen anuler lezyonlar olup bağırsağı halka şeklinde çevreleyerek lümende daralmaya sebep olurlar. Neoplazmın bu iki formu da zaman içerisinde direkt olarak bağırsak duvarını geçer ve serozal yüzeyde sert kitleler halinde kendini gösterir (Bresalier ve Kim, 1998; Çevikbaş, 2003).

Kolorektal karsinomaların gelişiminde 3 evre olduğu bildirilir. Bu evreleri şematik olarak şöyle göstermek mümkündür (Çiftlikçi, 2002).

Preneoplastik evre: Normal mukoza→hiperproliferatif mukoza→displazi

↓

Prekanseröz evre: Tubuler adenom→tubulovillöz adenom→villöz adenom

↓

Karsinom evresi: İnsitu karsinom→invaziv karsinom→Metastaz

2.2.12. Kolorektal Karsinomunun Evrelendirilmesi

Rektal karsinomalar ilk kez 1932 yılında Dukes tarafından evrelendirilmiş ve daha sonra aynı sistem kolon karsinomaları içinde kullanılmıştır. Bu evrelendirme kolorektal karsinomalarda prognozu belirleme açısından önemlidir. Dukes sınıflandırmasını A, B ve C olmak üzere üç evreye ayırmıştır. Daha sonra Dukes sınıflandırılması yeniden modifiye edilmiştir (Aster-Coller modifikasyonu). En sık kullanılan modifiye Dukes sistemi aşağıdaki gibidir (Çiftlikçi, 2002; Canda, 1988).

Dukes Tipi	Neoplazmın Yerleşimi
A	Mukoza ile sınırlı
B	Tüm bağırsak duvarı tutulumu olup lenf nodu metastazı yoktur
B1	Muskularis proriaya ilerlemiş, fakat duvarı bütünüyle penetre etmemiş ve lenf nodu tutulumu yok
B2	Tüm duvar infiltre, lenf nodu tutulumu yok
C	Lenf nodu metastazı vardır. Bağırsak duvarı tutulum derinliğine bakılmaz
C1	Duvara sınırlı, lenf nodu tutulumu var
C2	Duvarın tüm tabakalarını tutmuş, serozaya yayılmış, lenf nodu tutulumu var
D	Metastaz var
D1	Komşu organlara invazyon var
D2	Uzak metastaz var

Tablo 1. Dukes sınıflandırması (Çiftlikçi, 2002; Canda, 1988).

2.2.13. Kolorektal Kanser Sağaltımı

Kalın bağırsak kanserleri genellikle cerrahi, kemoterapi ve/veya radyasyon (ışın/şua) seçeneklerinden birisi veya kombinasyonu ile sağaltılmaya çalışılır (Erer ve Kıran, 2005). Biyolojik tedavi gibi yeni tedavi yaklaşımları ile ilgili çalışmalar sürdürölmektedir (Virus sağaltımı, Gen sağaltımı, Nanoteknolojik ajanlar gibi). Bu yöntemler arasında cerrahi işlem kalın bağırsak kanseri için en sık kullanılan sağaltım çeşididir (Sandler, 1993).

Öte yandan kanser sağaltımında çeşitli ilaçlarda kullanılmaktadır (Erer ve Kıran, 2005). Ancak bu ilaçlar sitotoksiktir. Sitotoksik ilaçlar Hematolojik ve Non Hematolojik malignensilerde yaygın olarak kullanılan ajanlardır. Bazı hastalıklarda kanser türlerinde tam kürabilite sağlanırken, bazılarında da palyatif amaçlı kullanılmaktadır. İlaçların uygulanım sırasında uzun ve kısa süreli toksisiteleri hasta açısından önemli problemler arz etmektedir.

Toksisite doza bağlı olabileceği gibi, bazen dozla sınırlı olmamaktadır. Yine ilaç uygulanım sırasında ortaya çıkan diğer bir problem de ilaç direncidir. İlaç direncinin günümüzdeki bazı genetik dayanakları aydınlatılmıştır. MDR(multidrug resistance- birden çok ilaca direnç) ve p170(p-glycoprotein/170) genlerinin bulunmasıyla olgularda primer rezistans ve daha sonra gelişen direnç mekanizması anlaşılabilmiştir (Camphos ve ark., 1992).

Ayrıca ilaçlar arasında çapraz direnç olgusu da mevcuttur. Özellikle antra-cyclinler, vinca alkaloidleri, etoposide ve actinomycin-D ilaçları arasında bu tür bir direnç söz konusudur (Bilgir ve ark., 1995).

2.2.14. DMH'in Kolon Kanseri Üzerine Etkisi

Deneysel kolon kanseri, karsinojenin yüksek dozlarda kronik uygulanmasına bağlı olarak oluşan DNA hasarının tamir etme yeteneği azalmış hücreler tarafından tamir edilememesi sonucu oluşur. Kolonik mukoza, hayat süresi 100-120 saat olan kısa G₁ fazlı hücrelerden oluşur. Bazı organlarda eğer hücre bölünmesi gerçekleşmeden önce DNA tamiri tamamlanmamışsa DNA'daki hasarlar hücrelerin bir sonraki jenerasyonuna aktarılır. Bu sayede hatalar karsinojene kronik maruz kalma sürecinde bir bölgeye toplanır. DMH'a karsinojenik cevapta risk altındaki hücrelerin sayıca artışı önemli rol oynar.

Deneysel kanser oluşturmada indüktif periyot malignant büyümeye rehberlik edecek özelliklere sahip olan populasyona ulaşıncaya kadar geçen zaman olarak tanımlanmıştır. DMH alkali bir ajan olup, bu kimyasal ajan ile muamele nokta mutasyonları uyarır. DMH uygulaması kolonda apoptosisi uyardığı kadar insan kolon kanserinin özelliği olan kolonik epitelyal hücrelerdeki hücresel çoğalma artışında uyarır (Neweell ve Heddle, 2004).

DMH tarafından indüklenen deneysel kolonik tümörlerin epitelyal orjinli olup ve insan kolonik neoplazm'larına benzer histoloji, morfoloji ve anatomi sergilediği görülmüştür. DMH intramuskular, intrarektal, oral ve subkutan tarzda 4 yolla uygulanabilir. Ratlara DMH'ın oral olarak verilmesinin düşük tümör oranı (%14-30) ile sonuçlandığı bildirilmiş olup intrarektal uygulamanın ise 34. haftadan sonra kolonda hafif hiperplazi ve preneoplastik lezyonlara sebep olduğu rapor edilmiştir (Heijstek ve ark., 2005).

2.3. FA'in Akciğer Hasarı Üzerine Etkisi

FA vücuda alındıktan sonra karaciğerde ve eritrositlerde formaldehit dehidrogenaz enzimi (FDH) katalizörlüğünde formik asite metabolize olur. FA vücutta depo edilmez, ya formik asite dönüşerek idrar ve feçes(gaita) yoluyla ya da karbondioksit okside olarak solunum yoluyla vücuttan atılır (Usanmaz ve ark., 2002). Kimyasal formülü CH_2O olan FA, suda iyi çözünen, renksiz, keskin kokulu bir aldehittir. Kuvvetli elektrofilik özelliği nedeniyle oldukça reaktif bir maddedir ve oda sıcaklığında gaz haline geçebilir (Zararsız ve ark., 2004a).

Sıvı olarak metanolün oksidasyonundan elde edilen FA (CH_2O), aldehit ailesinin önemli bir üyesidir. FA kuvvetli elektrofilik özelliği sayesinde oldukça reaktif bir özelliğe sahiptir. Oda sıcaklığında gaz haline bulunur, yanabilen bir yapısı vardır, suda iyi çözünür, renksizdir, keskin kokulu, irrite edici ve düşük molekül ağırlıklı zehirleyici bir gazdır (Ünsaldı ve Çiftçi, 2010).

Formaldehit inşaat, kağıt ürün, reçine, yalıtım malzemesi, ahşap, kompozit, tekstil, boya, plastik, yapışkan ve kozmetik dahil olmak üzere çeşitli sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. FA aynı zamanda her yerde bulunan mobilya, inşaat malzemeleri ve sunta vb ile de kapalı hava kirleticisidir (Beatriz ve ark., 2015).

Formaldehitin solunum sistemi toksisitesi düşük konsantrasyonlarda bile ortaya çıkmaktadır. Akut etkilenmelerde burun ve boğazda yanma hissi, nefes darlığı, öksürük, hırıltılı solunum gibi klinik semptomlara neden olmaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise, pulmoner ödem, inflamasyon ve pnömoni gelişmektedir (Zararsız ve ark., 2004a; Kriebel ve ark., 2001).

Formaldehit yaygın olarak kullanılan bir endüstriyel kimyasal ve her yerde bulunan atmosferik kirleticidir. FA, artan risklere dayanarak mesleki açıdan maruz kalmış popülasyonlarda nazofaringeal kanserler için önce insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır. Geçmişte yapılan epidemiyolojik çalışmalarda FA ve lösemi riskleri ile mesleki inhalasyon maruziyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiler bulunmuştur (Sara ve ark., 2015).

2.4. Deney Hayvanı Seçimi

Yunan filozof ve fizikçi Aristotle (M.Ö. 384-322) tarafından yazılan ve günümüze kadar ulaşan bilgiler, hayvan deneyleri hakkındaki en eski bilgilerdir (Fox ve ark., 2002). İlk yazılı tıp kitabı olan Corpus Hippocraticum'da (yaklaşık M.Ö. 400); insan vücudunun işleyişini anlayabilmek için hayvanların kullanıldıkları da görülmektedir. Yaşayan hayvanlar üzerinde ilk bilimsel deneyi Erasistarus (M.Ö. 304-250) gerçekleştirmiştir. Domuz, köpek ve maymunlarda deneyler yapmış ve fizyoloji bilimine büyük katkılar sağlamış olan Galen (M. S. 130-201) Roma'da yaşamış ünlü bir doktor ve fizyologtur. Galen ile deneysel araştırmaların ilk çağı son bulmuş, Ortaçağ Avrupası'nda kilisenin de etkisiyle bilimsel çalışmalar önemli ölçüde duraklamıştır. Bu alandaki gelişmelerin durma noktasına gelmesi ile birlikte deneysel çalışmalara bin yıl kadar bir süre ara verilmiştir.

Araştırmalarda hayvanların yaygın olarak kullanılmaları geçen yüzyılın ortalarında Avrupa'da başlamıştır ve hızla çalışma alanları artmıştır. Fizyoloji, mikrobiyoloji, immünoloji, onkoloji, cerrahi ve farmakoloji gibi birçok biyomedikal alanda deney hayvanları modellenerek araştırmalar yapılmış ve sonra insan modellerine geçilmiştir (Svendsen, 1994).

Bilim ilerledikçe geliştirilen hücre kültürü, matematiksel hesap yöntemleri, simülasyon modelleri gibi in vitro yöntemler, araştırmalarda hayvanların kullanılıp kullanılmaması konusunda akıllarda soru bırakmıştır. Fakat geliştirilen bu in vitro yöntemlerde, etkilenen hücrelerin diğer hücreleri, dokuları, organları ve tüm organizmayı nasıl etkileyebileceğine kesin yanıt alınmamaktadır. Ayrıca hayvan modellerinin; insan davranışları, psikolojisi, yaşam kalitesi hakkında da bilgi veremeyeceği de düşünölmektedir (Deniz, 2011). Yine de “laboratuvar hayvan modeli”; biyoloji ve davranışların çalışılabileceği, kendiliğinden gelişen veya uyarılmış bir patolojinin araştırılabileceği, biyolojik olarak insana benzeyen iyi ve tek araştırma modelidir (Svendsen, 1994).

2.4.1. Ratlar ve Bağışıklık Sistemleri

Rattus norvegicus'tan köken alan ratlar, deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Bu amaçla, Philedelpihia'da Wistar Enstitüsü'nde ilk rat soyu üretilmeye başlanmıştır. Wistar Albino soyundan köken alan inbred soyların büyük bölümü günümüzde araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Temel tıp, farmakoloji, gıda, davranış vb. birçok alanda yapılan araştırmalarda çoğunlukla ratlar kullanılmaktadır. Genetik olarak belirlenmiş tam olarak 400 inbred ve 50 outbred soy bulunmaktadır.

Ratların anatomisine baktığımızda; orbitanın medialine yerleşmiş “Harderian bezleri” ni görmekteyiz. Harderian bezleri porfirin içeren kırmızı-kahverengi salgı üretirler. Sağlıklı ratlar normalde bu salgıyı temizlerler. Fakat strese girdikleri zaman (beslenme yetersizliği, dehidratasyon, hastalanma, çevresel stresörler vb.) ise bu işlemden aksaklıklar görülür. Bu durum normal şartlarda ratların sağlık durumları hakkında bilgi veren bir göstergedir. Kuyruk uzunluğu ile birlikte boyları 20-25 cm kadardır.

Araştırmalarda en çok kullanılan ikinci ırk ise kuyrukları uzun ve kılsız olan Sprague-Dawley'dir ve Wistar ratlardan daha büyüklerdir. Kafatası, omurga, sternum, pektoral kuşak, pelvik çatı ve iki çift ekstremiteden oluşan iskelet sistemleri vardır. Mideleri iki bölümden oluşur; bunlardan biri kardiyak bölüm, diğeri glandüler bir yapıya sahip olan pilorik bölümdür. Akciğler kalbi her yönden saran, solda tek lob, sağda ise dört lobtan oluşmuştur (Festing ve ark., 2008).

2.5. Alternatif Tedavi ve Yöntemleri

Amerikan Hükümetinde TAT yöntemlerine halkın ve hastaların gittikçe artan ilgisi olması sebebiyle Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından (NIH- The US Government National Institutes for Health) 1998 yılında; araştırmalar yapmak, TAT yöntemleri hakkında tavsiyelerde bulunmak ve rehberlik etmek için 'Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp için Amerikan Ulusal Sağlık Merkezi (NCCAM-The US National Institutes of Health Center for Complementary and Alternative Medicine) kurulmuştur. NCCAM, yaptığı sınıflamada TAT yöntemlerini 5 gruba ayırmıştır.

2.5.1. Alternatif Tıp Sistemleri:

Genel olarak doğu veya yakın zamanda batı toplumlarının da benimsediği tedavi yöntemlerini temsil eder. Tıbbi tedaviden bağımsızdır. Ayurvedik Tıp, Geleneksel Çin Tıbbı, Geleneksel Tibet Tıbbı gibi geleneksel doğu tıp sistemleri ve Homeopati, Naturopati gibi batıda gelişen sistemleri içerir.

2.5.2. Zihin-Beden Tıbbı:

Beden sağlığını zihinsel uygulamalarla etkilemeyi amaçlayan yöntemler bu gruba girer. Sanat Terapisi, Biyo-geridönüş, Meditasyon, NLP, Rahatlama, Maneviyatçılık ve Yoga bu yöntemler bu gruptadır.

2.5.3. Biyoloji Bazlı Terapiler:

Bitkiler, vitaminler, diyetler ve diğel doğal ürünler biyoloji bazlı terapilerdendir.

2.5.4. Manipülatif ve Beden Bazlı Yöntemler:

Bedenin hareketine bağılı terapi yöntemleridir. Şiropatik, Osteopati, Cranio-Sakral Terapi, Masaj, Alexander Tekniğı bu tür yöntemler grubundadır.

2.5.5. Enerji Terapileri:

İki tür enerji terapisi var olduğı kabul edilir. Birincisi; mıknatıslarla değışken ya da doğrudan akım alanları oluşturularak uygulanan terapilerdir. Bunlara aynı zamanda biyo-elektromanyetik terapiler de denir. İkinci tür enerji terapileri ise biyo-alan terapileridir. Biyo-alan terapileri akupunktur, akupresür, biyoenerji, qi gung, refleksoloji, reiki, shiatsu, tai chi gibi terapilerdir (Yıldız, 2006).

2.5.6. TAT Yöntemlerinde Tıbbi Bitkilerin Yeri ve Önemi

Son zamanlarda echinacea, ginseng, ginko, kantaron ve aloe vera vb. bitkisel droglar ecza dolaplarımızda fazla miktarlarda bulunmaktadır. WHO yayınladığı raporlarda 90'dan fazla ülkede 20.000'den fazla bitkinin tıbbi tedavi amacıyla kullanıldığını bildirmiştir. Veriler tüm dünya ülkelerinde tamamlayıcı tıp adıyla hastalıkların tedavisi için tıbbi bitkilerin yaygın olarak kullanıldığını ve bu bitkilere olan ilginin her gün daha da arttığını göstermektedir. Özellikle son yıllarda aromaterapiye olan ilgi daha da artmış, Çin tıbbi yeniden keşfedilmeye başlanmıştır(Baydar, 2005).

2.5.7. Tıbbi Bitkilerin Tarihi

İlk çağlardan beri bitkiler, her zaman insanların temel besin kaynakları ve ilk ilaçları olmuşlardır. İlk çağlarda insanlar bitkilerin hangilerinin yenebileceğini, hangilerinin zehirli olduğunu deneme yanılma yoluyla bulmuşlar, birçok önemli kültür bitkilerini ve tıbbi bitkileri bu yolla öğrenmişlerdir. Toplayarak elde ettikleri ya da kültür yoluyla ürettikleri bitkilerin etken maddelerini, basit yöntemler kullanarak çıkartmayı başarmışlardır.

İnsanların ilk çağlarda hastalıkların tedavisi için bitkiler kadar yardım bekledikleri tanrılar ve doğaüstü güçler de vardı. Örneğin Hititlerin veba, kolera ve tifo gibi salgın hastalıkların insanları cezalandırmak için tanrılar tarafından gönderildiğine inandıkları ve tanrıya salgını durdurması için kurban kestikleri söylenmektedir. Halkını veba salgınından koruması için Hitit kralı 2. Murşiliş Tanrıya yalvarmış ve yardım beklemiştir. İnsanları hastalıktan koruduğuna inanılan mitolojik tanrılar, Eski Yunanistan' da da mevcuttu.

Sümerler, Asurlar, Mısırlılar, Hititler, Grekler, Yunanlar, Romalılar, Astekler, İnkalar ve Çinliler'de tıbbi bitkilerden hastalıkların tedavisi için faydalanmaya çalışmışlardır. Örneğin, Mısırlılar mumya yaparken birçok kokulu bitki kullanmışlardır. MÖ 1500 yıllarında yazıldığı tesbit edilen bir Mısır papirusunda; 77 kadar bitkisel, hayvansal ve mineral drog ve aynı zamanda 800'den fazla reçete bulunduğu göze çarpmaktadır. İslam kültüründe de şifalı bitkilerle tedavi yöntemlerinin çok önemli bir yeri vardır. Önemli İslam tabipleri de, İslam inancına göre ölüm dışında her hastalığın bir çaresi olduğunu ve bitkilerin de bu şifanın önemli kaynaklarından olduğunu vurgulayarak, hastalıkların tedavisinde bitkilerden yararlanma konusunda sayısız eserler verdikleri görülmektedir.

Aktar (attar) terimi, ilaç yapımında kullanılan bitkisel, hayvansal ve mineral maddeleri içeren drogları satan kişi için kullanılmaktadır. Lokman hekim, bitkilerin dilinden anlayan ve birbirleriyle konuştuğu söylenen çiçeklerden ölümsüzlük ilacını elde etmeyi başarmış fakat yazdığı ilaç reçetesini Asi nehirden geçerken elinden düşürmüş, böylece ismi efsane olmuş bir halk hekimidir. (Baydar, 2005).

2.5.8. Kanser Hastalarının Kullandıkları Bazı Bitkiler ve Terapi Çeşitleri

Kanser hastalarından alternatif tedavi yöntemleri ile ilgilenenler, en başta ısırgan otu olmak üzere birçok bitkiyi tıbbi tedaviye destek olmak veya rahatlamak amaçlı kullanmaktadırlar.

Son yıllarda popülaritesi artan diğer bir terapi çeşidi olan aromaterapi; uçucu yağların değişik kullanım şekillerini içeren, beden ve ruh sağlığını iyileştirme amaçlı kullanılan, uçucu yağların cilt ve mukoza üzerinden veya koku yoluyla ruha ve duygulara etki etmesini sağlamayı amaçlayan bir alternatif yöntemdir.

Aromaterapide uçucu yağlar koku nöronları ile beyne iletiklerinde salgılanan nörokimyasal enzimler (hormonlar), insanda farklı etkiler gösterirler. Bu salınan hormonlardan ensefalin(ağrı kesici), endorfin(cinsel uyarıcı), seratonin(sakinleştirici) ve noradrenalin(uyarıcı) etki ederek vücuda fayda sağlar (Baydar, 2005).

2.6. Köpek Balığının Bağışıklık Sistemi

Köpekbalıklarının okyanuslarda 400 milyon yıldan daha uzun süredir yaşadığı bilinmektedir. Birçok felakete rağmen hayatta kalmayı başaran köpek balıklarının gezegenimizdeki en güçlü hayvanlardan biri olduğu bilinmektedir. Bunun sebeplerinden biri; güçlü bağışıklık sistemlerine sahip olmalarıdır.

Köpek balıkları nadiren kanser olur ve uzun süre kansere direnç gösterebilirler. Bilim insanları yıllardır köpekbalığının kanseri önleyen bağışıklık sistemi bağlantılarını anlamaya çalışmaktadırlar (Dosay Akbulut ve Akgül, 2014).

Kıkırdaklı balıklar evrim içinde birçok farklı başarılı adaptasyon teknikleri geliştirmiştir. Yeterli düzeyde yavrular üretmek suretiyle yok olma dalgalarına karşı hayatta kalabilirler, morfolojik, davranışsal, ekolojik ve taksonomik çeşitliliğiyle çeşitli taksonomik seviyelerde uzmanlaşabilir ve vücutlarını radyasyona uyarlayabilirler. Ayrıca, çok etkili yırtıcı olabilirler ve hassas zihinsel sistemi, beyinleri ve özel şekillendirilmiş üst çene yapıları ile diğer avcılara karşı başarılı bir şekilde hayatta kalabilirler (Dosay Akbulut ve Akgül, 2014).

Köpek balıklarında yüksek düzeyde ürenin bulunmasının kansere karşı bir koruyuculuk yaratmış olabileceğinden bahsedilen yayınlar mevcuttur. Köpek balıklarında yüksek düzeyde intra ve intercellüler üre mevcut olup, bunu tuzlu suda ozmotik adaptasyon için kullanmaktadırlar. Bunun anlamıda şöyle açıklanmaktadır; yüksek düzeydeki üre DNA transkripsiyonunu bozarak marine elasmobranlarda bulunan inaktif protein üretimine neden olmaktadır. Bu grup balıklarda evrimin çok özel şartlarda gerçekleştiği buna bağlı olarak da memelilere kıyasla amino asitlerde korunmanın daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca; köpek balıklarında bazı proteinler belirgin amino asitleri kullanarak hücresel strese karşı adaptasyon sağlayarak normal fonksiyonlarını yapabilmek için üreye ihtiyaç gösterir. Ek olarak memelilerle karşılaştırınca köpek balıkları daha düşük termostatik yeteneğe sahiptir. Buna göre yapılarındaki proteinler daha geniş aralıklı sıcaklarda fonksiyon gösterebilmektedir. Köpek balıkları ile memelileri amino asit değişim oran ve yapısı açısından kıyasladığımızda; amino asit değişim oranı memelilere oranla köpek balıklarında mitochondrial cytochrome b gen sekans analizine göre 6 kez daha yavaş bulunmuştur (Patra ve Sandell, 2012).

Daha yavaş mutasyon oranı ile bunun açıklanabileceği ifade edilmiştir. Amino asit değişim yapısı ise 2 grupta da benzerdir. Amino asit değişim oranının yavaş olması başka bir deyişle daha fazla amino asit korunumu köpek balıklarında mutasyonun veya hücrelerin kansere yatkınlığının nadiren olduğu sonucunu doğurmaktadır.

Dokularında yüksek düzeyde iyonik dayanıklılık ve beraberinde gelen yüksek vücut sıcaklığının kıkırdaklı balıklarda tümör oluşumunun nadir görülmesine neden olduğu ifade edilmiştir (Rosen and Woodhead, 1980). Köpek balıklarında vücut sıcaklığı su sıcaklığından 7-10°C daha yüksektir. Zira dolaşım sistemi yardımı ile sıcaklık içeride hapsolür. Bu özel durum antijenleri elemine edip, %100 bağışıklık sağlamaktadır. Buna göre; eğer mitoz bölünmede represör moleküller operatör bölgesine bağlanamazsa başkaca hiçbir yere bağlanamaz diye açıklama yapılmıştır. Mitoz bölünmede iğ filamentlerinin fonksiyonu bazı alkoloidlerce zarar görürse (ör; colchisin) iğ filamentlerin protein oluşumu ve kromatid ayrımı engellenir. Böylece hücre bölünmesi tamamlanamaz. Yani kanserojen bir etki meydana gelirse bunun metaztazi antimitotik etki ile önlenmiş olur (Patra ve Sandell, 2012).

Tüm bu köpek balığı da dahil kıkırdaklı balıklarda görülen özel durum ve ortamlar kansere karşı koruyucu mekanizma oluşmasına neden olmaktadır. Kansere karşı etkili tedavinin bulunması için birçok farklı yöntem ve malzeme test edilmiştir. Bu yeni malzemelerden bazıları köpek balıklarıyla ilgilidir. Köpekbalıklarıyla ilgili bazı materyallerin kansere karşı muhtemel etkileri arasındaki ilişkiyi bulmak için devam eden birçok araştırma bulunmaktadır. Bu tezde köpekbalığı kıkırdağı ve karaciğer yağı esas alınarak kolon kanseri tedavisi ve akciğer hasarı iyileşmesi üzerine etkisi araştırılmıştır (Patra ve Sandell, 2012).

2.6.1. Köpek Balığı Kıkırdağı (SC) ve Koruyucu Etkisi

Anjiyogenezin, bir tümörün büyümesi için gerekli olduğu ve anjiyogeneze bağlı hastalıkların tedavisinde antianjiogenik ilaçların yararlı olduğu bilinmektedir. Kıkırdak bilinen avasküler doğasından dolayı, birçok kaynakta antianjiogenik bileşikler kaynağı olarak değerlendirilmiştir(Gonzalez ve ark., 2001).

Sığır ve köpekbalığı kıkırdağındaki antianjiogenik ve antitümör bileşiklerini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak köpekbalığı kıkırdağının, kanser ve diğer anjiyogeneze bağlı hastalıkların tedavisinde potansiyel faydasını araştıran çalışmalarda, köpekbalığı kıkırdağı kullanan kanser hastalarında oral köpekbalığı kıkırdağı kullanımının biyoyararlanımı gösteren veri bulunmamaktadır (Gonzalez ve ark., 2001).

Köpek balığı kıkırdağının tümör oluşumuna karşı çok kuvvetli bir inhibitör olduğu ifade edilmiştir. Köpek balığı kıkırdağından elde edilen protein içeriği tümör oluşumunu engelleyici sığır kıkırdağı ile benzer yapıya sahiptir. Köpek balığında sığırın yapısındaki kıkırdak miktarının neredeyse 10 katı kadar kıkırdak bulunmakta olup; 5 gr köpek balığı kıkırdağı ile 500 gr sığır kıkırdağının içerdiği miktarda tümör engelleyici bileşen karşılanabilmektedir. Kısaca köpek balığı kıkırdağı sığır kıkırdağından 1000 kez daha güçlü olup yapısal karşılaştırmayla beraber 100.000 kez daha fazla tümör baskılayıcı metaryal içermektedir. (Dosay Akbulut ve Akgül, 2014)

Köpek balığından extre edilen ve yeni bulunan bir polipeptit PG155'te de anti-anjiyojenik etki belirlenmiştir. PG155'in anti-anjiyojenik etkileri, zebra balığı embriyolarının in vivo modeli kullanılarak belirlenmiştir. Zebra embriyolarının tedavisinde 20 ug / ml PG155 kullanılması, subintestinal damarların büyümesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Daha yüksek bir doz endojen alkalın fosfataz (EAP) boyama testinden elde edilen subintestinal damarların neredeyse tamamen büyümesini engellemiştir (Zheng ve ark., 2007).

1988 yılında, Patricia D'Amore belirttiğine göre metazıtaz yeni kan damarlarının gelişmesine bağlı olup, damarlaşmanın engellenmesi metazıtazı önlemede etken olabileceği ifade edilmiştir. Tek bir damar sisteminin engellenmesinin birçok tümör hücresinin ölümüne veya engellenmesine neden olabileceği belirtilmiştir (Ross ve ark., 1994).

2.6.2. Köpek Balığı Kıkırdağı (SC) Kimyasal Yapısı

Kıkırdağın, avasküler dokular da dahil olmak üzere anti-anjiyojenik uygulamalar yoluyla kanser ve kanserle ilgili maligniteleri tedavi etmek için kullanılabilceği ifade edilmiştir. Kıkırdağ, bazı spesifik moleküller içerir. Bunlar, thrombospondin-1, kondromodülin-1, tip XVIII-türevi endostatin, SPARC (asitli ve sistein bakımından zengin salgılanan protein) ve tip II kollajen türevi N-terminal propeptid (PIIBNP) dir(Patra ve Sandell, 2012).

Bu spesifik moleküller antianjiyojenik veya antitümör özellikleri tamamen anlaşılmadan çalışmalarda kullanılmıştır. Örneğın, trombospondin-1, endostatin ve köpekbalığı-kıkırdağ türevi Neovostat preparatı, farklı kanserler türleri için test edilmiştir, ancak hala kanser önleyici ajanlar olarak iyileştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Patra ve Sandell, 2012).

2.6.3. Köpek Balığı Karaciğer Yağı (SLO) ve Koruyucu Etkisi

Alkylglycerols ve squalene enfeksiyon ve kansere karşı savaşta en önemli materyal olarak karşımıza çıkmaktadır. Köpek balığı karaciğer yağında yüksek düzeyde alkylglycerols ve squalene, ve -3 EFA'nın benzeri bulunmaktadır. Bu nedenle kansere ve enfeksiyonlara karşı kullanımda önemli bir alternatif kaynak olarak görülmektedir.

Bazı türlerinin karaciğeri, özellikle boya ve güzellik malzemesi yapımında kullanılarak değerlendirilebilen 350-400 litre kadar yağ verebilir ki bu miktar daha fazlaca tanınan diğer pek çok balık türünden elde edilenin 10 katıdır (Castro, 1996). Karaciğeri ayrıca oldukça yüksek düzeyde vitamin A da içermektedir.

Anti kanser kaynağı olarak köpek balığından alınan karaciğer yağı da araştırılmıştır. N-3 ailesinin esansiyel yağ asitlerinin (EFA), alkilgliserollerin ve squalenin de dahil olduğu balık yağı, sağlık bakımından çok önemlidir. N-3 EFA'nın, aterosklerozun önlenmesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Alkilgliseroller ve squalen, enfeksiyonlara ve kansere karşı mücadelede önemli faktörlerdendir. Köpekbalığı karaciğeri yağı; büyük miktarda alkilgliserol, squalen ve n-3 EFA içermektedir. Bu nedenle kanser tedavisinde, özellikle radyoterapide vücut direncinin yükseltilmesinde ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedir (Szostak, 2006).

Benzer bir çalışmada; köpekbalığı karaciğer yağı içinde squalene ve alkilgliserollerin her ikisinde varlığı tesbit edilmiştir. Bu alışma, köpekbalığı karaciğeri yağının çeşitli kanser türlerinin tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir (Lewkowicz ve ark., 2006).

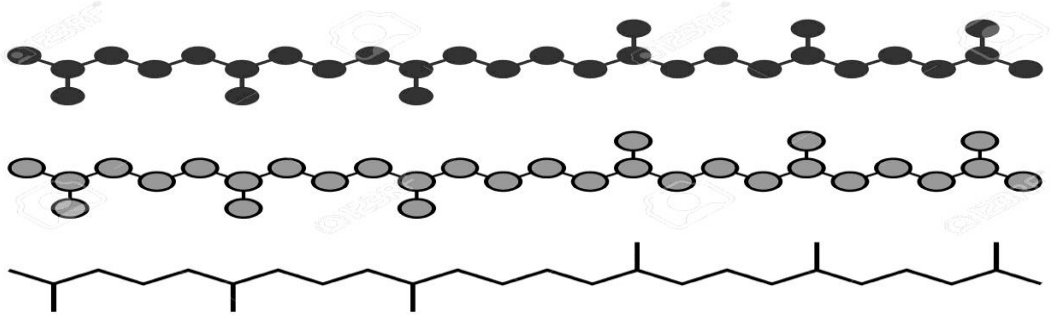
Balık yağlarının, hücre aktivitesini düzenleyen ve insan vücudunun çeşitli işlevlerini yerine getiren farklı aktif bileşikleri içerdiği bilinmektedir. Köpekbalığı karaciğeri yağları, bağışıklık sistemini g clendirme yeteneğine sahip 1-O-alkilgliserollerden çok zengindir. Yapılan bir çalışmada, balık yağlarından türetilmiş 1-O-alkilgliserollerin antitümör içeriği ve farklı kanser tiplerinin kombine tedavisinde etkili olduğu belirlenmiştir (Lewkowicz ve Tchorzewski, 2012).

Alkilgliseroller ve n-3 çoklu doymamış yağ asitleri bakımından çok zengin olan köpekbalığı karaciğeri yağı ve balık yağı, bazı tümörlerin büyümesini yavaşlatma yeteneğine sahiptir. Balık yağının, tümör hücrelerinin apoptotik hücrelerini ve lipid peroksidasyonunu artırmasını ve çoğalma oranını azaltabildiği de bilinmektedir. Bu bileşenlerin tümör büyümesi üzerindeki etkisini test etmek için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada tümör ağırlığı, hidroperoksit içeriği, proliferasyon hızı ve apoptotik tümör hücrelerinin yüzdesine ait biyokimyasal parametreler elde edilmiştir. Sonuçta; tümör hücrelerinin azaldığı (% 40), tümör hücresi apoptozunun arttığı (~ 3 misli), tümör hücre çoğalmasının azaldığı (% 35) gözlenmiştir. Sonuç olarak; SLO ekstratının kanser tedavisinde destekleyici olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Iagher ve ark., 2013).

2.6.4. Köpek Balığı Karaciğer Yağı (SLO) Kimyasal Yapısı

Alkilgliseroller (alkil-Gro), köpekbalıkları gibi bazı balık türlerinin karaciğerinde bulunur ve alkil-Gro karışımları çeşitli biyolojik etkinliklere sahiptir. Bu etkiler hematopoez uyarımı ve immünolojik savunmalar, sperm kalitesinde iyileşme, anti-tümör ve anti-metastaz aktiviteleri olarak sayılabilir. SLO'dan elde edilen doğal alkil-Gro karışımı, zincir uzunluğu ve doymamışlık bakımından farklılık gösteren birkaç alkil-Gro içermektedir(Deniau ve ark., 2010).

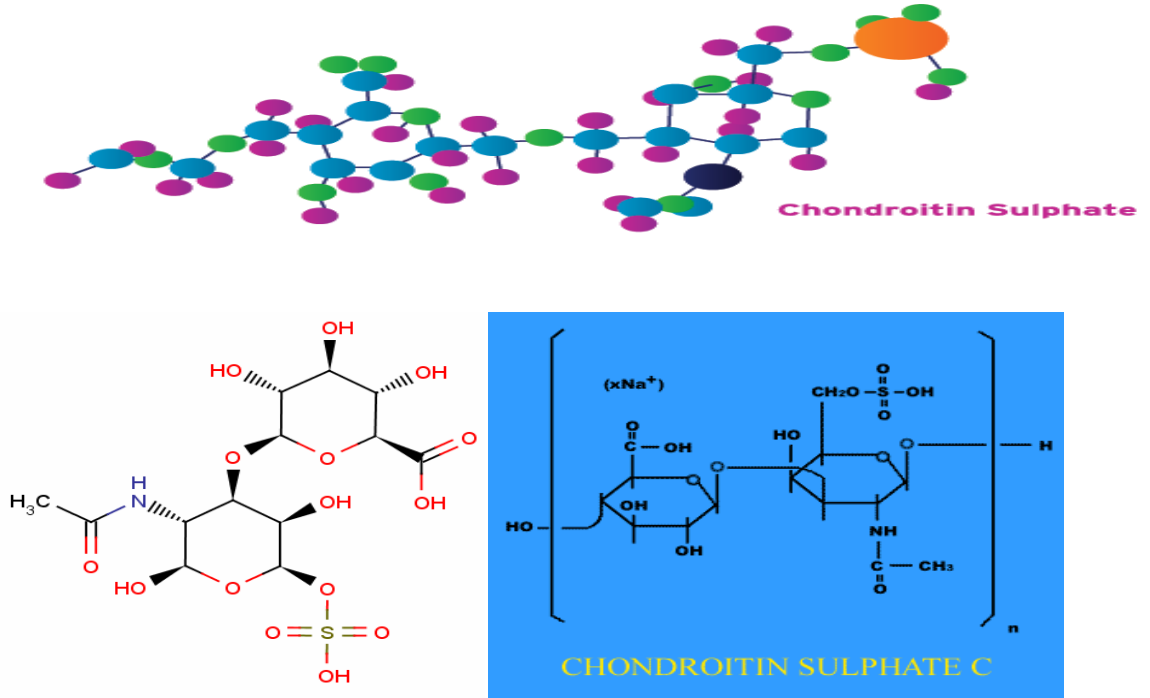
Köpekbalıklarının kansere karşı dirençli olduğu ve SLO'nun anti-tümör ilacı olarak kullanılabileceği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Köpekbalığı karaciğeri yağı yüzde 40 veya daha fazla squalen içerir. Balık karaciğeri yağı, squalen ve çoklu doymamış n-3 yağ asitleri bakımından zengindir (Skopinska ve ark., 2003).



Şekil 4. Squalen Kimyasal Yapısı

Kıkırdak Yapısı:

Köpek balığı kıkırdağının temel bileşenleri glycosaminoglycans'lar olup bunlar içerisinde chondroitin sülfat, kalsiyum, kollajen, fosfor ve diğer mineraller yer almaktadır.



Şekil 5. Chondroitin Sulfate-4(A)- Shark Cartilage / Chondroitin Sulfate-6 C

Kondroitin sülfat, normal olarak vücutta eklem etrafında kıkırdakta bulunan bir kimyasaldır. Genellikle köpek balığı kıkırdağında bol miktarda bulunur ve kanser, osteoartrit gibi birçok hastalık tedavisinde alternatif tıp olarak kullanılır. Birçok çeşidi bulunur ve hepsi aynı amaç için kullanılır. Diğer isimleri; Kalsiyum Kondroitin Sülfat, Galactosaminoglucuronoglycane CDS, Chondroitin Polysulphate, Kondroitin Sülfat B, Kondroitin Sülfat C, Chondroitine Sülfat A, CPS, CS, CSA, CSC, GAG, Kondroitin 4 ve 6-sülfat, Sülfat de Chondroitine, glukozamin hidroklorür ve glukozamin sülfattır. En çok kullanılan çeşidi Chondroitin Sulfate A ve Chondroitin Sulfate C'dir. N-asetil galaktozaminin 4. pozisyonunda sülfasyon meydana gelmesi ile kondroitin sülfat A, 6. pozisyonunda sülfasyon meydana gelmesi ile ise kondroitin sülfat C meydana gelir(Foot ve Mulholland, 2005).

2.7. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi

Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan reaktif oksijen radikalleri vücudun savunma mekanizması olan antioksidan sistem ile uzaklaştırılır. Sağlıklı organizmada oksijen radikalleri ile antioksidan savunma mekanizması tam bir denge halinde çalışır. Bu dengenin radikallerin lehine bozulması ile ortaya çıkan duruma “oksidatif stres” denir. Başlıca Reaktif Oksijen Radikalleri; süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, nitrik oksit sayılabilir.

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkisi olan lipid peroksidasyonunun toksik olduğu bilinmektedir. Reaksiyonlar zincirleme gerçekleşir ve dönüşümsüzdür. Toksik etki lipid peroksitlerinin düzeyi ölçülerek belirlenir. Lipid peroksil radikalleri diğer doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikalleri oluşturur, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler.

Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksitleri, hidroperoksitleri membran yapısına doğrudan, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Membran yapısının bozulması sonucu malondialdehit oluşur.

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidan adı verilmektedir. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve doğal olmayan (eksojen kaynaklı) antioksidanlar olmak üzere iki ana grupta toplanabilir.

Endojen Antioksidanlar'ın Enzimler grubu içerisinde; Süperoksitdismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon-S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz bulunmaktadır. (Kurt 2008).

Oksidatif strese yönelik çalışmalarda genelde lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA; SOD, GPx ve CAT antioksidan enzimlerine bakılarak inceleme yapılır. Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçümünde lipit peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi için Malondialdehit (MDA) aldehitlere bakılır.

Antioksidan savunma sisteminin ölçümünde ise; Antioksidan enzimlerin değerlendirilmesi sözkonusu olup; bunlar arasında Süperoksit dismutaz (SOD); Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Katalaz (CAT) analizlerimizde kullanılmıştır.

CEA (Karsinoembriyonik antijen): Malign hücrelerin yüzeyinden dökülen bir glikoproteindir. Kolorektal kanser ve bazan medüller tiroid kanseri takibinde kullanılır. Kolon kanseri için tümör marker göstergesi olup, normal değer aralığı: (0-3 ng/ml) olup; > 20 ng/mL seviyesi primer kanser, nüks ya da metastazı gösterir.

CA 19-9 (GI) (Karbonhidrat Antijeni) : Karbonhidrat antijeni 19-9 (CA-19-9) aslında bir modifiye Lewis (a) kan grubu antijenidir. Toplumun %5-7 si Lewis negatif olduğu için bunlarda CA19-9 serumda ölçülemez ve kanser tanı ve takibinde işe yaramaz. Özellikle pankreas kanserinin tanı ve takibinde faydalıdır. Pankreas, kolon ve mide kanserleri için tümör marker göstergesi olup, normal değer aralığı: (0-35 U/ml) dir. CA 19-9 kanser taraması yapacak kadar spesifik bir test değildir başka testlerle birlikte kanser açısından yorum yapabilmek için beraber yapılması önerilmektedir.

CA 125 (Over) (Cancer Antigen 125): Bir glikoprotein antijendir, sölomik epitelde (over, fallop tüpü, periton, plevra, perikard, kolon, böbrek, mide) normalde de salgılanır. İlerlemiş epitelyal over kanserlerinin %80 inde CA 125 artar. Over kanserinin tanı ve takibinde (nükslerde) kullanılır. Over kanseri ve daha az düzeylerde Servikal, karaciğer, pankreas, akciğer, kolon, mide, safra yolu, uterus, fallop tüpü, meme ve endometrium karsinomları için tümör markeri olup normal değer aralığı:(0-35 U/ml) dir.

AFP (Alfa Fetoprotein) : Alfa Fetoprotein (AFP) normalde fetüste üretilen bir glikoproteindir. Yeni doğanlarda Alfa Fetoprotein (AFP) düzeyleri 100 000 ng/mL nin üzerindedir. 5 ay sonra 150, 1 yıldan sonra da normal seviyelere düşer.

Karsinom (HCC, primer karaciğer kanseri), ve germ hücreli testis ve over tümörlerinin tanı ve takibinde kullanılır (bunlarda yükselir). AFP özellikle Karaciğer karsinomları için tümör markeri olup normal değer aralığı: (0-15 ng/ml) dir.

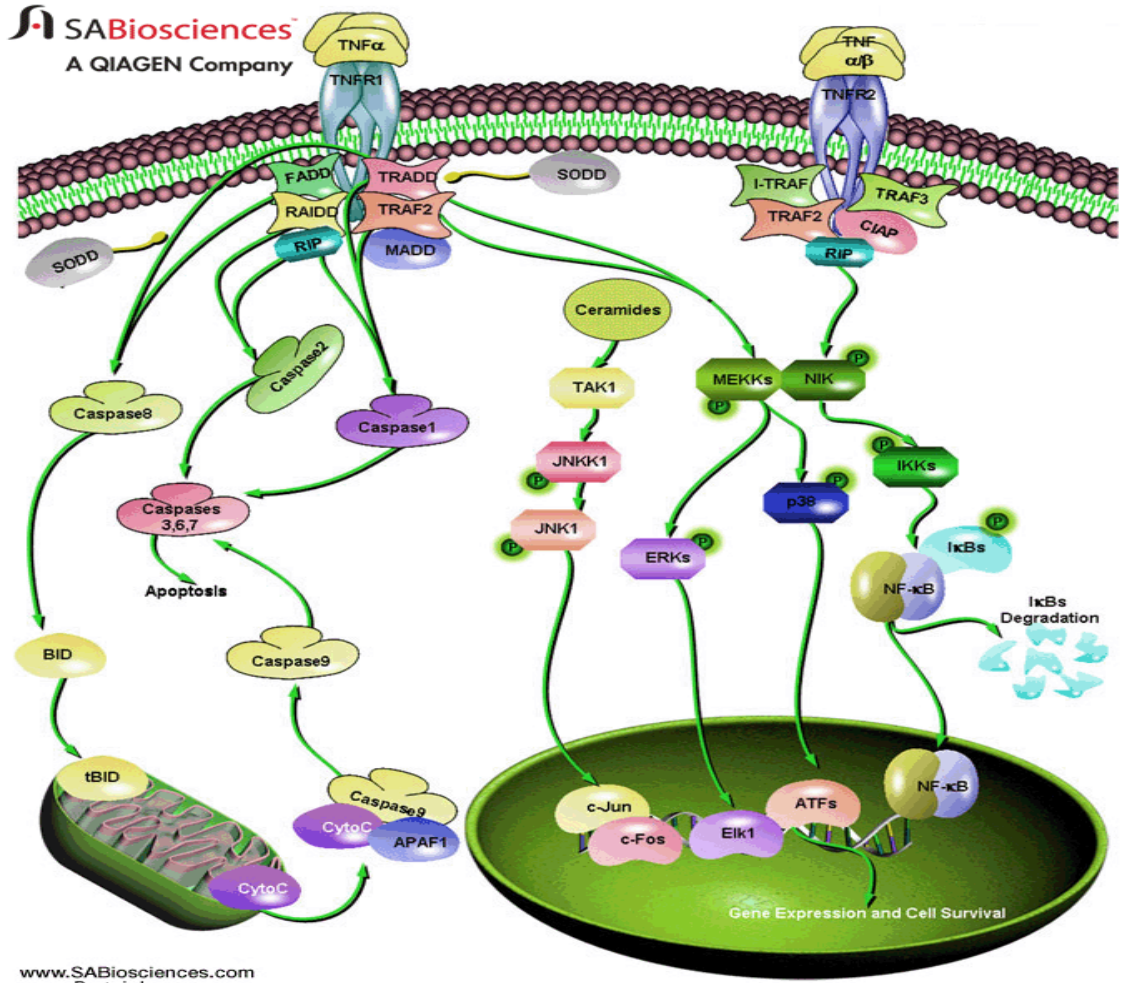
2.8. Endoplazmik Retikulum Stresi:

Endoplazmik retikulum (ER) hücrelerde salgı proteinlerinin sentez, katlanma ve olgunlaşma işlevlerinin gerçekleştiği yerdir ve çoğu hücrel aktiviter için gereklidir. ER'nin katlanma kapasitesi bozulması durumunda ER strese girer ve katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan sinyal yolunu indükler. Eğer UPR tarafından aktive olan koruma mekanizması normal ER fonksiyonunu tamir etmek için yeterli değilse hücreler apoptozis mekanizması tarafından ölürler. Son yapılan araştırmalar ER stresi ve UPR'nin diyabet, obezite gibi metabolik hastalıklarda, kanserde, immun yanıtta ve Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynadığını desteklemektedir (Seydel ve Aksoy 2012).

2.8.1. β - ACTİN, TNF- ALFA, P53, ATF4, ATF6, CHOP, EDEM1, GRP78 Genleri:

β -actin: Aktin ökaryotik hücrelerde en çok bulunan protein olup, yüksek derecede korunmuş bir yapıya sahiptir. Hücre yapılanması ve sinir hücrelerinin farklılaşması gibi hücrel mekanizmalara katıldığı ifade edilmektedir. Farelerle yapılan genetik bazlı çalışmalarda (house-keeping gen) kontrol geni olarak yoğunlukla tercih edilmektedir. Zira tüm hücre tiplerinde ve dokularda benzer seviyelerde exprese olduğu belirtilmiştir.

Tnf alfa geni: Tümör Nekroz Faktör ailesine ait polipeptidler, immün sistemde apoptozu uyaran reseptörleri aktive ederek apoptozu gerçekleştirmektedir. Tnf- α , bağışık cevabı oluşturacak sitokin kaskadının indüksiyonu için gereklidir. Tnf- α , ayrıca, inflamasyonda, yara iyileşmesinde ve doku onarımında da görev alır. Tnf molekülünün, bu etkilerine aracılık eden 2 reseptörü bulunmaktadır. Bunlar; 55kDa molekül ağırlığındaki Tip I (CD120a) ve 75kDa molekül ağırlığındaki Tip II (CD120b) reseptörleridir. TNF-a geni insanda TNF geni, 6. kromozomda MHC lokusunda 6p21.3 bölgesinde yerleşmiştir. Tnf- α immün hücreler tarafından üretilen etkili bir anti-kanser efektör ve hem yararlı hemde yıkım etkili bir pro-inflamatuar sitokin olarak tanımlanmaktadır. Tnf- α 'nın mitokondriyal kompleks-I aktivitesini değiştirdiği, ATP seviyelerini azalttığı ve reaktif oksijen türlerin seviyelerini artırdığı, proliferasyon, yayılma ve tümör hücrelerinde metastazı uyararak tümörün ilerlemesine aracılık edebildiği de ifade edilmiştir.



Şekil 6. Tnf- α izlediği yollar açısından kazpazlar üzerinden giderse apoptozise neden olmakta seramidler ve MEKK ler üzerinden (p38 aracılığı ile) giderse gen ekspresyonu ile yaşamsal faaliyetlere sebep olmaktadır.

Apoptozis mekanizmasında rol alan, kaspazlar diye tanımlanan hücre ölüm proteazları, farklı türlerdeki apoptotik programların bileşenleridir. Başlangıçta inaktif prekürsör (önmolekül) olarak sentezlenen kaspazlar, proteolitik süreçler yardımıyla aktive edilirler. Memeli hücrelerinde, en az iki bağımsız mekanizma vasıtasıyla kaspazların aktivasyonu gerçekleştirilir. Örneğin, TNF ailesinin çeşitli üyeleri, kaspaz-8'in sistolik domainlerini sitokin ligantlarına bağlayarak proksimal kaspazın proteolitik aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-8, aktive edilince indirekt ya da direkt olarak kaspaz-3, -6 ve -7'nin (CD95 tip I hücreler) bir grubunun aktivasyonunu indükleyici rol oynar. Kaspazlar aktive olduklarında hücre ölümü dönüşümsüz hale gelir (Eröz ve ark., 2012).

Tnf α 'nın etkileri kısaca;

1. MAP kinazlar çift yönlü etki ederler. TNF α alıcılarından gelen sinyalleri hem aynı tarafta hemde tersinde yakalayarak etki gösterirler. TNF α da dahil olmak üzere (direkt) birçok yangısal sitokinlerin (indirekt olarak TNF α 'nın aktivitesine katkıda bulunurlar) ekspresyonunu artırıcı etki yaparlar. TNF α aracılığı ile aktive olan MAP kinazlar ise hedef hücrelerde TNF α 'nın ekspresyonunu artırıcı rol oynarlar.

2. ERK, JNK, ve p38 MAP kinaz TNF α 'nın ekspresyonunu teşvik edici rol oynar.

3. TNF α ayrıca ERK, JNK, ve p38 MAP kinazların olası aktivatörü olarak görev yapar. (Sabio ve Roger 2014).

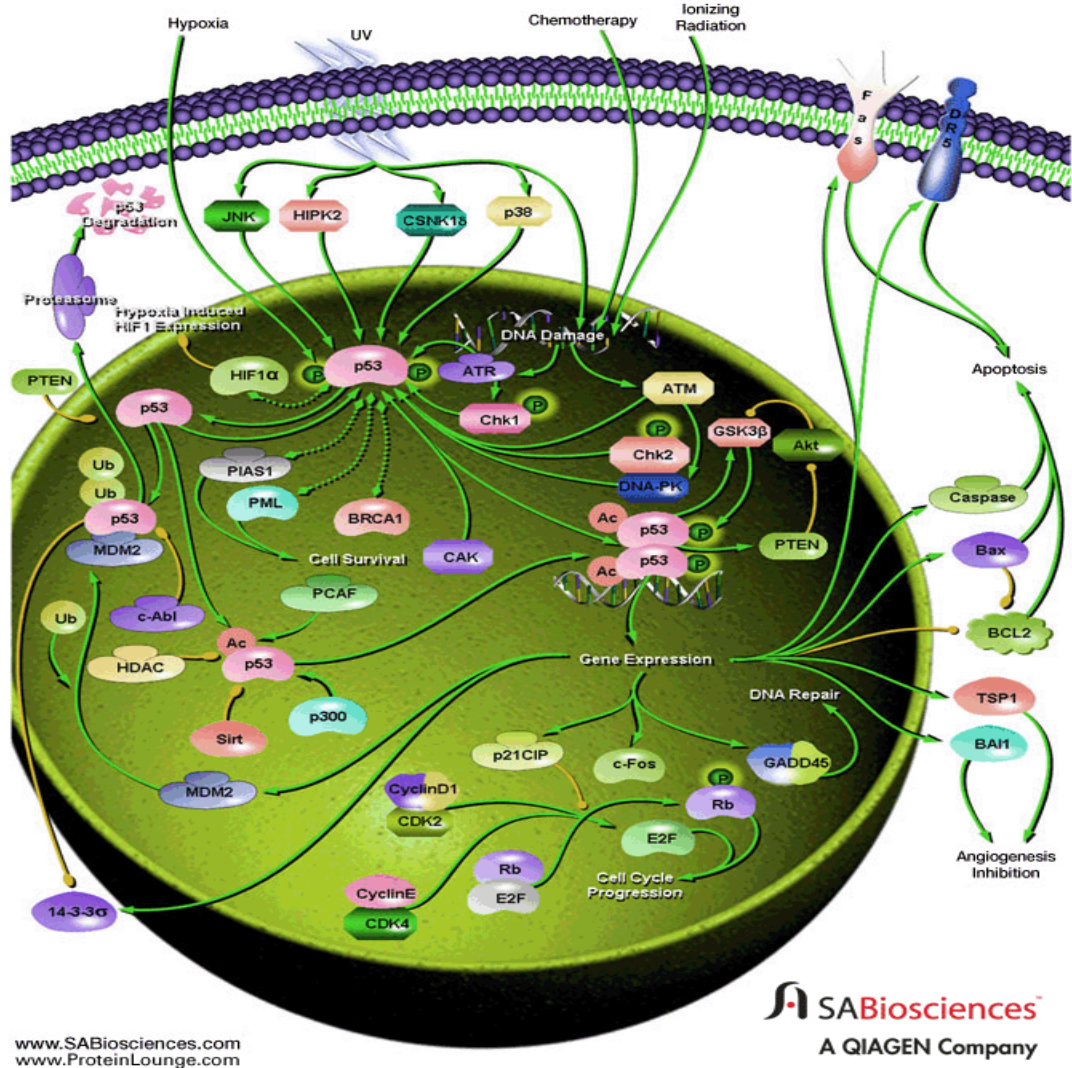
4- TNF α oluşum, çoğalma ve farklılaşmada görev yapan p38 aktivasyonuna da aracılık eder.

5- TNF α özellikle yangısal reaksiyonlarda p38 MAP kinazları aktive eder.

6- Ayrıca TNF α yaralanmalarda yarayı genişletici oluşumların meydana gelmesini engelleyici uyarı görevi yapar. (Zhou ve ark., 2006).

P53: p53 ya da diğer adıyla tümör protein 53 (TP53), hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok organizmada kanseri baskılamak için çok önemli bir proteindir. TP53, genomda mutasyon olmasını önleyerek genom stabilitesini korur. p53, hücre içerisinde dörtlü (tetramer) bağ yapmış halde işlevseldir. Hücre döngüsü kontrol noktasında, apoptozis, genetik stabilite ve DNA tamir mekanizmasında düzenleyici olarak çok önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

DNA hasarı, beslenmenin yetersizliği, hipoksi ve onkogen aktivasyonu içeren hücre içi ve dışı stres sinyallerine cevap olarak p53 translasyonu aktive olmakta ve p53 proteininin hücrede seviyesinin artmasına ve birikimine yol açmaktadır. Bu uyarılara cevap olarak p53'ün DNA tamirini kolaylaştırdığı, tümörlü hücre çoğalmasını inhibe ettiği ifade edilmiştir.



Şekil 7. P53 ün izlediği yollar

p53'ün mutasyona uğraması ya da delesyonu kanserde en sık görünen genetik anomalidir. P53 fonksiyonunu inaktive eden ve p53'deki mutasyonlar sonucu oluşan insan tümörlerinin %50'sinden daha fazlası bu nedenle oluştuğu belirtilmiştir. (Levine 1997, Schwartz ve Rotter 1998).

p53'teki değişiklikler tümör supressor aktivitesini kaldırır ve tümör oluşumuna eşlik eder. Tümör oluşumuna ilaveten, apoptozisteki defektler ilaca karşı bozuklukların da temelini teşkil etmektedir (Schmitt ve Lowe 1999; Campos ve ark., 1993; Simonian ve ark., 1997; Minn ve ark., 1995).

Hücre yaralanmaları, Fas reseptörü (öldürücü sinyal reseptörü olarak adlandırılır), TNF reseptörü, IL-3 ve eritropoetin gibi sinyallerin devamlılığını sağlayan sitokinlerin yetersizliği ile oluşan radyasyon ve anti kanser ilaçlar gibi DNA hasarına yol açan ajanlar apoptozisin indüklenmesine neden olur. Tümör süpressör geni olan p53, DNA hasarı ile oluşan apoptoziste etkili bir rol oynar (Eröz ve ark., 2012).

p53 geninin cevap mekanizması 5 kısımda incelenebilir;

(1) Tüm mekanizmayı fonksiyonel aşamaya getirici rol oynayan başlatıcıları uyarırlar.

(2) Aynı yönlü araçlar hem uyarıları tanımak ve yorumlamak suretiyle fonksiyonel mekanizmayı teşvik ederler ve hemde p53 proteininin girdilerini ya da p53 proteininin aktivitesini ve yoğunluğunu çok kısa bir sürede ayarlayan molekülleri düzenlerler.

(3) p53 proteinin kendisi de dahil olmak üzere bir grup protein p53'ün kendi aktivitesini ve fonksiyonunu düzenler.

(4) Ters yöndeki bir grup gen ve onların proteinlerinden oluşan etki p53 proteininin çoğunlukla transkripsiyonel aktivasyonu veya nadiren protein-protein interaksyonu aracılığı ile düzenlenmektedir.

(5) Bu ters yönlü etki sonucu hücresel çıktı olarak hücre döngüsünün durması, hücresel yaşlanma veya apoptozis ya da sıklıkla hücredeki diğer uyarı iletim yolları ile yoğun bir temas hali görülür. (Levine 2006).

p53 homeostasis sırasında; stress ya da DNA ya zarar veren bir olay yoksa düşük düzeylerde bulunur. Herhangi bir DNA ya zarar verme durumunda aktif hale gelir ve p53 hücre döngüsünü hücrenin canlılığını sağlayıcı tamiri gerçekleştirmek için durdurucu etki yapar veya apoptozise yönlendirir. Aktive olan p53 DNA'ya bağlanır ve p21 proteinini kodlayan WAF1/CIP1 de dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonunu aktive eder. p21 (WAF1), G1-S/CDK (CDK2) ve S/CDK kompleksine (hücre döngüsünde G1/S transitionu için önemli molekül) aktivitelerini engelleyici olarak bağlanır. p21(WAF1) CDK2 ile kompleks oluşturunca hücre döngüsünün ileriki aşamalarına devam edemez ve tamir olabileceksé hatanın düzeltilmesine yönelir veya zarar çok fazla ise hücreyi apoptozise gönderir. (<http://www.rockland-inc.com/p53-pathway.aspx>)

ATF6 (Activating Transcription Factor 6) : Bu gen, endoplazmik retikulum (ER) stresi sırasında katlanmamış protein tepkisi (UPR) için hedef genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bir transkripsiyon faktörü olmasına rağmen bu protein, ER'ye gömülü bir transmembran protein olarak sentezlenmesi bakımından sıra dışıdır. Bir ER stres sensörü / dönüştürücü olarak ve ER stresine bağlı proteolizi takiben, ER şaperonlarını kodlayan genlerin destekleyicilerinde bulunan cis-etki yapan bir ER stres tepkisi elemanı (ERSE) aracılığıyla bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Çoğalmakta olan kanser hücreleri için değil ama sessiz pozisyonda duran kanser hücreleri için hayatta kalmayı sağlayıcı protein olarak görev yapmaktadır. Gen ekspresyonunun artışı kanserleşmeyi göstermektedir. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22926>).

Bu gendeki polimorfizmlerin farklı popülasyonlarda diyabetle ilişkisi hakkında çelişkili raporlar vardır, ancak başka bir polimorfizm artmış plazma kolesterol düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu genin, aynı zamanda, kistik fibroz için potansiyel bir terapötik hedef olduğu da düşünülmektedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22926>).

ATF4 (Activating Transcription Factor 4) : Bu gen, orijinal olarak HTLV-1'in LTR'sinde bir iletiye cevap veren güçlendirici elemanı bağlayabilen yaygın olarak ifade edilen bir memeli DNA bağlayıcı protein olarak tanımlanan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Kodlanan protein ayrıca izole edilmiş ve cAMP-tepki elemanı bağlayıcı protein 2 (CREB-2) olarak karakterize edilmiştir. Bu gen tarafından kodlanan protein, AP-1 transkripsiyon faktörleri ailesini, cAMP-yanıt elementi bağlayıcı proteinleri (CREB'ler) ve CREB benzeri proteinleri içeren bir DNA bağlayıcı protein ailesine aittir. Bu transkripsiyon faktörleri protein-protein etkileşimlerine katılan bir lösün fermuar bölgesini paylaşır, bir DNA bağlanma alanı olarak işlev gören bir bazik amino asit gerisine C-terminali yerleştirir. Aynı proteini kodlayan iki alternatif transkript tarif edilmiştir. Büyük bir ters duplikasyon içeren bir bölgede q28'de X kromozomunda iki psödojen bulunur (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/468>).

ATF4 hücrenin hayatta kalma, apoptoz, otofaji ve yaşlanması ile ilgili altta yatan hedef genlerin bir destekçisinin transkripsiyonunu düzenlediği bildirilmiştir. (Wang ve ark.,2015).

ATF4, solid tümörlerin (servikal gibi) hipoksik bölgelerine lokalize olur ve artmış ATF4 ekspresyonu ciddi hipoksik olduğu bilinen metastatik meme tümörlerinde nekrotik bir alanda tesbit edilmiştir. Bu da tümör ilerlemesi ve hipoksi toleransı için bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Blais ve ark., 2004).

CHOP (DDIT3- DNA damage inducible transcript 3): Bu gen, CCAAT / güçlendirici bağlayıcı protein (C / EBP) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesini kodlar. Protein, C / EBP ve LAP (karaciğer aktivatör protein) gibi diğer C / EBP üyeleri ile heterodimerleri oluşturarak ve onların DNA bağlanma aktivitesini önleyerek dominant-negatif bir inhibitör olarak işlev görür. Protein adipogenesis ve eritropoezde rol oynar, ER stresi ile aktive olur ve apoptosisi teşvik eder. Bu genin ve FUS'un kromozom 16 veya EWSR1 üzerindeki kromozom 22 üzerinde translokasyon ile uyarılması, miksoid liposarkomlarda veya Ewing sarkomunda kimerik proteinler üretir. Farklı uzunluklarda iki izoformu kodlayan çoklu alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları tanımlanmıştır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1649>).

CHOP'un aşırı ekspresyonunun apoptozise yol açtığı ve proapoptotik olduğu bilinmektedir. CHOP, dinlenme durumunda çok düşük seviyelerde eksprese edilmektedir ve ER stresi durumunda ekspresyonu artmaktadır. ER stresi sırasında en yüksek oranda indüklenebilen genler arasında yer almaktadır. Bazı tümör dokularında ve hepatoma, neuroblastoma, kolon kanserleri gibi kanser hücre hatlarında eksprese edildiği ve kansere karşı ilaç gelişiminde önemli bir hedef oluşturduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Seydel ve Aksoy 2012).

GRP78: GRP78 / BiP, ER'nin protein kalite kontrolü için kritik olan ve ER-transmembran sinyal moleküllerinin aktivasyonunu kontrol eden önemli bir endoplazmik retikulum (ER) şaperon proteinidir. Yetişkin hayvanlarda GRP78, tümör ilerlemesi ve ilaç direnci gibi patolojik koşullar altında kanser hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir. GRP78'in kanser hücrelerinde yüzey lokalizasyonunun keşfi, potansiyel yeni fonksiyon, hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşim ve olası terapötik etkilerini ortaya koymaktadır. Fare modelleri, GRP78'in nöronal migrasyon için nöronal faktörlerin olgunlaşmasını ve salgılanmasını kontrol ettiğini ve nöroproteksiyon sağladığını da ortaya koymaktadır (Wang ve ark., 2009).

Tarihsel süreçte glukozla-düzenlenmiş proteinlerin, glukoz yokluğunda uyarıldığı bulunmuştur. Düşük seviyedeki ER stresi durumunda GRP78 stresi tolere edebilir ve protein katlanmasına yardımcı olmak için miktarı artar. Hem hücre içi hem de hücre yüzeydeki BiP/GRP78 tümör büyümesini artırır. Bundan dolayı yüzeydeki BiP/GRP78 antikor temelli deneysel tedavide hedef olarak gösterilmektedir (Rauschert ve ark., 2008).

GRP78, tümör artışı ve proliferasyonu, kemoresistans, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere kanser gelişiminin çeşitli aşamalarında yer alır. Birçok tümör hücresi, dış plazma membranında GRP78'i aşırı ifade eder. Ek olarak, prostat, meme ve melanoma gibi kökenleri farklı kanser türlerinde anormal derecede yüksek GRP78 ekspresyonu, tümör direnci, kanser nüksetmesi için daha fazla risk ve hastanın yaşamı açısından genel bir azalma ile ilişkilidir (Casas 2017).

Özellikle GRP78'in transgenik kanser fare modelleri ve hücre kültürlerindeki yoğun çalışmalarla tedaviye direnç aynı zamanda da invazyon, metastaz, anjiogenez, çoğalma ve düzenlenmesi yoluyla tümörpenezisi artırdığı gösterilmiştir (Luo ve Lee 2013). GRP78 ekspresyonunu bloke ederek tümör hücrelerinin sağkalımını azaltmak fazlasıyla istenen bir durum olmasına rağmen klinikte halen başarılıymış değildir (Malhi ve Kaufman 2011).

EDEM1: Yanlış katlanmış glikoproteinleri çıkarır ancak calnexin döngüsünden üretken katlanan glikoproteinleri çıkarmaz. Endoplazmik retikulum ilişkili bozulma (ERAD) ile doğrudan ilişkilidir ve muhtemelen bir SEL1L ile bir kompleks oluşturarak N-glikandan bağımsız bir şekilde bozunmaya yönelik yanlış katlanmış glikoproteinleri hedefler. Man8GlcNAc2'den Man7GlcNAc2'ye mannoz kırpmasını katalize eden düşük mannosidaz aktivitesi vardır. (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q92611>).

Geçmiş bulgulara göre, GRP78 ekspresyonunun kanser hücrelerinde yükseldiği ve stres kaynaklı apoptoza direnç göstermeye yardımcı olduğu, GRP78 susturulmasının antikanser terapisinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu hipotez test edilmiş ve GRP78'i hedefleyen siRNA transfeksiyonunun, bu yapıda yer alan CHOP, EDEM1 ve ERdj4 moleküllerinin gen ekspresyonu artarak renal karsinoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Matsumura ve ark., 2014).

2.9. Hücre Kültürü Hakkında Genel Bilgi

Canlı bir doku veya organdan alınan bir parçanın in vitro ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine hücre kültürü denir. Hücre kültürü, deney hayvanı kullanımının azaltılması açısından önemli, deney hayvanlarıyla yapılan birçok çalışmadan çok daha kolaylıkla yapılabilir olması açısından ise tercih edilebilir bir yöntemdir. Titizlik ve sterilizasyon koşullarına uyum, dikkat edilmesi gereken en önemli faktörlerdendir (Baysal ve ark., 2008).

Hücre ve doku kültürü çalışmaları; aşı, monoklonal antikor, çeşitli enzimler ve hormonların üretimi, hücre içi aktivite ölçümü, DNA ve RNA replikasyonu araştırması, protein sentezi, enerji metabolizmasının araştırılması, çeşitli ilaçların hücre siklusuna etkisi, embriyonik araştırmalar, hücre popülasyon kinetiği, adezyon, sitogenetik analiz, hormonal reseptör komplekslerinin davranışları, sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi, hücrenin beslenme özellikleri, enfeksiyon araştırmaları, viral transformasyon, kimyasal transformasyon, özel ürünlerin sentezlenip salgılatılması, genetik manipülasyon ve immortalizasyon gibi çeşitli amaçlarla yapılabilmektedir (Ovalı ve Uçar 2003).

Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak, gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır. Yapılabilecek deneylerin sayısını arttırabilmek için hücrelerin çoğaltılması, ileride deneyin aynı pasajdaki hücrelerle tekrarlanabilmesini sağlamak için de deney yapılan pasajdaki hücrelerin dondurulması işlemleri yapılır. Her aşamada hücrelerin canlılığı büyük bir öneme sahiptir. Steril çalışma koşullarının sağlanabilmesi hücre kültüründe başarının temel faktörüdür (Baysal ve ark., 2008).

Hücre kültürlerinin kullanım alanlarını şu şekilde özetlemek mümkündür:

- Viral aşilar ve viral tanı
- Monoklonal antikorlar ile antikor üretimi
- İnterferon üretimi
- Enzim üretimi
- İnsektisit ve insekt aşı üretimi
- İnterlökin gibi immünoregülatörlerin üretimi
- Hormon üretimi
- Büyüme faktörlerinin üretimi

Hücre kültürlerinin son yıllardaki gelecek vadeden kullanım alanları ise şunlardır:

- Somatik gen tedavisi
- Tümör aşiları
- Canlı hücrelerin greft amaçlı olarak çeşitli şekillerde kullanılması
 - Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması
 - Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması
 - Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
 - Organizma dışında hücre modifikasyonu
- Kompleks üç boyutlu dokuların oluşturulması
 - Yapay deri
 - Yapay kıkırdak
 - Yapay karaciğer
 - Yapay pankreas (Aydıntuğ ve Mutlu 2003).

2.10. Hücre Kültürü Çalışmalarında Yapılan İşlemler

2.10.1. Hücrelerin Beslenmesi

Her hücre tipi için farklı olarak kullanılan büyüme çözeltileri alındığı yerden veya yazılı kaynaklardan öğrenilebilir. Büyüme çözeltilerinde, hücre dışı ortamla izoosmotik bir tuz karışımı, tampon olarak sodyum bikarbonat ve besleyici amaçlı çeşitli aminoasitler, vitaminler ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı bulunur (Baysal ve ark., 2008).

Büyüme çözeltileri hazır olarak ya da çözelti yapılabilecek toz materyal şeklinde satın alınır. Toz materyal çözelti haline getirilip pH' sı ayarlandıktan sonra 0.22 µm filtreden süzülerek sterilize edilir (Aydıntuğ ve Mutlu 2003).

Çoğu hücre, pH; 7.4 civarında optimal olarak büyüyüp çoğalmaktadır. Büyüme çözeltilerine % 5-20 oranında (v/v) serum eklenir. En sık kullanılan serum fetal buzağı serumudur. Bazı hücreler at serumuna, bazı primer hücreler de elde edildikleri canlılığın serumuna gereksinim duyarlar.

Antibiyotikler sıklıkla ortamda kullanılırlar ancak 37°C'de stabiliteleri kısa süreli olduğundan kontaminasyona karşı koruyuculukları sınırlıdır. En sık kullanılan standart antibiyotikler:

- Gentamisin 5- 10 mg/ml stoktan 50 µg/ml olacak şekilde
- Penisilin 10,000 U/ml stoktan 100 U/ml
- Streptomisin 10 mg/ml stoktan 100 µg/ml olacak şekildedir.

Büyüme çözeltileri çoğunlukla dayanıksız madde içerdiğinden, +4°C'de saklanmalı, fakat hücrelere eklenmeden hemen önce 37°C'lik su banyosunda 10 dakika ısıtılmalıdır. Hücreler haftada iki kez büyüme çözeltileri değiştirilerek beslenmelidir (Baysal ve ark., 2008).

Kültür ortamını etkileyen dört faktör şunlardır;

1. **pH' ın düşmesi:** pH 7' den 6.5' e düşerse bir çok hücrenin büyümesi durur ve pH 6-6.5 arasında ölmeye başlarlar. Ortamın pH' sı düştüğünde indikatör olan fenol kırmızısının rengi önce turuncuya sonra sarıya döner. Bu durumda besiyerinin değiştirilmesi gerekir.
2. **Hücre konsantrasyonu:** Kültürde yüksek hücre konsantrasyonu varsa besiyeri daha çabuk tükenmektedir. Bu durum çoğunlukla pH değişimine neden olmaktadır.
3. **Hücre türü:** Normal hücreler yüksek hücre yoğunluğuna ulaştıkları zaman bölünmeyi durdururlar. G1 fazında kalan hücreler uzun süre canlı kalabilirler. Dönüştürülmüş, ölümsüzleştirilmiş hücreler ve bazı embriyonik hücreler ise kültürde yüksek konsantrasyona ulaştıklarında, kültür değiştirilmez veya subkültüre edilmezse hızla bozulurlar.
4. **Hücre morfolojisi:** Eğer kültürde çekirdek çevresinde granüllerin belirmesi, hücrelerin yuvarlaklaşıp tabandan ayrılması gibi olaylar başlamışsa kültürde morfolojik bozulmalar olmuş demektir. Bu belirtiler kültürün ortam değişikliğine ihtiyaç duyduğunu gösterir veya kültürdeki hücreler yaşlanmış, mikrobiyolojik kontaminasyona uğramış, toksik ortamlarla karşı karşıya gelmiş anlamına gelir. Kültürde daha ciddi sorunlarla karşılaşmamak için, kültür rutin olarak kontrol edilmelidir (Baysal ve ark., 2008).

2.10.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajlama işlemi; flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücre dizilerinin zarar verilmeden yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspansiyon edilerek başka ortamlara aktarılması şeklinde yapılır. Aktarılan ortam % 5 CO₂'li etüvde 37° C' de hücreler tam tabaka olana kadar inkübe edilir (Çiçek ve Bilgiç 2006).

Her hücre tipi, kendine özgü bir hızla bölünerek çoğalır. Genelde hücre sayısının ikiye katlanması 24 saat sürmektedir. Bölme öncesinde tutunan hücrelerin kaldırılması gereklidir. Büyüme çözeltilisinin ortamdan çekilmesinden sonra hücreler bir kez daha PBS ile yıkanır ve ekstrasellüler matriks (EM) proteinlerini parçalamak amacı ile tripsin enzimi, integrin – EM etkileşiminde şart olan kalsiyum iyonunu ortadan kaldırmak için EDTA ya da Tripsin- EDTA birlikte kullanılabilir. Kaldırılan hücreler sağlıklı bir sonuç için sayılmalı ve her bir flask 10^5 hücre/ ml olacak şekilde birkaç flaska bölünmelidir (Baysal ve ark., 2008).

2.10.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

İstenen özellikleri taşıyan ve kontamine olmayan bir hücre hattı üretildiğinde ya da klonlanmış bir hücre türü seçildiğinde bir “asıl” stok donmuş olarak saklanır (Tucker ve ark., 1995). Günümüzde tercih edilen hücre koruma yöntemlerinde biri de sıvı azotta saklamadır (Menezo ve ark., 1990).

Hücreler sıvı azot içinde -196°C 'de, bu düşük sıcaklığa dayanacak plastik tüpler ve cam vialler içinde saklanabilmektedir. Hücreler, büyüme çözeltileri besiyerine % 10- 20 serum ve % 5-10 gliserol veya DMSO eklenerek dondurulabileceği gibi, % 90 serum ve % 10 DMSO içeren çözeltide de dondurulabilirler (Baysal ve ark., 2008).

2.10.4. Hücreleri Çözme

Dondurularak saklanan hücreler bir çalışmada kullanılmadan önce azot tankından ya da -80°C ' lik soğutucudan çıkarılır ve sıcaklığı 37°C ' ye ayarlanmış su banyosunda hızla çözündürülür. Çözürülen hücre çözeltilisi taze besiyeri ile dilüe edilir. Santrifüj işlemi ile dondurma aşamasında kullanılan maddeler uzaklaştırılır. Pellet taze besiyerinde süspanse edilerek, yine taze besiyeri içeren petrilere aktarılır. 37°C ' de % 5 CO_2 ' li inkübatörde inkübasyona bırakılır.

Dondurulmuş hücrelerin devitrifikasyon ve rekristalizasyon harabiyetlerini minimuma indirmek için hızla çözdürülmesi gereklidir. Donma sırasında şekillenen küçük buz partikülleri, çözdürme esnasında erir. Çözdürme hızı, hücrelerin hızlı rehidrasyonu sırasında ozmotik strese bağlı olarak hasarlar meydana getirebilmesi açısından çok önemlidir (Aydıntuğ ve Mutlu 2003)

2.10.5. Hücre Canlılığı ve Sitotoksite

Hücre popülasyonlarının miktarlarının belirlenmesi, ölçüm performansı ve tekrarlanabilirlik başarısı için ya da çalışmalarda karşılaştırma yapmak için gereklidir. Bu nedenle hücre popülasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonlarını belirlemek için bazı metotlar geliştirilmiştir (Doyle ve Griffiths 1998).

Vital bir boya olan trypan blue, direkt hücre sayımında canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için genellikle hemositometre ile birlikte kullanılmaktadır. Basit, hızlı ve ucuz olan bu metot, toplam hücre süspansiyonundan sadece küçük fraksiyonlar gerektirmektedir (Freshney 1994).

2.10.5.1. Hemositometre ile hücre sayımı

Hemositometre hücre sayımı için kullanılan en genel metotlardan biridir. Kalın düz sayım odacıklı lamın üzerine lamel konması temeline dayanmaktadır. Temel olarak lam üzerinde çizgi ile kesin olarak kazanılmış 1 mm kareler ve daha küçük kareler içerir. Hücre süspansiyonları lam lamel arasına doldurulduğu zaman hücreler mikroskop altında gözlenebilir ve seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır. Bu sayımdan süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanabilir (Baysal ve ark., 2008; Freshney 1994).

2.10.5.2. Trypan blue canlılık testi

Trypan blue canlılık testi genellikle hücre ayırma, dondurma veya çözme gibi potansiyel olarak travmatik bir işlemde sonra canlı kalan hücrelerin oranını ölçmek için kullanılır. Birçok canlılık testi membran bütünlüğünün bozularak hücrenin, normalde geçirgen olmadığı bir boyayı alması esasına dayanır (Baysal ve ark., 2008).

Bu metodun temel prensibi, canlı hücreler boyayı almaz iken ölü hücrelerin almasıdır. Hücre süspansiyonu trypan blue ile dilüe edildiğinde canlı hücreler küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görünürler. Ölü hücreler sis, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Her iki hücrenin total sayısı mililitre başına ve canlı hücrelerin yüzdesi olarak belirlenebilir (Freshney 1994).

2.10.5.3. Neutral red boyası ile canlılık testi

Neutral red (3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) canlı hücrelerin lizozomunda biriken suda çözünen bir boyadır. Neutral red testi in vitro sitotoksosite tespiti için geliştirilen hücre canlılığı testidir. İn vitro doku kültür çalışmalarının başlangıcında neutral red boya, viral sitopatogenetik değerlendirme ve immunotoksosite testleri için geliştirilmiştir.

Neutral red testinde, hücrelerle boyanın inkübasyonu sonrasında boya, canlı hücrelerin lizozomunun içine girer. Hücre içine boya alımı plazma membranından pasif taşıma ile gerçekleşir. Lizozom içinde neutral red birikmesi ya polisakkaritler gibi lizozomal matriks içinde oluşur ya da lizozomun neutral red içinden proton alışverişiyle gerçekleşir. Hasarlı ya da ölü hücrelerin lizozomlarında neutral red bulunmaz ve plazma membranı, hücre içerisinde neutral red tutulduğu için görev yapamaz (Freshney 1994).

2.10.5.4. Floresan boya tutucularla canlılık sayımı

Basit boyama (hemositometre) dışında alternatif yaklaşım intrasellüler komponentleri floresan boyamadır. Bazı metotlarda akridin orange-propidium iodide gibi kombine boyaların kullanılır. Akridin orange plazma membranına girer ve intrasellüler nükleik asidi boyar, düşük boya konsantrasyonunda yeşil floresan üretir. Propidium iodide plazma membranına tamamen giremez, fakat hasar görmüş hücrelerin membranına girebilir, tekrar intrasellüler nükleik asidi boyar böylece floresanda kırmızı parlar. Boya acridin orange' ı hasarlı hücrelerin nükleusundan dışarıda tutar. Böylece ikili boyadan sonra tüm sağlam hücreler ve hasarlı hücreleri aynı görüş alanı içinde en güçlü floresansla tanımlamak mümkündür (Fisher ve ark.; 1998).

2.10.5.5. MTT testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler, kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Schwartz ve Osborne 1995).

MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medyum veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının süksinat dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli insolubl formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile solubl hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Mosman 1983).

Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (Yaka ve ark., 2006).

Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleridir. Örneğin MTT tetrazolium tuzu kullanılan bir mikroliter plate testi genellikle hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılır. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. Örneğin MTT içerisinde canlı hücreler renkli, suda çözünmez, formazan tuzu tarafından indirgenir. Formazan kristalleri çözüldükten sonra, çabuk ve kolayca klasik mikropate okuyucusunda (maximum absorbans) 570 nm de miktarı belirlenebilir (Oktar 2009, Doyle ve Griffiths 1998).

Çoğalan hücreler proliferasyon göstermeyen hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir. MTT kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağladığından en sık kullanım alanları, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medyum komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir (Mosman 1983).

2.11. Hücre Hatları ve Kanser Hücre Hatları:

Hücre hatları ilk olarak 1951 yılında HeLa hücre hatlarının kültürünün yapılabilmesi ile bilimsel araştırmalarda önemli ilerleme sağlamıştır. Günümüzde kanser araştırmalarında ve viroloji alanında hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yakın zamanda pek çok hücre hattının çapraz kontamine olduğu veya yanlış tanımlandığı bilinmesine rağmen, bilimsel literatürde halen bu durumdan habersiz, geçersiz sonuçların yer aldığı yayınlar bulunmaktadır. Büyük zaman ve maddi kayıplara yol açan bu durum, ileride sonuçları kabul edilemeyecek çalışmalar ile dergi editörlerini zor durumda bırakabilecektir. Yapılacak çalışmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılması ve eldeki hücrelerin çeşitli testlerle özelliklerinin saptanması ile bu problemin önüne geçmek mümkün olabilecektir. Ancak bu araştırmacıların konudan haberdar olması ve çözüm yollarını bilmesi ile mümkündür(Akçalı, 2010).

Canlıların, bilimsel deneylerde kullanılmasının mümkün olduğunca azaltılması gerekliliği, biyomedikal çalışmaların farklı pek çok alanında hücre kültürlerinin geliştirilmesi ve kullanılmasına neden olmuştur. Hücre kültürleri mikrobiyolojide özellikle virüslerin üretilmesi ve tanımlanması, ayrıca virüs aşılarının üretimi amaçlarıyla fazlaca kullanılmaktadır. Günümüzde ise kanser araştırmalarının hız kazanması ile özellikle kanser ilaçlarının geliştirilmesinde, etkilerinin belirlenmesinde hücre kültürü kullanımı büyük önem kazanmıştır (Lacroix, 2008).

Cetraria aculeata likeni ekstratının, HeLa (insan serviks adenokarsinoma), 5RP7 (kanserli sıçan embriyo fibroblast hücre hattı) ve A549 (kanserli insan alveolar bazal epitel hücre hattı) kanser hücrelerine zayıf sitotoksik etki gösterdiğini gösteren bir çalışma yapılmıştır (Zeytinoglu ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada atranorin ve gyrophorik asidin usnik asit kadar olmasa da yüksek antiproliferatif ve sitotoksik etkili oldukları gözlemlenmiştir. Bu çalışmada A2780 (insan yumurtalık kanseri), HeLa (insan serviks adenokarsinoma), MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), SK-BR-3 (insan meme adenokarsinoma), HT-29 (insan kolon adenokarsinoma), HCT-116 p53+/, HCT-116 p53/ (insan kolon kanseri), HL-60 (insan promyelotik leukaemia) ve Jurkat (insan T-hücre leukaemia) kanser hücre hatlarına karşı atranorin, gyrophorik asit, parietin ve usnik asit sekonder metabolitlerinin etkisini araştırmışlardır. Atranorinin 50 µM konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamadan sonra HL- 60 (insan promyelotik leukaemia) hücrelerine etkili olduğu bulunmuştur. Bu konsantrasyona diğer hücre hatlarının direnç gösterdiği görülmüştür. Bu konsantrasyondan daha yüksek atranorin seviyesinde ise HeLa (insan serviks adenokarsinoma) hücre hattı hariç diğer yedi hücre hattına sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Usnik asit sekonder metaboliti en etkili metabolit olarak bulunmuştur. 50 µM konsantrasyonda bile (HeLa hücreleri ve HCT-116 p53+/> hücreleri hariç) diğer tüm hücre hattına etki etmiştir. Usnik asidin yüksek konsantrasyonlarının hücreler üzerinde daha etkili, gyrophorik asidin ise düşük konsantrasyonlarda etkisiz olduğu görülmüştür. 100 µM konsantrasyonda 24 saat inkübasyondan sonra HL- 60 (insan promyelotik leukaemia) hücrelerine güçlü etki göstermiştir. A2780 (insan yumurtalık kanseri), HL-60 (insan promyelotik leukaemia) ve Jurkat (insan T-hücre leukaemia) hücrelerine karşı özellikle daha etkili olduğu bulunmuştur (Backorova ve ark., 2011).

12 farklı insan kanser hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, protolichesterinic asit, lobarik asit ve baeomycesic asidin antiproliferatif etkisi test edilmiştir. Bu üç liken metabolitinin in vitro ortamda önemli bir 5-lipoxygenase (LOX) inhibitörü olduğu önceden bilinmektedir. LOC yolları kasinogenesisde rol oynar. 5- ve 12-LOX hücre büyümesinde önemli ve prostat kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri ve meme kanserinin de dahil olduğu çeşitli kanserlerin canlılığının devam etmesinde önemli olduğu bulunmuştur(Haraldsdottir ve ark., 2004).

Meme kanser hücre hattı ve Capan-1 (pankreas kanser hücre hattı) hücrelerinin protolichesterinic asit ve lobarik aside daha hassas olduğu bulunmuştur. 5-LOX inhibisyonu, protolichesterinic asitte lobarik asit ve baecomycetic aside göre daha yüksektir. Protolichesterinic asit ve lobarik asit 5- ve 12- LOX çeşitli kanser hücre hatlarına karşı önemli antiproliferik etki gösterirken, baecomycetic asit 5- LOX' a daha az etki göstermiştir. Bu çalışma 5- ve 12- LOX inhibitörü olan protolichesterinic asit ve lobarik asidin birçok dokudaki kanser hücrelerine antiproliferatif etkisi olduğunu onaylamıştır (Haraldsdottir ve ark., 2004)

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile; sistemik olarak uygulanan formaldehitin akciğer üzerine toksik etkileri ve bu toksik etkilere karşı SC(shark cartilage- köpek balığı kıkırdağı) ve SLO(shark liver oil-köpek balığı karaciğer yağı)' nun koruyucu etkisini; kolonda tümör gelişimi ile DMH arasındaki ilişki ve SC ve SLO' nun tedavi bazlı etkisini patolojik, genetik ve biyokimyasal düzeylerde araştırma; destekleyici olarak "CaCo-2/ An1 '(Human Colon Adeno Carcinoma-insan)' kolon kanseri hücre hattını kullanarak, kolon kanseri gelişen dokularda SC ve SLO'nun kanser hücrelerini tedavi edebilme başarısını hücre kültürü çalışma modeli ile ortaya koyma amaçlanmıştır. Böylece deneysel olarak kolon kanseri ve akciğer hasarı oluşturulan rat ve insan dokularında destekleyici bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilen bu extratlarla, bilinen yöntemlere alternatif olabilecek etkin bir tedavi olasılığının bulunabilmesi hedeflenmektedir.

3. MATERYAL ve METOD

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneylei Yerele Etik Kurulu'ndan etik kurul raporu alınarak uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hayvan Materyali

Temin edilen 80 rat şu şekilde gruplandırıldı.

40 adet DMH grubu:

4 adet: Kontrol grubu

6 adet: DMH verilen fakat tedavi edilmeyen grup

15 adet: DMH verilen ve köpek balığı kıkırdağı ile tedavi edilen grup

15 adet: DMH verilen ve köpek balığı karaciğer yağı ile tedavi edilen grup

40 adet FA grubu:

4 adet: Kontrol grubu

6 adet: Formaldehit verilen fakat tedavi edilmeyen grup

15 adet: Formaldehit verilen ve köpek balığı kıkırdağı ile tedavi edilen grup

15 adet: Formaldehit verilen ve köpek balığı karaciğer yağı ile tedavi edilen grup

DMH grubundaki ratların 4 tanesi kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra geri kalan 36 adet rata 6,5 ay boyunca haftada bir gün subkütan olarak DMH yapıldı. DMH dozlar her bir rat için 2,5 diziyele DMH + 7,5 diziyele etanol= 1cc olarak ayarlandı.

Subkütan olarak DMH yapılan gruptaki ratların 2 haftada bir tanesi kesime tabi tutularak biyokimyasal analizler için kalbinden biyokimya ve hemogram kanları, patolojik analizler için kalın bağırsağından FA içine doku örnekleri ve genetik analizler için de -20 derece buzdolabında saklamak üzere yine doku örnekleri alındı. DMH enjeksiyonu ratlara haftada 2 kere uygulandı.

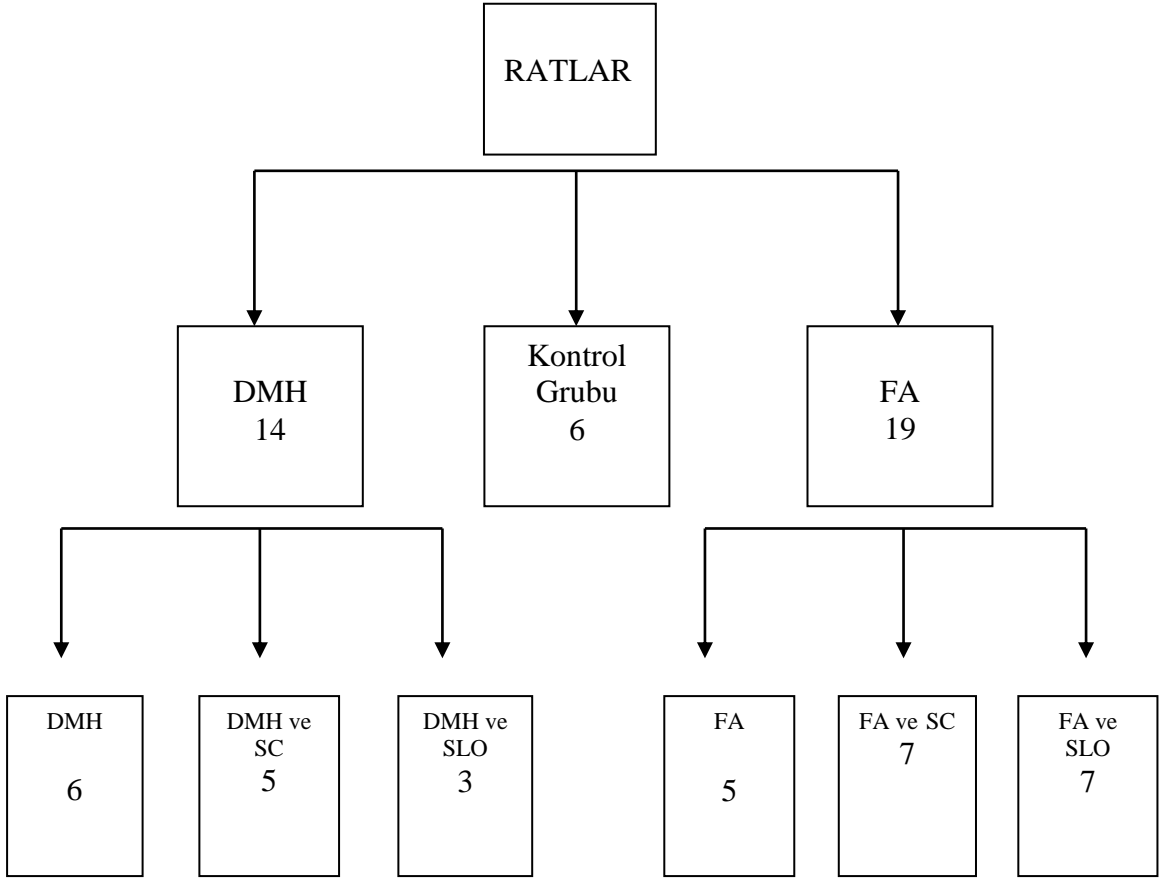
DMH enjeksiyonuna son verdiğimizde, o günden itibaren kontrol grubu sabit kalmak koşulu ile geri kalan ratlar 3 gruba ayrıldı. 1. Grup tedavi edilmeden, 2. Gruba SC, 3. Gruba da SLO verilmeye başlandı. 1 ay boyunca hergün gavaj yöntemi ile 2. Gruba 0,2 gr. SC, 3. Gruba da 0,5 gr SLO verildi. 1 aylık tedavi sürecinden sonra yine bir ay kadar bu gruptaki ratlara sadece yem ve su verildi.

FA grubundaki ratlarda kontrol grubu ayrıldıktan sonra geri kalanlara gūnaşırı, intraperitoneal olarak 10mg/kg dozlarında formaldehit enjekte edildi. Formaldehit dozu 1cc FA + 9cc SF= 10 cc olarak ayarlandıktan sonra her bir rata 1 dizyem verilmiştir. Bu ratlardan 1. Gruptakilere sadece FA enjeksiyonu yapılırken, 2. Gruptakilere FA ile birlikte hergün gavaj yöntemi ile SC, 3. Gruptakilere FA ile birlikte hergün gavaj yöntemi ile SLO verildi.

Bir aylık süreç sonunda FA enjeksiyonu ve tedaviye son verildi ve 1 ay kadar ratlara sadece yem ve su verilerek gözlemlendi. FA enjeksiyonu ve tedavi süreci içinde ilk hafta sonunda ve bazen ölenler olduğu zaman kesimler yapılarak akciğerden doku parçaları alınıp patolojik incelemeye gönderildi.

Çalışma sonunda her iki gruptaki ratlar kesime tabi tutuldu; DMH grubundaki ratların kalbinden biyokimyasal analizler için kan, kalın bağırsağından patolojik incelemeler için doku örnekleri ve genetik analizler içinde -20 derecede saklanmak üzere doku örnekleri alındı. FA grubundaki ratların da kalbinden biyokimyasal analizler için kan, sağ akciğerin cranial lobundan patolojik incelemeler için doku örnekleri ve genetik analizler içinde -20 derecede saklanmak üzere doku örnekleri alındı.

3.2. Biyokimyasal Analizler



Şekil 8. Ratların gruplara göre sınıflandırılması.

Plazma CAT Düzeylerinin Ölçümü:

Plazmada Katalaz ölçümü Cayman marka Katalaz ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar nmol/dk/ml olarak verildi.

Plazma SOD Düzeylerinin Ölçümü:

Plazmada SOD ölçümü Cayman marka Süperoksit Dismutaz ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar U/ml olarak verildi.

Plazma GPx Düzeylerinin Ölçümü:

Plazmada GPx ölçümü Cayman marka Glutatyon Peroksidaz ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar nmol/dk/ml olarak verildi.

Plazma MDA Düzeylerinin Ölçümü:

Plazmada MDA ölçümü Cayman marka TBARS ölçüm kiti ile yapıldı (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak verildi.

Serumda CEA, AFP, CA125 ve CA19-9 ölçümleri:

Roche marka ticari kitler kullanılarak Roche Cobas e 601 otoanalizöründe çalışıldı (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Switzerland). Sonuçlar (CEA (ng/ml), AFP (ng/ml), CA125 (U/ml) ve CA19-9 (U/ml)) olarak verildi.

Biyokimyasal analizler için her iki gruptanda alınan rat sayısı Şekil.6. da gösterilmiştir.

3.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Heparinize kan 4 derecede 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı başka bir tüpe alındı. Akyuvar tabakası aspire edildi. Daha sonra üç kez izotonik NaCl ile eritrositler yıkandı ve eritrosit paketi elde edildi. Elde edilen plazma örnekleri ve eritrosit paketleri çalışma gününe kadar -20 derece de saklanmıştır.

3.2.2. Biyokimyasal Verilerin Analizi

Araştırmada, 39 hayvandan veri toplanmıştır. Toplanan verilerin analizinde denek sayısı yetersiz olduğu için parametrik olmayan testler tercih edilmiş olup üç grup içeren değişkenler için Kruskal Wallis testi (k independent samples), İki grub'un karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Araştırmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 18.0 programı ile analiz edilmiştir.

3.3. Genetik Analizler

3.3.1. Dokudan RNA İzolasyonu

30 mg doku RNAase free ependorflara tartıldı. 300 µl Lysis Buffer Solüsyonu eklendi, preslenerek parçalandı ve 10 sn. vortekslendi. 600 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve 24,5°C de 10 dk inkübe edildi. 10 dk. 12000 g' de +4 ° C de santrifüj edildi ve yeni RNAase free tüplere aktarıldı. 450 µl ethanol (96-100 %) eklendi ve pipetlendi. 700 µl solüsyondan alınarak filtrelili coloumn tüplere aktarıldı. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi. Çıkan tüpün alt kısmı döküldü, üst kısmına kalan solüsyon aktarıldı. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi.

700 µl Wash Buffer 1 solüsyonu eklendi. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi, alt kısmı döküldü. 600 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklendi. 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi, alt kısmı döküldü. 250 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklendi. 2 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi, alt kısımları yeni RNAase free ependorflarla değiştirildi. 100 µl Nuclease-free water eklendi, 2 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi. Daha sonra tekrar 1 dk. 12.000 g'de +4 ° C de santrifüj edildi. İzole edilen RNA 'lar -70 ° C de saklandı. Bu çalışmanın tüm aşamaları buz üzerinde yapıldı.

Lysis Buffer Solüsyonu: 1200 µl Lysis Buffer Solüsyonu

25 µl Mercaptoethanol

Proteinaz K solüsyonu: 10 µl Proteinaz K

590 µl Water

Wash Buffer 1 solüsyonu: 8 µl Wash Buffer 1

2 µl ethanol

Wash Buffer 2 solüsyonu: 4600 µl Wash Buffer 2

7800 µl ethanol

3.3.2. Real Time PCR

Her bir kuyu için 5 µl SYBR green master mix (Promega), 0,2 µl Primer karışımı (Forward ve Reverse, 10 pmol) ve 2,8 µl nukleaz içermeyen distile sudan alınıp bir PCR reaksiyon ortamı hazırlandı. Real-time mikropate üzerindeki kuyucuklara 2 µl cDNA örnekleri dağıtıldıktan sonra, hazırlanan bu karışım eklendi. Ardından PCR mikropate film ile kaplanarak, 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Light cycler Roche 480 cihazında aşağıdaki reaksiyon basamakları izlenerek real-time PCR gerçekleştirildi.

Reaksiyon basamakları ise şöyledir;

Pre-inkübasyon: 95°C 10 dakika

Amplifikasyon: 95°C 10 saniye
55 °C 30 saniye
72°C 1 dakika

45 döngü

3.3.3. Veri Analizi

Analiz LightCycler 480 cihazının 465-510 kanalı kullanılarak yapılmıştır. Rölatif kantitasyon analizi ile elde edilen değerler (Target gene/referans gen) kullanılarak, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin değişim oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanarak grafik oluşturulmuştur (Pfaffl 2001). Hesaplama $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{App}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{App}})_{\text{kontrol grubu}}$ formülünden yararlanılmıştır.

Primerler:

β -actin: NC 005111.4 Rattus norvegicus

F 5': GAGGGAAATCGTGCGTGACAT 3'

R 5': ACATCTGCTGGAAGGTGGACA 3'

P53: NC 005109.4 Rattus norvegicus

F 5': CGGAGGTCGTGAGACGCTG 3'

R 5': CACATGTACTTGTTAGTGGATGGTGG 3'

Tnf- α : NC 005119.4 Rattus norvegicus

F 5': AGCCAGGCAGGTTCCGTCCCTC 3'

R 5': TTAGTGTGCCACCAGCCGAC 3'

ATF6: NM 007348

F 5': TCCTCGGTCAGTGGACTCTTA 3'

R 5': CTTGGGCTGAATTGAAGGTTTTG 3'

ATF4: NM 001675

F 5': TGGCTGGCTGTGGATGG 3'

R 5': TCCCGGAGAAGGCATCCT 3'

CHOP: NM 001195053.1

F 5': AGAACCAGCAGAGGTCACAA 3'

R 5': TCTTCCTCCTCTTCCTGA 3'

GRP78: NM 005347.4

F 5': GGTGGATCACAAGGTCAAGAG 3'

R 5': CTACCACGCCCAGCTAATTT 3'

EDEM1: NM 014674.2

F 5': AGGTAGGGCTGAGTGATTACC 3'

R 5': GGC ACTAGAATAGGAGCTGGA 3'

3.4. Patolojik Analizler

Akciğer ve bağırsak dokuları çıkarılarak % 10'luk tamponlu nötral FA solüsyonunda 48 saat süreyle tespit edildi. Dokular trimlenerek doku takip kasetlerine aktarıldı. Akan suda 8 saat süreyle yıkandıktan sonra doku takip cihazı ile (Leica TP 1020) dereceli alkol serilerinden ve ksilenden geçirilerek parafinde bloklandı. Rotary mikrotomla (Leica RM 2155) 6-8 mikron kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitler Hematoksilen Eozin (HE) yöntemi ile boyandı. Zeiss ICC 5 kamera, ZEN görüntüleme yazılımı ile ışık mikroskobunda (Zeiss Axiolab.A1) değerlendirildi ve mikroskobik görüntüleri alındı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Araştırmada 15 kafesten, herbir kafeste 2-4'er hayvan olmak üzere toplam 42 hayvandan veri toplanmıştır. Toplanan verilerin analizinde iki grup içeren değişkenler için bağımsız örnekleme t testi (independent samples t test) uygulanmıştır. Ayrıca bazı değişkenlerin analizinde denek sayısı yetersiz olduğu için parametrik olmayan testler tercih edilmiş olup iki grup içeren değişkenler için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

Bir veri setini büyükten küçüğe veya küçükten büyüğe sıraladığımızda dört eşit parçaya ayıran üç değere kartil adı verilir. Birinci kartil, değişkenin aldığı en küçük değer ile medyan arasının orta değeri, üçüncü kartil ise medyan değeri ile en büyük değer arasının orta değeridir. Birinci kartil değerlerin ilk çeyreklik yani %25 lik kısmını oluşturur üçüncü kartil ise üçüncü çeyreklik yani değerlerin %75 lik kısmını oluşturur. Veri Seti, çalışmamızda tek rakamlı (9) hacimli olması sebebi ile, $(n+1)/4$ ncü eleman 1.Kartil, $(3n+1)/4$ ncü eleman 3.Kartil olarak ifade edilmiştir.

Gruplar arası fark karşılaştırılmasında ANOVA analizi uygulanmıştır. Tüm grub ortalamalarını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (one way anova) kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığını test etmek için Kolmogorov Smirnov testi uygulanmış ve $p<0,05$ değeri anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 18.0 programı ile analiz edilmiştir.

3.6. Hücre Kültürü Analizleri

Çalışmamızda kolon kanser hattı olarak “ CaCo-2/ An1 (Human Colon Adeno Carcinoma-insan)” kullanılmıştır. Şap Enstitüsü’nden alınan Caco-2 hücreleri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Antibiyotik (Penisilin/streptomisin) ve DMEM medium içeren taze vasat içerisinde, %5 CO₂ etüvde 37°C’de kültüre edildi. Hücreler T25 flask yüzeyini %80-90 oranında kapladığında, 2 ml tripsin-EDTA ile muamele edildi. Yaklaşık 4-5 dakika sonra hücreler kalkınca, tripsinizasyonu durdurmak amacıyla %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Antibiyotik (Penisilin/streptomisin) ve RPMI1640 medium içeren 4 ml taze vasat ortama eklendi. Ardından bu hücre süspansiyonu 15ml ’lik falkon tüp içerisine alınıp, 1500 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelet üzerine yine %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Antibiyotik (Penisilin/streptomisin) ve RPMI1640 medium içeren taze vasat eklenip iyice pipetaj yapıldı. Pipetaj sonrasında hücreler pasajlanmak amacıyla 2 ayrı flaska ekildi. Hücre yoğunluğu ve çoğalmasına göre hücreler pasajlandı.

MTT analizi

Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler en az 3000 hücre olacak şekilde 96 well'lere dağıtıldı. 24 saat %5 CO₂ etüvde 37°C’de inkübe edilen hücreler 96 well'lere tutunduktan sonra üzerindeki medium atıldı. Üzerine 40mg/l, 80mg/l, 120mg/l, 160mg/l ve 200 mg/l dozlarda hazırlanmış SLO ve SC ile hazırlanmış taze vasattan 100 µl eklendi. Uygun saatlerde ölçümden önce madde uygulanmış mediumlar atıldı. Üzerine 50 µl, 5 mg/ml MTT solüsyonu eklendi. %5 CO₂ etüvde 37°C’de 3 saat inkübe edildikten sonra, MTT solüsyonu atıldı. Ardından karanlık ortamda hücrelerin üzerine DMSO eklendi. ElisaReader (BİOTEK) cihazında 570 nm dalga boyunda ölçüm alındı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular:

	CEA	CA-125	CA19-9	AFP
KONTROL grubu 1. RAT	0,2	0,6	0,6	0,605
KONTROL grubu 2. RAT	0,2	0,6	0,6	0,605
KONTROL grubu 3. RAT	0,2	0,6	0,6	0,605
Sadece DMH verilen grup 1. RAT	0,2	0,6	36,23	0,500
Sadece DMH verilen grup 2. RAT	0,2	0,636	72,05	0,605
Sadece DMH verilen grup 3. RAT	0,2	0,6	11,67	0,500
Sadece DMH verilen grup 4. RAT	0,2	0,6	6,20	0,500
Sadece DMH verilen grup 5. RAT	0,2	0,6	3,82	0,500
Sadece DMH verilen grup 6. RAT	0,2	0,6	2,33	0,500
DMH ve SC verilen grup 1. RAT	0,2	0,6	1,71	0,500
DMH ve SC verilen grup 2. RAT	0,2	0,6	1,72	0,500
DMH ve SC verilen grup 3. RAT	0,2	0,6	1,53	0,500
DMH ve SC verilen grup 4. RAT	0,2	0,6	0,6	0,600
DMH ve SC verilen grup 5. RAT	0,2	0,6	1,23	0,500
DMH ve SLO verilen grup 1.RAT	0,2	0,6	1,84	0,500
DMH ve SLO verilen grup 2.RAT	0,2	0,6	1,81	0,500
DMH ve SLO verilen grup 3.RAT	0,2	0,6	1,82	0,500
Sadece DMH verilen (tedavi öncesi)(1RAT)	0,2	0,636	72,05	0,605

Tablo 2. DMH Verilerek Kolon Kanseri Yapılan Rat Grubuna Ait Biyokimya Sonuçları

	N	Ortalama	1.Kartil	3.Kartil	P
CA125	14	0,602	0,6	0,6	0,513
CEA	14	2	0,2	0,2	1
CA19-9	14	8,609	0,5	5,01	0,003*
AFP	14	0,530	0,915	0,602	0,745

p>0,05

Tablo 3. DMH; DMH + SC ve DMH + SLO iyileştirmelerine göre karşılaştırılması.

Tablo 3'de DMH verilmesine karşın tedavi edici olarak kıkırdak ve yağ kullanımına yönelik deney sonuçlarının karşılaştırılmasına ilişkin Kruskal Wallis testi sonuçları verilmiştir. Buna göre sadece DMH, DMH + SC ve DMH + SLO iyileştirmeleri arasında CA19-9 değerleri açısından istatistiksel olarak fark gözlenmiştir (p<0,05).

Tabloya göre CA19-9 tümör markeri açısından, DMH verilen ratlarda diğer markerlara göre daha fazla yükselme olduğu gözlenmiş, DMH+ SC ve DMH+SLO verilen ratlarda CA19-9 değerlerinin düştüğü görülmüştür. Bu düşüş SC'de SLO'ya göre daha fazla olduğu tesbit edildiğinden dolayı, tedavi etme başarısı olarak SC'nin SLO'ya göre daha başarılı olduğu söylenebilir.

	CAT	SOD	MDA	GPX
KONTROL grubu 1.RAT	130	0,87	22,00	54,60
KONTROL grubu 2.RAT	154	2,70	39,20	73,56
KONTROL grubu 3.RAT	125	3,17	24,80	72,28
Sadece FA verilen grup 1.RAT	2028,03	488,40	98,29	1016,22
Sadece FA verilen grup 2.RAT	1508,40	18,07	49,09	397,32
Sadece FA verilen grup 3.RAT	869,59	32,02	40,91	481,37
Sadece FA verilen grup 4.RAT	1758,68	322,12	105,48	1153,75
Sadece FA verilen grup 5.RAT	864,83	14,51	33,64	580,70
FA ve SC verilen grup 1.RAT	607,39	27,94	40,00	435,52
FA ve SC verilen grup 2.RAT	609,78	14,51	21,82	588,34
FA ve SC verilen grup 3.RAT	521,58	9,13	22,73	489,01
FA ve SC verilen grup 4.RAT	605,01	12,5	23,64	664,75
FA ve SC verilen grup 5.RAT	411,94	5,40	41,00	756,43
FA ve SC verilen grup 6.RAT	404	7,31	48,00	75,24
FA ve SC verilen grup 7.RAT	340	7,31	44,05	66,29
FA ve SLO verilen grup 1.RAT	266	4,30	38,25	88,40
FA ve SLO verilen grup 2.RAT	157	3,46	45,05	91,15
FA ve SLO verilen grup 3.RAT	161	3,33	26,70	49,87
FA ve SLO verilen grup 4.RAT	198	2,31	31,50	66,08
FA ve SLO verilen grup 5.RAT	210	3,84	43,10	66,67
FA ve SLO verilen grup 6.RAT	232	4,72	38,25	71,28
FA ve SLO verilen grup 7.RAT	208	2,11	31,50	64,33
FA+SLO (1RAT-tedavi süresinde)	1758,68	322,12	105,48	1153,75
FA+ SC (1RAT-tedavi süresinde)	2028,03	488,40	98,29	1016,22

Tablo 4. FA Verilerek Akciğer Hasarı Oluşturulan Rat Grubuna Ait Biyokimya Sonuçları.

	N	Ortalama	1.Kartil	3.Kartil	P
CAT	19	560,465	188,75	673,542	0*
GPX	19	336,507	66,575	582,61	0,007*
MDA	19	41,318	26,225	44,3	0,125
SOD	19	45,001	3,29	15,4	0,001*

p>0,05

Tablo 5. FA; FA + SC ve FA + SLO iyileştirmelerine göre karşılaştırılması.

Tablo 5'deki sonuç dikkate alındığında FA'nın akciğer üzerine olan toksik etkileri karşılaştırılmıştır. FA, FA + SC ve FA + SLO değerlerine bakıldığında CAT(Katalaz), GPX(glutatyon peroksidaz) ve SOD(süperoksit dismutaz) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir(p<0,05). Sadece MDA(malondialdehit) değerinde fark tespit edilmemiştir (p>0,05).

Antioksidan etkiler açısından 3 enzim (CAT, SOD ve GPx) değerleri FA uygulamasında kontrole kıyasla artmakta, tedavi edici olarak hem SC hemde SLO verilmesi bu 3 enziminde düzeyinde sadece FA verilen grubun değerlerine göre düşerek hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu verilerine yaklaştığı görülmektedir. Kendi içerisinde karşılaştırma yaparsak SC' ye kıyasla özellikle SLO verilmesi bu 3 enziminde düzeyinde sadece FA verilen gruba göre çok belirgin düşüşe neden olmuş olup; FA uygulamasının toksik etkisi bu 3 enzimin daha fazla antioksidan etki ortaya koymaları ile kendini göstererek yükselmiş ancak, SC ve SLO uygulamalarında gelişen tedaviye bağlı olarak savunma ihtiyacının azlığı ile düzeylerinde azalma ortaya çıkmıştır.

Biyokimyasal parametrelerden MDA değerlerine baktığımızda ise, FA verilen ratlarda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fazla miktarda arttığını, SC ve SLO verilmesi sonucu başlayan hasar tamiri ile bu değerlerin düştüğünü, yine de kontrol grubu ile kıyaslandığında bu değerlerin kontrol grubunun biraz üzerinde kaldığını görmekteyiz. Buradan yola çıkarak SC ve SLO'nun hasarın tamiri açısından belli derecelerde iyileşme sağlamıştır diyebiliriz. MDA değerlerini düşürmede ise SC ve SLO yaklaşık aynı düzeyde başarı göstermiştir.

Tedavi Bakımından:

	N	Ortalama	1.Kartil	3.Kartil	P
CEA	17	0,2	0,2	0,2	1
CA19-9	17	8,609	0,915	5,01	0,013*
CA125	17	0,602	0,6	0,6	0,643
AFP	17	0,53	0,5	0,602	0,002*

^{p>0,05}

Tablo 6. DMH içeren grupların iyileştirmelerine yönelik kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Tablo 6 incelendiğinde DMH içeren grupların ve kontrol grubu biyokimyasal sonuçları karşılaştırıldığında CA19-9 ve AFP değeri arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna rağmen CEA ve CA125 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). DMH uygulaması ile kanser oluşumu ve tedavi edici olarak verilen kıkırdak ve SLO uygulamalarının bu hasarı karşılamadaki etkileri arasında kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda CA19-9 ve AFP değeri bakımından istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu farklılık belirgin olarak CA19-9 da kendini daha fazla göstermiş olup sadece DMH uygulanan gruplarla tedavi edici olarak verilen SC ve SLO uygulamaları arasında değerlerde belirgin düşüş gözlenmiştir. Yani SC ve SLO uygulamaları kanserleşmeyi engelleyici olarak tedavide başarılı bulunmuştur.

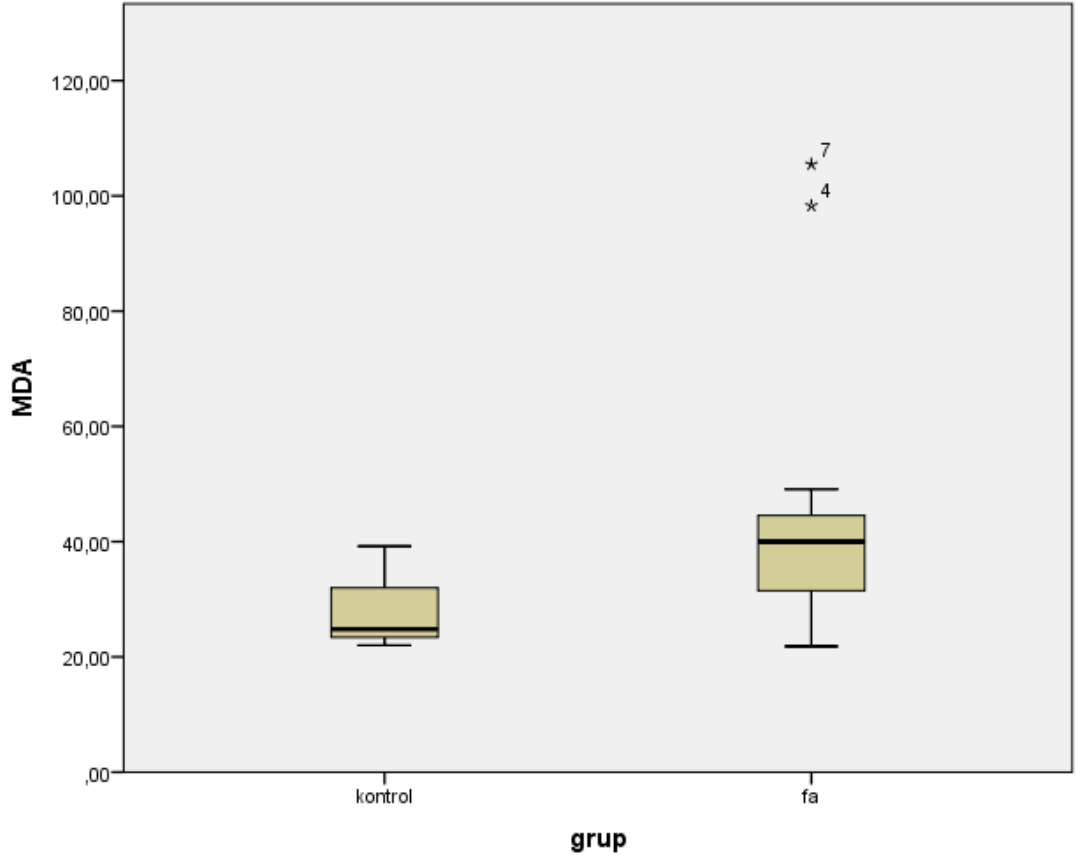
Kendi içinde kıyaslanınca tedavi başarısı açısından SC SLO'ya kıyasla daha iyi sonuç vermiştir. AFP açısından ise farklılık kontrole kıyasla çok belirgin olmamakla beraber yine SC açısından daha fazla düşme gözlenmiş ve tümör markeri olarak kullanılan değerdeki bu düşme özellikle SC'nin tedavide başarılı olduğu sonucunu doğurmaktadır.

	N	Ortalama	1.Kartil	3.Kartil	P
CAT	22	560,465	188,75	673,542	0,006*
MDA	22	41,318	26,225	44,3	0,138
SOD	22	45,001	3,29	15,4	0,019*
GPX	22	336,507	66,575	582,61	0,138

^{p>0,05}

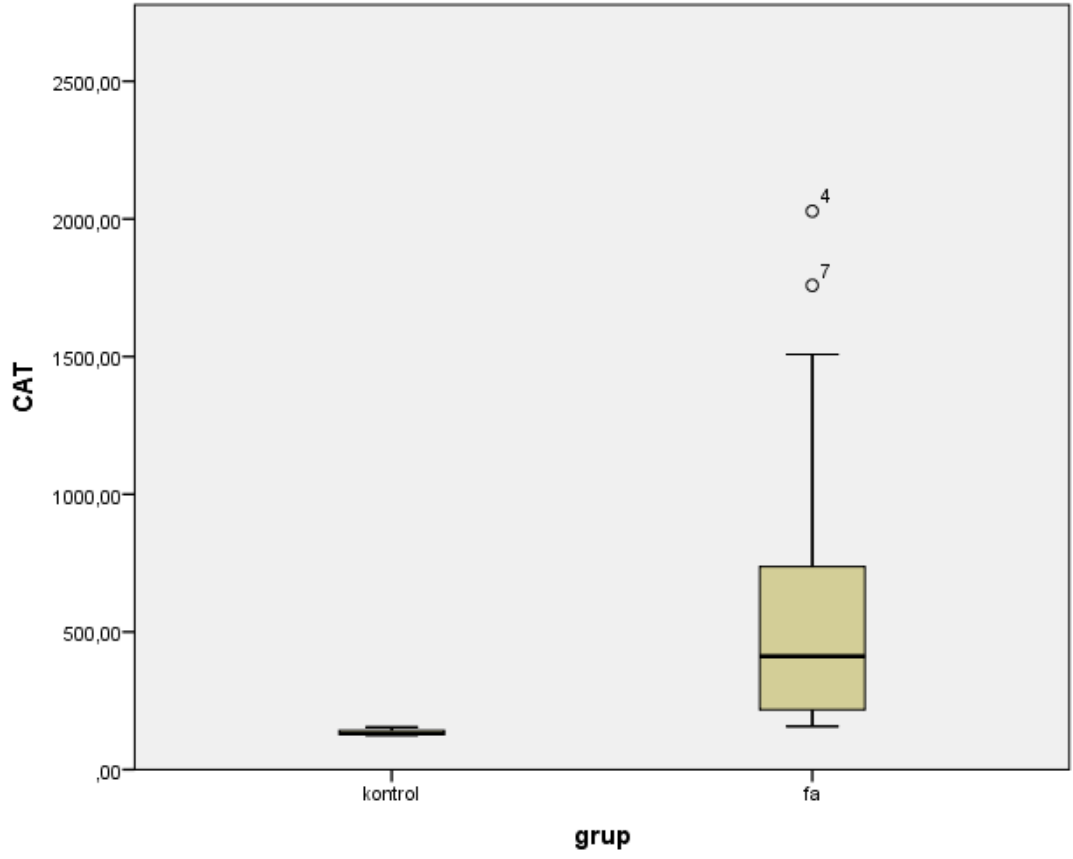
Tablo 7. FA içeren grupların iyileştirmelerine yönelik kontrol grubu ile karşılaştırılması

Tablo 7’te denek grubunun ve kontrol grubunun iyileştirmelerine yönelik deney sonuçları verilmiştir. Buna göre kontrol grubu ve FA içeren deneklerin biyokimyasal MDA(malondialdehit) ve GPX(glutasyon peroksidaz) değerleri arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Fakat SOD(süperoksit dismutaz) ve CAT(Katalaz) değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrole kıyasla SOD ve CAT antioksidan savunma sistemi enzimlerinin değerlerinde önemli düzeyde bir düşme meydana gelmiş olup; kullanılan toksik etkili FA uygulamasında bu enzimlerin yükselerek savunmayı başlattığı; tedavi edici olarak verilen kıkırdak ve SLO uygulamaları ile SOD ve CAT antioksidan enzimlerinin düzeyinde belirgin bir düşme görülmesi ile bunun tedavide kullanılan maddelerin başarısına bağlı olarak savunma mekanizmalarına ihtiyacın azalması ile pasifize olduğu şeklinde düşünülmektedir. Tedavi açısından kendi içinde kıyaslama yapılırsa SLO’nun SC’ye kıyasla değerleri daha fazla düşürerek daha etkin tedavi yapabildiği, böylece savunma mekanizmalarına olan ihtiyacın daha fazla azaldığı düşünülmektedir.



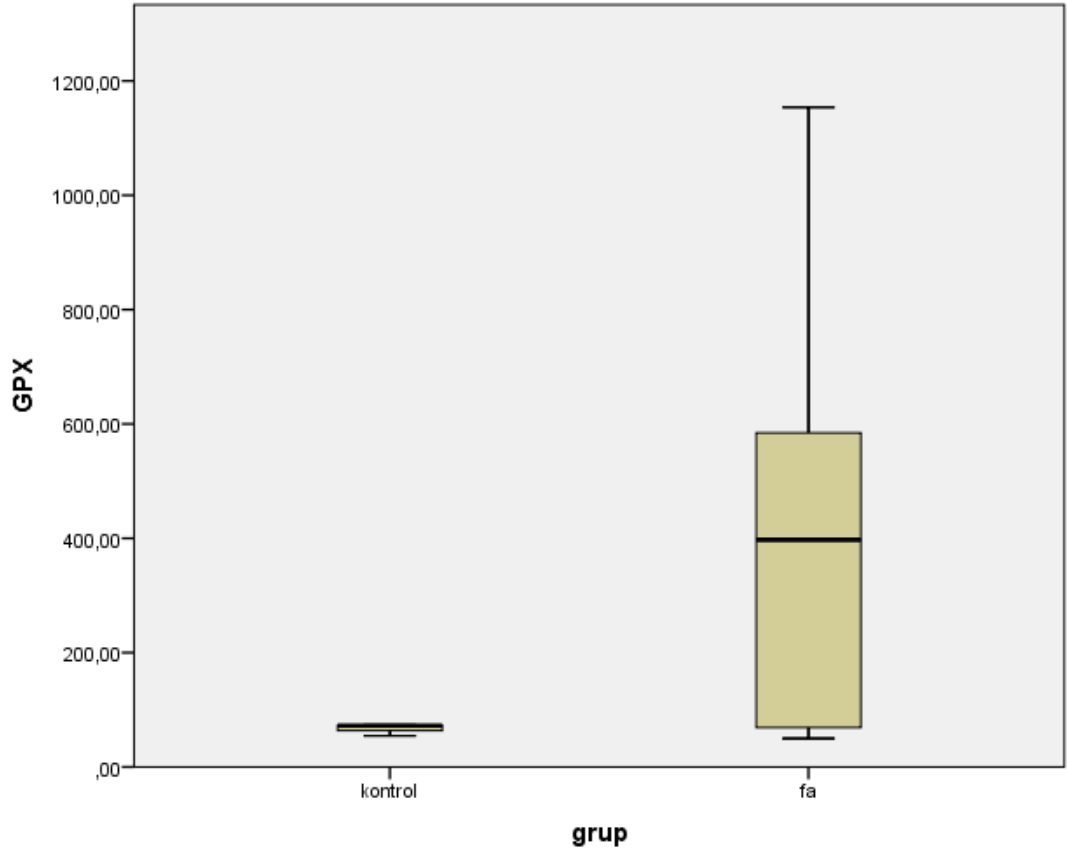
Grafik 1. FA verilen ve kontrol grubunun MDA değerlerini gösteren grafik.

Grafikte FA verilen grupta, kontrol grubuna göre oksidatif hasara bağlı olarak artan MDA değerleri grlmektedir.



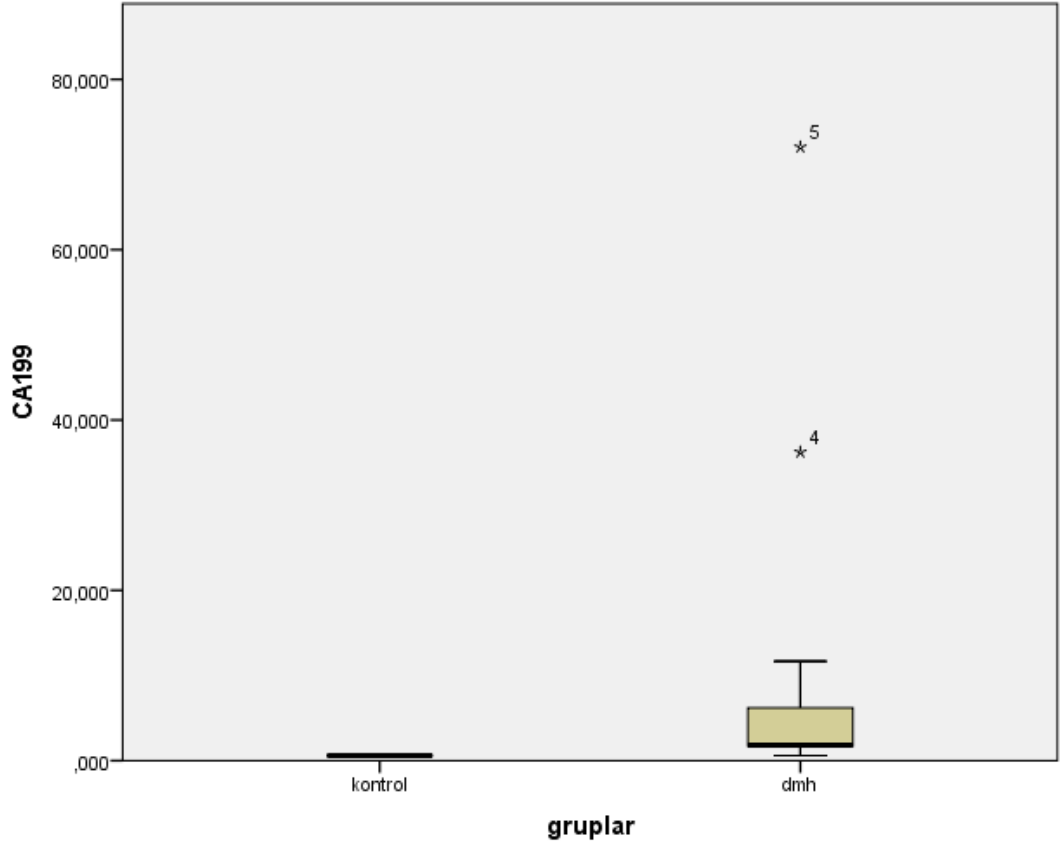
Grafik 2. FA verilen ve kontrol grubunun CAT değerlerini gösteren grafik.

Grafikte FA verilen grup ve kontrol grubu arasında CAT değerleri arasında belirgin bir fark olduğu grlmektedir. Artan değer FA uygulamasına karşın savunma mekanizmasının aktif hale geldiğini göstermektedir.



Grafik 3. FA verilen ve kontrol grubunun GPX değerlerini gösteren grafik.

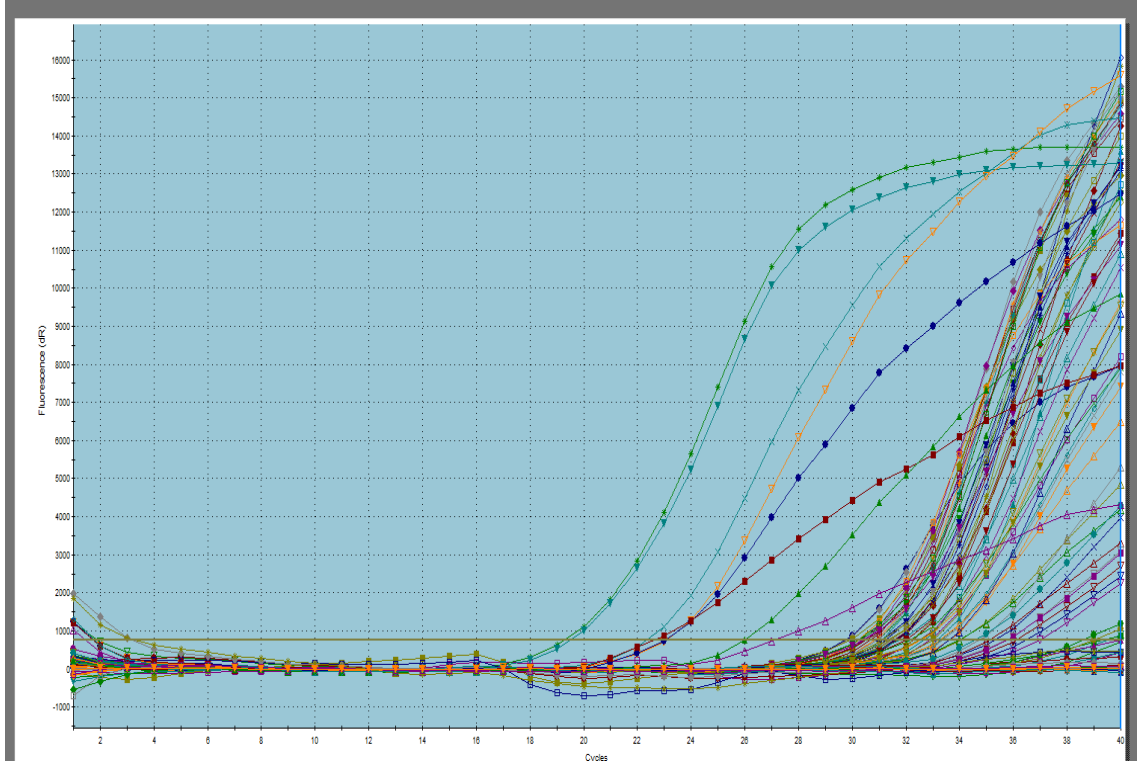
Grafikte FA verilen grupta GPX değerinde kontrole kıyasla bir artış olduğu grlmektedir. Artan değer FA uygulamasına karşın savunma mekanizmasının aktif hale geldiğini göstermektedir.



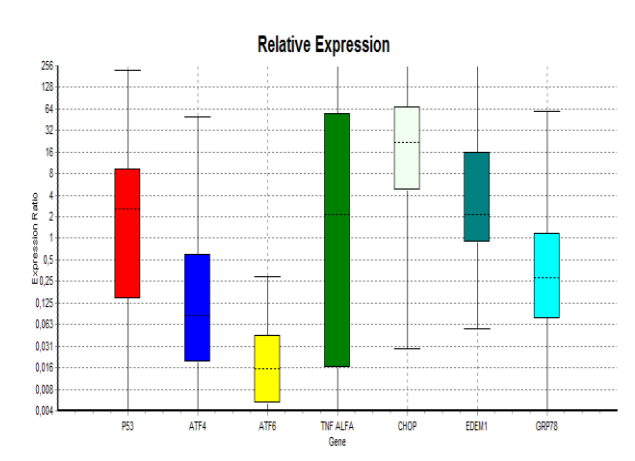
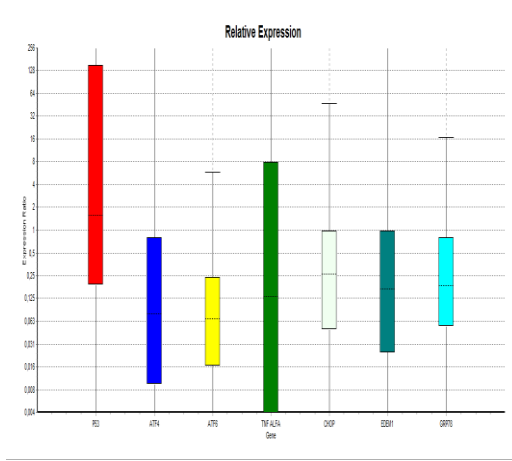
Grafik 4. DMH verilen ve Kontrol grubunun CA19-9 değerlerini gösteren grafik.

Grafikte DMH verilen gruptaki örneklere CA19-9 değerlerinin kontrole kıyasla arttığını görmekteyiz. Buna göre; DMH uygulamasının tümör markerı olarak kullanılan CA19-9 değerindeki kontrole kıyasla yarattığı artışı tümörleşme meydana getirmekte olduğunun işareti olarak grlmektedir.

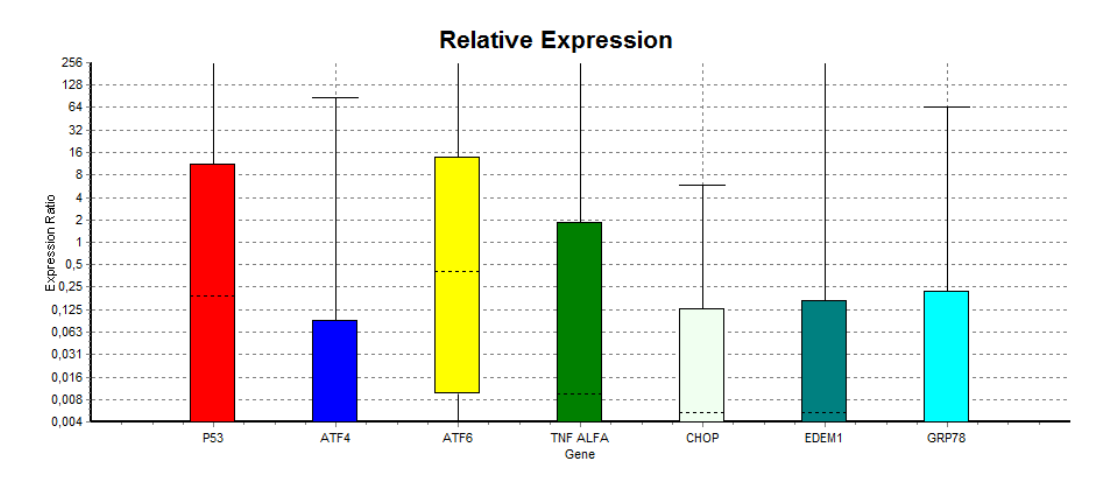
4.2. Genetik Bulgular:



Grafik 5. Rat Beta aktin kontrol geni çalışma profili.



Grafik 6. DMH- Genetik Analiz Grafiği **Grafik 7.**DMH+SC-Genetik Analiz Grafiği



Grafik 8. DMH+SLO-Genetik Analiz Grafiği

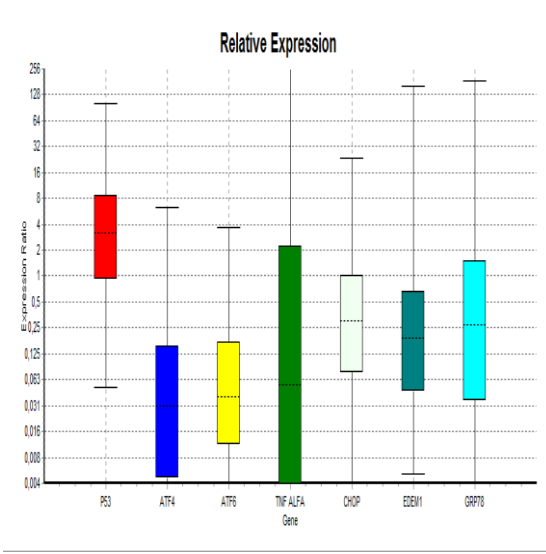
Birinci grafikte DMH kullanımı ile CHOP ve EDEM1 genlerinin aktivitesinin düştüğü görülmektedir. CHOP ve EDEM1 gen aktivitesinin düşmesi, DMH 'nin dokular üzerinde kanserojen etkisi olduğunu göstermektedir.

İkinci grafikte DMH ile birlikte SC alımında ise CHOP aktivitesinde yükselme görülmüştür. CHOP gen aktivitesi artışı ile tümör baskılayıcı özelliğini göstermiş, SC dokulardaki tedavi edici etkisini göstermeye başlamıştır. ATF4 ve ATF6'nın gen aktivitelerinde düşme'nin gözlenmesi ise bunların kanserleşmeyi tetikleyici rolünün azalmasına sebep olması nedeni ile SC'nin dokulardaki tedavi edici etkisini desteklemektedir.

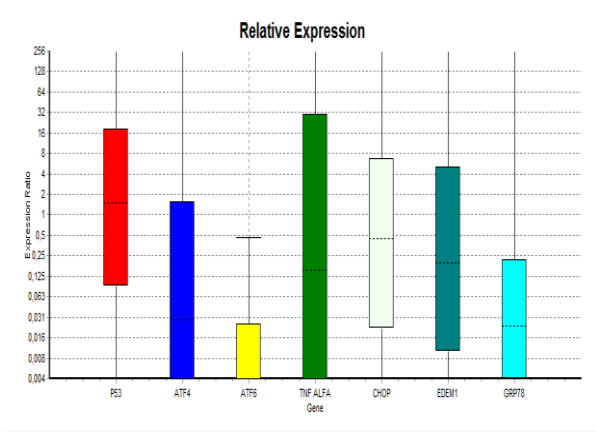
DMH+SLO grafiğinde ise ATF4 ve GRP78 genlerinin aktivitesinin düşmesi ile yine SLO'nun tedavi edici etkisini ortaya koyduğu görülmektedir.

DMH grubunda CHOP ve EDEM1 gen aktivitelerindeki yükselme ile buna karşın ATF4 ve ATF6'nın aktivitelerindeki düşme düzeyi baz alınarak tedavi edicilik açısından karşılaştırdığımızda ise SC, SLO'ya göre daha başarılı bulunmuştur.

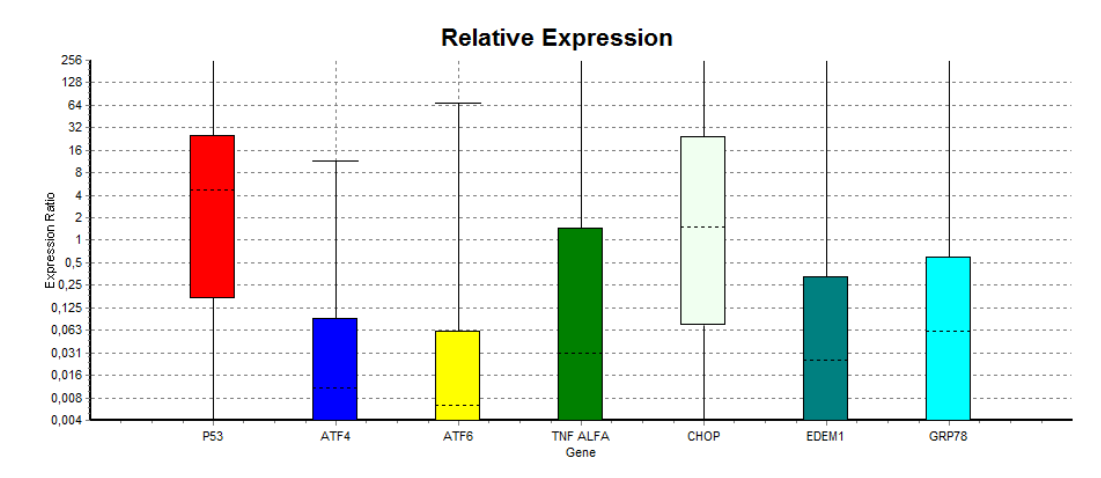
Diğer genlerin aktivitesinde ise anlamlı bir fark görülmemektedir.



Grafik 9.FA -Genetik Analiz Grafiği



Grafik 10. FA+SC -Genetik Analiz Grafiği



Grafik 11. FA+SLO -Genetik Analiz Grafiği

Birinci grafikte FA kullanımı ile CHOP ve EDEM1 genlerinin aktivitesinin düştüğü görölmektedir. Burada FA' in akciğer dokularında oluşturduğu harabiyetten dolayı tümör supresör genlerin olumsuz etkilendiği düşünölmektedir.

FA+SC grafiğinde GRP78 gen aktivitesinin düştüğü görölmektedir. Burada tedavi edici amaçla kullanılan SC'nın GRP78 kanserleştirici gen ekspresyonunu baskılayarak etki ettiği düşünölmektedir.

FA+SLO grafiğinde ise ATF4, ATF6, GRP78 genlerinin aktivitesinin düştüğü görölmektedir. Yine tedavi edici amaçla kullanılan SLO'nun hasar tamiri ile bu kanserleşmeye sebep olan genlerin ekspresyonunun azalmasına neden olduğu; buna karşın CHOP geninin ekspresyonunu artırarak hasarın tamiri açısından koruyuculuk meydana getirdiği tesbit edilmiştir.

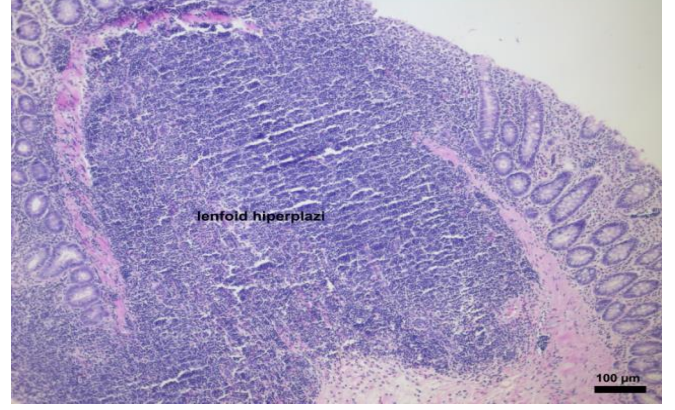
FA grubunda SC ve SLO'nun tedavi ediciliği açısından kıyasladığımızda, FA uygulamasına kıyasla görölen CHOP ve EDEM1 gen aktivitelerindeki artış ile ATF4 ve ATF6 gen aktivitelerindeki düşme bakımından özellikle SLO'nun daha başarılı olduğu gözlenmektedir.

Diğer genlerin aktivitelerinde ise anlamlı bir fark görölmemektedir.

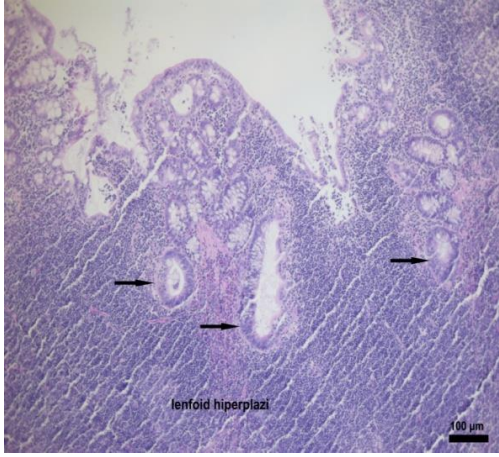
4.3. Patolojik Bulgular:



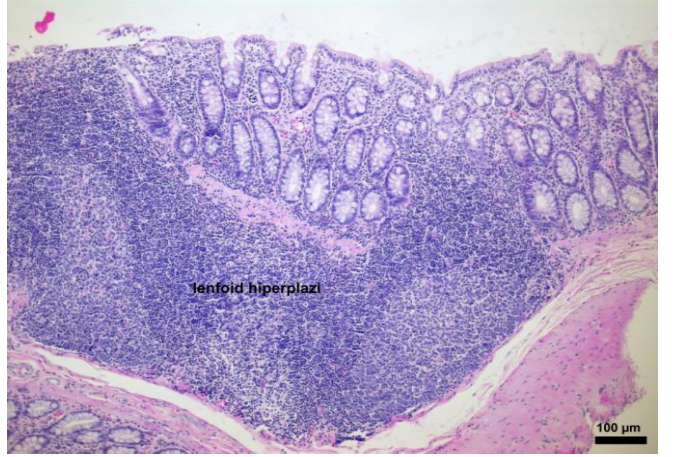
A1



B1



C4



D3

Şekil 9. Kolon Kanseri Oluşturmak İçin DMH Verilen Ratların Patoloji Sonuçları.

A1 deki örnek kontrol grubuna aittir. Bu gruptaki rata çalışma süresi boyunca hiçbir kimyasal madde verilmemiştir. Sonuç normal görünümlü bir bağırsak dokusuna aittir.

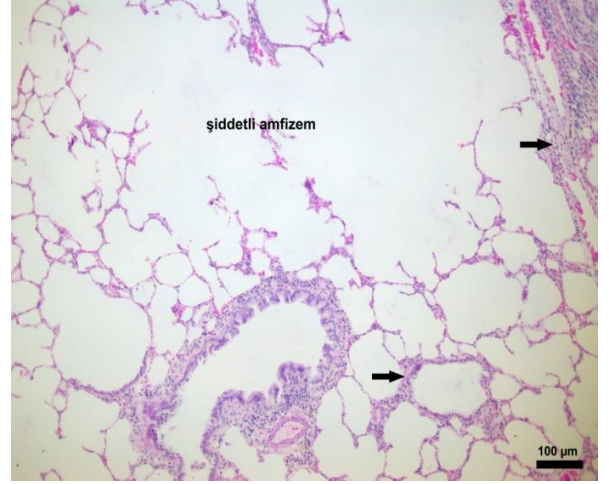
B1 deki örnek sadece DMH verilerek kolon kanseri oluşturulmaya çalışılan gruba ait bir ratın bağırsak dokusudur. Bu dokuda çalışma sonunda şiddetli lenfoid hiperplaziler gelişmiştir.

C4 deki örnek doku DMH verildikten sonra SC verilerek tedavi edilmeye çalışılan gruba aittir. Bu dokuda şiddetli lenfoid hiperplaziler lenfoid hiperplaziye gerilemiştir. Şekilde lenfoid hiperplaziler içinde 3 farklı bölgede displazik bezler olduğu görülmektedir. Ok işaretleri displazik bezleri göstermektedir.

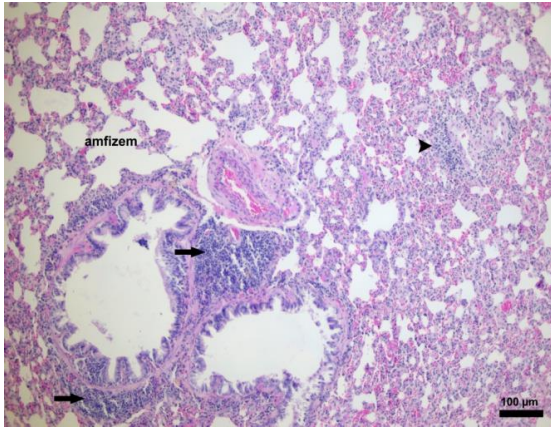
D3 deki örnek doku DMH verildikten sonra SLO verilerek tedavi edilmeye çalışılan gruba aittir. Bu dokuda da şiddetli lenfoid hiperplazilerin lenfoid hiperplaziye gerilediği görülmektedir.



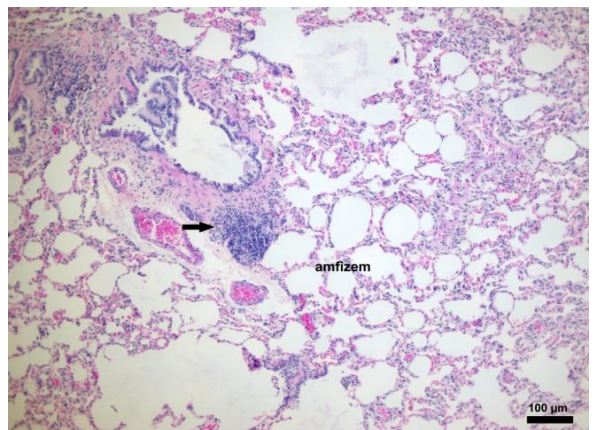
E2



F5



G4



H2

Şekil 10. FA Verilerek Akciğer Hasarı Oluşturulan Ratların Patoloji Sonuçları.

E2 deki örnek kontrol grubuna aittir. Bu gruptaki rata çalışma süresi boyunca hiçbir kimyasal madde verilmemiştir. Sonuç normal görünümlü bir akciğer dokusuna aittir.

F5 deki örnek sadece FA verilerek akciğer hasarı oluşturulmaya çalışılan gruba ait bir ratın akciğer dokusudur. Bu dokuda çalışma sonunda şiddetli amfizem gelişmiştir. Ok işaretleri şiddetli amfizemli alanları göstermektedir.

G4 deki örnek doku FA verildikten sonra SC verilerek tedavi edilmeye çalışılan gruba aittir. Bu dokuda şiddetli amfizem olan alanlar hafif şiddetli amfizemli alanlara gerilemiştir. Şekilde hafif şiddetli amfizem alanları ile birlikte hafif şiddetli cuffing, orta şiddetli interalveoler kalınlaşma ve multifokal mononükleer hücre infiltrasyonları görülmektedir. Ok işaretleri hafif şiddetli amfizemli alanları göstermektedir.

H2 deki örnek doku FA verildikten sonra SLO verilerek tedavi edilmeye çalışılan gruba aittir. Bu dokuda da şiddetli amfizem olan alanlar orta şiddetli amfizemli alanlara gerilediği görülmektedir. Ayrıca hafif şiddetli cuffing de mevcuttur. Ok işaretleri orta şiddetli amfizemli alanları göstermektedir.

SKORLAMA

0. Yok
1. Hafif Şiddetli
2. Orta Şiddetli
3. Şiddetli
4. Çok Şiddetli

	Amfizem	Cuffing	İnteralveoler Kalınlaşma	İnterstisyel Pnömoni
Kontrol	2	2	0	0
FA	3	0	0	2
FA + SLO	2	1	0	0
FA + SC	1	1	2	0

Tablo 8. FA Verilerek Akciğer Hasarı Oluşumunda Skorlama Tablosu

	Dizplazi	Lenfoid Hiperplazi
Kontrol	0	0
DMH	0	3
DMH +SLO	0	2
DMH + SC	2	2

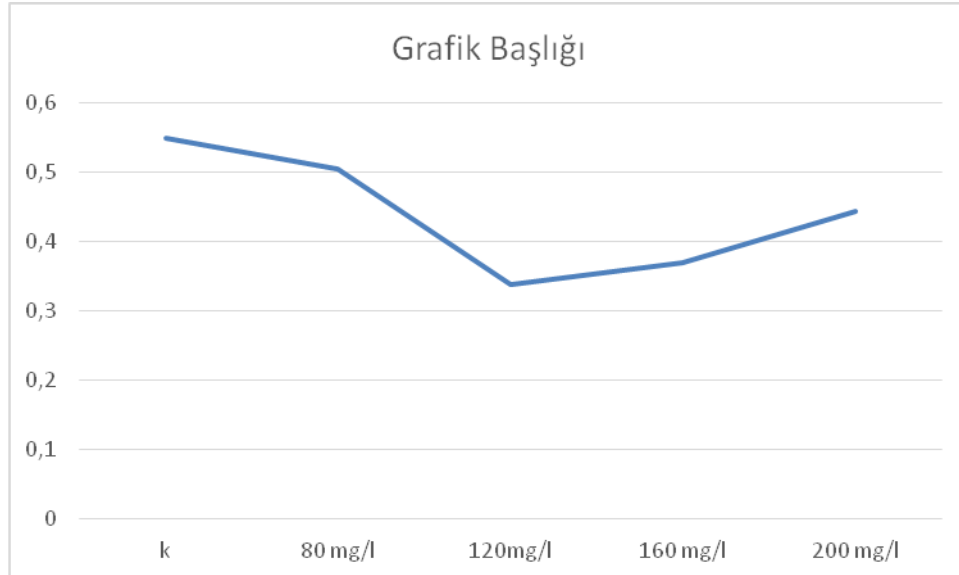
Tablo 9. DMH Verilerek Kolon Kanseri Oluşumunda Skorlama Tablosu

4.4. Hücre Kültürü Bulguları:

MTT analizi için 96 well'lere 1000-100.000 hücre aralığında sayılmış olan Caco-2 hücreleri eşit oranda ekilmiş ve bir gece boyunca kültüre edilmiştir. Ardından 25 mg/ml oranında hazırlanan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) boyası her bir kuyuya 10 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. 4 saat 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Ardından boya atılıp üzerine karanlık ortamda 100 µL DMSO eklenmiştir. Plate'ler karanlık ortamda tutularak ELISA plate reader'da 490 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır.

SC Caco-2 için ; IC50 etkin doz değeri 6.saatte 120 mg/l olarak bulunmuştur.

k	0,5495
80 mg/l	0,504958
120mg/l	0,338333
160 mg/l	0,369444
200 mg/l	0,444

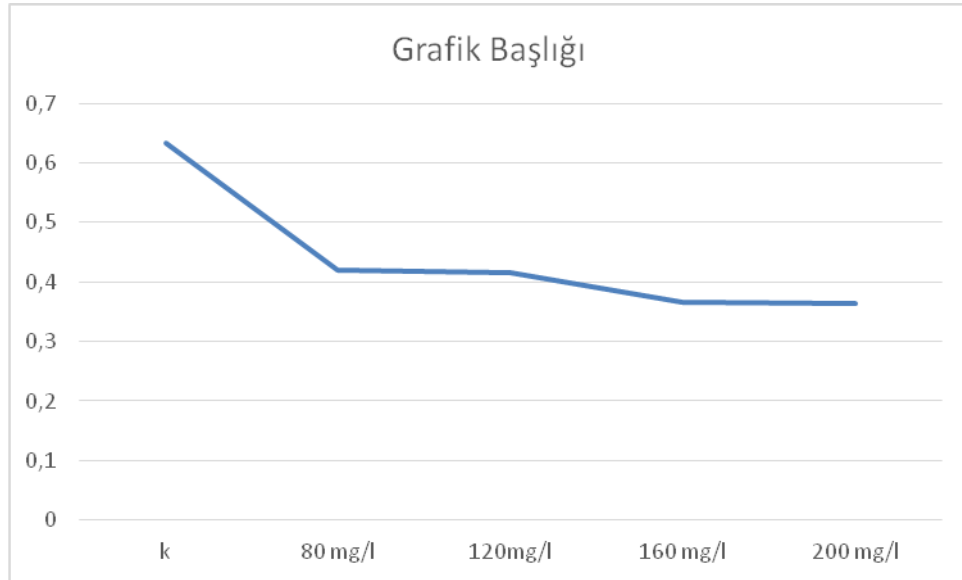


Grafik 12. IC50 etkin doz değeri grafiği (6. saatte ve 120mg doz).

Bu değer SC'nin 6. saatte ve 120mg doz verildiğinde en etkin şekilde kanser hücresinin ölümüne neden olabildiği anlamına gelmektedir.

SLO Caco-2 için; IC50 etkin doz değeri 24.saatte 200 mg/l olarak bulunmuştur.

k	0,633
80 mg/l	0,420167
120mg/l	0,416292
160 mg/l	0,365417
200 mg/l	0,364583



Grafik 13. IC50 etkin doz değeri grafiği (24. saatte ve 200mg doz).

Bu değer SLO'nun 24. saatte ve 200mg doz verildiğinde en etkin şekilde kanser hücresinin ölümüne neden olabildiği anlamına gelmektedir.

5. TARTIŞMA

5.1. DMH Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Yapılan çalışmalarda deneysel kanser oluşturmak için değişik dozların değişik sürelerde uygulandığı görülmektedir. Thurher ve ark.'nın (1973) yaptığı çalışmada farelere haftada tek doz şeklinde 24 hafta süresince (20 mg/kg) DMH uygulanmış ve tedavinin başlangıcından 186 gün sonra hayvanların % 90'ında kolon kanserinin olduğu rapor edilmiştir. DMH'in kolon kanseri oluşturmak için kullanıldığı bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Jackson ve ark. (1999) ise farelere 6,8 mg/kg DMH dozunu 1, 5, 10 ve 20 hafta süresince uyguladıktan sonra, fareleri iki yıl boyunca takip etmiştir. DMH dozundaki artışın farelerin hayatta kalma süresini azalttığını tespit etmiştir. Ayrıca toplam 34, 68 ve 136 mg/kg DMH alan hayvanların sırasıyla % 26, % 76 ve % 87'sinde kolon tümörlerinin geliştiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar araştırmamızda da kullandığımız DMH'in etkilerini desteklemektedir.

Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise DMH uygulamasına ait doza bağlı değişimler 10-30 mg/kg arasında, süreye bağlı değişimler ise 1 hafta ile 22 haftalık uygulama arasında değişmekte olup, DMH hayvanlara subkutan veya intraperitoneal tarzda uygulanmıştır. Bu çalışmaların hemen hepsinde de kolon mukozasından histopatolojik değişiklikler rapor edilmiştir (Wang ve ark 2004; Kingsnorth ve ark 1985; Newell ve Heddle 2004; Moorghen ve ark 1998; Leblanc ve Perdigon 2004; Kozoni ve ark 2000; Wu ve ark 1994). Bu çalışmalar, DMH'in kanser yapıcı etkisinin ispatlanması açısından deneysel modelimizle uyumludur.

Cooper ve ark., (1978) farklı ırklar üzerinde DMH'in etkisini incelediği çalışmada DMH'in aktivasyon ve inaktivasyonuna karışan metabolik yolların hayvanların çeşitli ırklarında ve organlarında farklı bir şekilde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli fare ırklarında (Balb/C, C57BL/6J ve C3H) DMH uygulaması yapan Kuraguchi ve ark. (2001) DMH uygulamasına karşı Balb/C farelerinin C57BL/6J farelerinden 10 kat daha fazla ve C3H farelerinin ise C57BL/6J farelerinden 5 kat daha fazla yanıt verdiğini ve DMH'a karşı en hassas ırkın Balb/C türü olduğunu rapor etmiştir.

Heijstek ve ark. (2005) kolorektal kanser gelişme oranının kullanılan karsinojen'in dozu, uygulama sıklığı ve süresine bağlı olduğu kadar uygulama şekline de bağlı olduğunu bildirmiştir. Deneysel modelimizde kanserojen madde olarak kullandığımız DMH subcutan olarak uygulanmış ve 10 aylık bir çalışmadan sonra sonuçlar alınmaya başlanmıştır.

Karaca ve arkadaşlarının kolon kanseri indüklenmesi ile ilgili yaptığı bir çalışmada, DMH'nin tekrarlanan dozları sonucunda, farelerde uzun bir sessizlik döneminden sonra kolonik tümörlerin geliştiği gözlemlenmiştir (Karaca ve ark 2010). Çalışmamızda da benzer şekilde DMH'nin tekrarlanan dozları sonucunda, uzun bir sessizlik döneminden sonra gelişen displazileri gözlemlemekteyiz.

Yüksek düzeyde lifli veya yağlı gıdalarla uzun süreli beslenme kalın bağırsak mukuzasını değiştirmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada ratlara DMH verilerek kalın bağırsak emilim düzeyi test edilmeye çalışılmıştır. Erkek Sprague-Dawley cinsi ratlar 6 hafta süre ile 4 diyetten (%12 ve % 47 lik kalorili mısır özü yağı ve %15± lif içerikli buğday) biri ile beslemeye tabi tutulmuş ve sonrasında DMH emilimi ve safra asit atılımı test edilmiş. DMH emilimi en fazla yüksek mısır özü yağı ile beslenenlerde bulunmuş. Lif içeriği ise safra asit atılımını değiştirmiş olup, lif düzeyi arttıkça safra asit atılımı azalmış. Bu sonuçlara göre yüksek yağla beslenmenin DMH emilimini artırmakta olduğu sonucuna varılmıştır. (Schuette ve Rose 1986). Schuette ve Rose (1986), DMH'ın kolon kanserini indüklediği yönündeki bulguları, bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Rat kalın bağırsak epitel hücre artışına farklı düzey kalın bağırsak asit içeriğinin etkisi incelenmiş başka bir çalışmada, safra asit içeriği 4 hafta süre ile deoxycholic veya lithocholic acid enjeksiyonu ile veya yemlerinin yağ ve lif içeriği artırılarak değiştirilmiştir. DMH, uygulama başlamadan 1 hafta önce ratların yarısına verilmiş, kalın bağırsak epitel hücre artışı $[3H]$ thymidine autoradiografi ile ölçülmüş ve sonuçta DMH uygulamasında dahil olmak üzere asit içeriğinin artışı ve buğday kepeği ile beslemenin kalın bağırsakta azda olsa hiperplaziyi teşvik ettiği görülmüştür. (Glauert ve Bennink 1983). Bu çalışmada DMH'ın kolon kanserinin oluşumunu artırdığı yönündeki bulguları, bizim çalışmamız ile uyum göstermektedir.

Başka bir çalışmada erkek Wistar sıçanları 6 gruba ayrılmıştır. Bunlardan negatif kontrol grubuna DMH verilmemiş, kontrol grubuna ise DMH (20mg/Kg v.a.) enjekte edilmiştir. Kalan 4 gruba ise DMH +F. assa- foetida ekstraktı kemopreventif ve kemoterapotik olarak (6.25 and 12.5 mg/Kg v.a.) verilmiş, ekstrakt etkilerinin ölçümü için hepatik oksidatif stres/antioksidan parametreleri, malondialdehit (MDA), glutasyon (GSH), ve plazmada demir indirgeme kapasitesi (FRAP) ile detoksifikasyon enzimlerinden glutasyon S transferaz (GST) ve Sitokrom P450 (CYP450) saptanmıştır. Ayrıca histopatolojik analizlerden sonra kalın bağırsak dokusunda kalın bağırsak β -katenin proteini de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre F. assa-foetida ekstraktları yükselmiş CYP450, FRAP ve β -katenin düzeylerini önemli derecede tersine çevirmiş ve ayrıca GST (aktivitesini ve proteini) ve GSH düzeylerinin indirgenmesini ayarlamıştır. Ekstrakt uygulanmış gruplarda, karaciğer dokusunun histolojik analizleri de yukarıdaki sonuçlarla uyumlu olarak anormal kript odakların oluşumunda azalma olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular ekstraktların, DMH ile indüklenmiş kalın bağırsak kanserlerinde kemopreventif ve kemoterapötik etkileri olduğunu, kalın bağırsaktaki DMH metabolizma süreçleri üzerindeki faydalı etkileri ile gösterilmiştir. (Fateme ve ark., 2015). Bu çalışmada DMH uygulaması ile kolon kanseri indüklenmiş ve deneysel modelimizdeki gibi kolon dokusunda erken evre kanser olarak nitelendirilen displaziler geliştiği gözlemlenmiştir.

5.2. Kolon Kanserinde İyileştirici Etki Gösteren Maddeler Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Probiyotiklerin ülser, gıda alerjileri, immun sistem yetersizlikleri ve kanser gibi sağlık sorunlarına yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Probiyotikler, fermente süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu konak canlıda sağlığa yararlı etkiler ortaya koyan canlı mikrobiyel gıda katkıları olarak bilinmektedir. Probiyotiklerin etkilerini ortaya koyabilmeleri için günlük 108- 109 hücrenin alınması, ürünü kullanırken 106-107 kob/ml probiyotik bakteri içermesi gerektiği vurgulanmaktadır (Vinderola ve ark., 2000; Kailasapathy ve Chin, 2000). Bu sonuçlar, çalışmamızda SC ve SLO'nun kanser oluşumunu azalttığı yönündeki bulgularımızla benzerlik göstermektedir.

Probiyotiklerden en çok *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri üzerinde durulmaktadır. Uygun miktarlarda tüketildiklerinde patolojik koşulların önlenmesi ve tedavi edilmesinde yararlı etkileri vardır. En önemli mekanizmalarından biri de antimikrobiyal madde üretmek suretiyle patojenlerin inhibisyonudur (Yıldırım, 2005). Bu çalışmada *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin patolojik koşulları önlemede ve dolayısıyla tedavide kullanılması ile elde edilen sonuçlar, deneysel modelimizdeki SC ve SLO'nun tedavi edici etkisi ile benzerlik göstermektedir.

Lactobacillus plantarum'un Tnf α 'nın bağırsak epitel hücreleri üzerine olumsuz etkilerini hafifletmesine yönelik yapılan bir çalışmada, uyarılmış TNT- α 'nın transepiteliyal elektrik direncinin *L. Plantarum* tarafından inhibe edildiği kaydedilmiştir (Ko ve ark., 2007).

L. plantarum'un farelerdeki fibrosarkomlara karşı antitümör ve antimetastaz aktivitesinin olduğuna ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine'e karşı *L. plantarum*'un %98.4 oranında etkili olduğu bildirilmiştir (Park ve Ho Rhee, 2001). Çalışmamızda da SC ve SLO'nun displaziler üzerine antitümör ve antimetastaz etkisinin olduğuna ilişkin bulgular *L. plantarum*'un etkileri ile benzerlik göstermektedir.

L. plantarum'un tümör immunoterapisindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, konjenital P388DI tümör hücreleri üzerine, interleukin-12' nin çalışmadığı ya da hasar gördüğü durumlarda, günlük dozlarda verilen L. plantarum L-137'nin antitümör etkisinin olduğu bildirilmiştir (Murosaki ve ark., 2000). L. Plantarum'un antitümör etkileriyle ilgili çalışma raporları bizim çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

L. rhamnosus'un yapılan genetik araştırmalarda bağırsaktaki birçok zararlı bakterinin gelişimini inhibe ettiği ispatlanmıştır. Yoğurtta ve diğer süt ürünlerinde doğal preservatif olarak kullanılan L. rhamnosus'un in vitro ve in vivo etkilerinin olduğu kaydedilmiştir. Atopik çocuklarda, L. rhamnosus'un interleukin-10'un oluşumunda etkisinin incelendiği çalışmada, serumdaki interleukin düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Pessi ve ark., 2000). Bu sonuçlar araştırmamızda kullandığımız SC ve SLO'nun bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri ile benzerlik göstermektedir.

Morin, incir ve moraceae ailesine ait diğer bitkilerde bulunan bir flavonoid olup ratlarda DMH'in neden olduğu 50 mg/kg vücut ağırlığı dozundaki biyokimyasal ve histolojik değişiklikleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Karthik ve ark., 2010). Morin'in, DMH'in neden olduğu histolojik değişiklikleri inhibe ettiğini gösteren bu çalışmanın, bizim çalışmamızdaki sonuçlarımızla uyumlu olduğu düşünülmektedir.

Esculetin, bitkilerde bulunan ve anti-inflamatuvar (Witaicenis ve ark., 2010), antioksidatif (Kaneko ve ark., 2003), antitümör aktiviteye sahip olan bir kumarin türevidir. Morin ve esculetin takviyesi β kateinin/ c-myc sinyalleme yoluyla etkili bir şekilde tümör metabolizmasını hedefler ve ratlarda kolon kanserini ortadan kaldırmak için glikoliz ve glutaminolizi etkiler. Sharada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, morin'in anti kanser etkisinin esculetin'den daha fazla olduğu belirlenmiştir. (Sharada ve ark., 2017). Yapılan bu çalışmadaki morin ve esculetinin kanser üzerindeki tedavi edici etkileri ve morin'in anti kanser etkisinin esculetin'den daha fazla olduğunun belirlenmesi sonucu; çalışmamızda SLO'nun SC'ye göre daha fazla tedavi edici olduğunun belirlenmesi ile benzer sonuçlar göstermiştir.

Blum ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, DMH vererek proliferasyon oluşturdıkları fare kolonuna, daha sonra morin ve / veya eskuletin vererek bu maddelerin antiproliferatif potansiyelleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda DMH verilen ratların kolonunda bulunan onkogenlerin, ratlar morin ve / veya eskuletin ile desteklendiğinde, bu fitokimyasal maddelerin antitümör etkisinin hücre proliferasyonunu inhibe ederek sağladığı görülmüştür (Blum ve ark., 2001). Blum ve arkadaşlarının morin ve / veya eskuletin ile ilgili çalışma raporları ve sonuçları bizim çalışma sonuçlarımızla uyum göstermektedir.

Normal hücrelerde myc aracılı büyüme faktörü uyarımı, biyokütle birikiminde doruğa ulaşan glikoz, glutamin ve diğer besin maddelerinin içeriğini arttıran genleri aktive eder. Bu myc tarafından yönetilen biyokütle birikimi ve çoğalması genellikle kontrol altında tutulur. Normal hücre proliferasyonunun aksine kanser hücreleri, glikoz veya glutamin gibi besin maddelerine bağımlı olan onkojen kaynaklı hücrelere neden olan, myc tarafından yönlendirilen düzensiz biyokütle birikimi sergilemektedir. Ayrıca glikolizi uyardığı ve geniş bir metabolik enzim çeşidinin ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir. Lin ve arkadaşlarının DMH vererek c-myc oranını artırdığı ratlarda yaptıkları bir çalışmada, bağırsak kanserinin metabolik yeniden programlamasında morin ve / veya eskuletinin önemli rolünü keşfetmişlerdir (Lin ve ark., 2012). Morin ve / veya eskuletin ile ilgili yapılan bu çalışma raporları da bizim çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

5.3. FA Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada E vitamini takviyesinin 4, 12 ve 18 aylık erkek Wistar albino farelerinden daha yaşlı olanlarda SOD değerini arttırdığı gözlemlenmiştir(Kurt, 2008). Başka bir çalışmada İstiridyeye mantarlarının (Pleurotus ostreatus) antioksidan aktivitelerini gözlemlemek üzere yaşlı ve genç farelerde MDA, CAT, SOD ve GPX değerleri incelenmiş. Sonuçta özellikle yaşlı farelerde P.ostreatus ekstraktı ile işlemin antioksidan durumu düzeltilebileceği elde edilen CAT, SOD ve GPx'in aktivitelerindeki artış ve MDA seviyesindeki düşme ile gösterilmiştir(Jayakumar, 2007). Çalışmadaki biyokimyasal inceleme ve elde edilen biyokimyasal değerler, sonuçlarımızla uyum göstermektedir.

Başka bir çalışmada toplam 16 adet Wistar – Albino cinsi erişkin erkek sıçan iki gruba ayrılmış ve incelenmiştir. Grup I'deki sıçanlar kontrol grubu olarak kullanılmış ve intragastrik gavaj yöntemi ile serum fizyolojik verilmiştir. Grup II'deki sıçanlara ise, 400 mg/kg dozundaki omega – 3 yağ asidi intragastrik gavaj yöntemi ile günlük olarak verilmiştir. Altı haftalık deney süresinden sonra sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile öldürülmüştür. Hayvanlardan alınan böbrek doku örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyi ve superoksit dizmutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH - Px) enzim aktiviteleri spektrofotometri yöntemi ile tayin edilmiş olup, omega – 3 yağ asiti verilen sıçanların böbrek SOD ve GSH – Px aktiviteleri istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artarken MDA düzeylerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş içinde olduğu tespit edilmiştir. Buna göre; Omega – 3 yağ asitlerinin sıçan böbrek dokusunda antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği, oksidatif hasarı önlediği ve böbrek dokusu üzerinde koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Omega – 3 yağ asidi verilen grubun böbrek SOD ve GSH Px enzim aktivite değerlerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış sergilediği belirlenmiş olup, oksidatif hasarı işaret etmesi bakımından önemli bir parametre olan MDA değerinin ise kontrol grubu ile kıyaslandığında omega – 3 yağ asidi verilen grupta tedavi edici olarak istatistiksel yönden anlamlı bir düşüş sergilediği tespit edilmiştir(Gülçen ve ark., 2012)

Antioksidan savunma sistemi, lipid peroksidasyon sürecinin başlamasında kritik rolü olan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde önemlidir. Omega – 3 yağ asitleri TNF-alfa ve IL-1 beta gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu azaltır. Daha önce yapılmış olan bir takım araştırmalarda FA toksisitesi sonucu akciğer, böbrek ve prefrontal korteks de oluşan oksidatif hasarın omega – 3 yağ asitleri tarafından engellendiği gösterilmiştir. (Gülçen ve ark., 2012). Bu çalışma da bizim çalışmamızı FA'in toksisite ve harabiyeti artırıcı özelliğininin ispatlanması açısından desteklemektedir.

Benzer başka bir çalışmada Demir-dekstran +vitamin E takviyesi ile çalışılan grubun kontrol grubuyla karşılaştırılmasında üç antioksidant SOD, GSH-Px, CAT enzimlerin aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre bağımsız demir ve E vitamini takviyesi ile, oluşan serbest radikallerden kaynaklı toksik oksidatif hasarın önlenebileceği ifade edilmiştir. (Kurt 2008). Bu sonuçlar araştırmamızda kullandığımız biyokimyasal değerler ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada FA uygulanan ratlarda SOD, XO ve MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. CAT değerlerinde ise, anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu grubun ışık mikroskopik incelemesinde, terminal bronşiolde kanama ve epiteliyal hücre dökülmelerinin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, pulmoner interstisyumda kanama alanlarının olduğu ve hemosiderin yüklü makrofajların yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir.(Zararsız ve ark., 2004a). Çalışma, FA'in terminal bronşiolde kanama ve genel akciğer hasarını indüklediği yönündeki bulguları, bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

İzole rat hepatositlerinde yapılan deneysel bir çalışmada FA'in düşük konsantrasyonlarının bile oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir. (Teng ve ark., 2001). FA'in harabiyeti artırıcı rolü bizim çalışmamızca da teyid edilmiştir.

Başka bir çalışmada ratlara solunum yoluyla FA uygulanarak karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin azaldığı ve SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. (Sarsılmaz ve ark., 2000).

Thrasher ve Kilburn fareleri çiftleştirmeden önce, çiftleştirme esnasında ve gebelik süresince FA'e maruz bıraktıklarında, embriyo ölümlerinin, fetusa ait anomalilerin arttığını, askorbik asit konsantrasyonunun azaldığını, özellikle doğumdan sonraki 4. ayda endoplazmik retikulum, lizozomlar ve mitokondrilerin enzimlerinde anormalliklere, demir eksikliğiyle artan metabolik asidoza sebep olduğunu belirtmişlerdir (Thrasher ve Kilburn 2001). Bu çalışma sonuçlarının bizim modelimizdeki sonuçlarımız ile uyum gösterdiği gözlenmiştir.

Gürel ve ark. (2005) FA'nın hipokampus ve frontal korteks üzerinde toksik etki yaparak, her iki beyin bölgesinde nöral dejenerasyon oluşumuna neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada FA uygulamasının sıçan hipokampusunda oluşturduğu oksidatif hasarın, ω -3 yağ asiti uygulaması ile önlendiği tespit edilmiştir (Zararsız ve ark., 2007). Bu sonuçların, bizim modelimizde elde ettiğimiz FA'in oksidatif hasarı tetiklediği yönündeki bulgularımızla aynı yönde olduğu gözlenmiştir.

Kuş ve ark. (2004), erkek sıçanlara 14 gün boyunca gün aşırı olarak i.p yolla uyguladıkları % 10'luk formaldehitin yanı sıra 25 mg/kg dozunda tedavi edici olarak melatonin uygulaması vermişler ve FA maruziyeti sonucu prefrontal kortekste oksidatif hasarın oluştuğunu ve bu hasarın melatonin uygulaması ile önlendiğini tespit etmişlerdir. FA'in etkileriyle ilgili çalışma raporları ve sonuçları bizim çalışma sonuçlarımızla paraleldir.

5.4. Akciğer Hasarlarında İyileştirici Etki Gösteren Maddeler Üzerine Yapılmış Çalışmalar

FA maruziyeti sonucu akciğer hasarına karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, FA maruziyeti ile birlikte melatonin verilen ratlarda FA'in neden olduğu histolojik değişikliklerin azaldığı tespit edilmiştir. SOD, XO ve MDA düzeylerinde de anlamlı bir azalma görülmüştür.(Zararsız ve ark., 2004a). FA'in akciğer hasarını tetiklediği ve melatoninin koruyuculuğunun desteklendiği çalışma raporları bizim çalışma sonuçlarımızla paraleldir.

Zararsız ve ark.(2004b), FA maruziyeti sonucu rat akciğer dokusunda oluşturulan hasarın iyileştirilmesi amaçlı omega-3 yağ asitlerinin koruyuculuğunu araştırmışlar, omega-3 yağ asidi uyguladıkları hayvanlarda bronşial kanama ve doku yapısının düzeldiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada akciğer hasarın iyileştirilmesi amaçlı kullanılan omega-3 yağ asitleri ile bizim çalışmamızda kullanılan SC ve SLO'nun koruyucu etkisi ile ilgili sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Akyürek ve ark. (2005), akciğer kanserli hastalarda alternatif tedavi kullanımı üzerine bir çalışma yapmış, hastaların %63 oranında alternatif tedaviyi kullandıklarını tesbit etmişlerdir. Bu hastalardan bitki kullananlar %59 (ısırganotu veya tohumu), multivitamin alanlar %23; SC kullananlar ise %11 oranında bulunmuştur. Çalışmadaki sonuçlar SC'in koruyucu etkisinin desteklenmesi açısından deneysel modelimizle uyumludur.

Erdosteine(mukolitikler grubundan bir etkin madde), on yılı aşkın bir süredir kronik akciğer hastalığında kullanılan bir ilaçtır. Yapısındaki sülfidril grupları sayesinde mukolitik, serbest radikal tutucu ve antioksidan etkileri vardır. Lipid peroksidasyonunu, nötrofil infiltrasyonunu ve hücre apoptozisini önler (Moretti ve Marchioni 2007).

Bir çalışmada bleomisin(kanser tedavisinde kullanılan antitümöral etkili bir ilaç) kaynaklı akciğer fibrozisinde, akciğerlerde glutasyon ve SOD seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Oral olarak alınan erdostein, bu etkileri ortadan kaldırarak nötrofil etkinliğini engellemiş ve serbest radikal tutucu etkisiyle lipid peroksidasyonunu azaltmıştır (Boyacı ve ark., 2006). Çalışmada erdostein, çalışmamızdaki SLO ve SC ile benzer tedavi edici etki göstermiştir.

Kaklıkkaya ve ark. (2010), yaptıkları bir çalışmada, deneysel iskemi-reperfüzyon (I/R) modelinde kullanılan etil pirüvat uygulamasının kan ve doku örneklerindeki MDA seviyeleri ve etkilerini belirlemiştir. Bunun için 32 adet Spraque Dawley cinsi dişi sıçanları, dört gruba ayırmışlardır. Gruplar sırasıyla grup 1; sham grubu, grup 2; etil pirüvat verilen sham grubu, grup 3; I/R grubu (kontrol grubu), grup 4; etil pirüvat verilen I/R grubu (çalışma grubu) olarak ayrılmıştır. İskemi-reperfüzyon gruplarında üç saat iskemi ve iki saat reperfüzyon uygulamışlardır. Deney başlangıcından beş saat sonra sıçanları sakrifiye ederek kan ve akciğer doku örnekleri almışlar, MDA seviyelerini ölçmüşlerdir. MDA seviyeleri ve akciğer dokusu MDA seviyeleri grup 4'te, grup 3'e göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Sonuç olarak; etil pirüvatın, iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan akciğer hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu tesbit edilmiştir. Bu çalışmadaki biyokimyasal parametreler, çalışmamızdaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Solunum yoluyla alınan kömür tozu, özellikle maden işçilerinde akciğer hastalıklarına sebep olur. MDA, NO, XO seviyeleri yükselir, akciğer doku ve eritrositlerinde IL-6 ve TNF- α oluşur. Erdostein'in antioksidan enzim seviyelerini arttırarak ve miyeloperoksidaz aktivitesini azaltarak akciğer dokusundaki hasarı önlediği ifade edilmiştir. (Armutcu ve ark., 2007).

Bir çalışmada, β -karoten ve E vitaminin sigara içenlerde akciğer kanserini önlediği, düşük çıkan DNA(8-OHdG) ve protein(karbonil) oksidasyon parametreleri ile gösterilmiştir(Lee ve Park., 2003). Bu koruyucu etkinin çalışmamızdaki SLO ve SC ile antioksidan olarak benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

β -karotenin antioksidan ya da prooksidan etkisi, akciğerlerdeki oksijen basıncına ve β -karoten konsantrasyonuna bağlıdır. Yapılan başka bir çalışmada, yüksek oksijen basıncında antioksidan etkinin düştüğü, düşük basınçlarda güçlü bir oksijen tutucusu olduğu gözlenmiştir (Zhang ve Omeye 2001)

5.5. SC'nın İyileştirici Etkisi Üzerine Yapılmış Çalışmalar

SC tümör içerisinde yeni damar oluşumunu engellemektedir. Böylece beslenemeyen tümör küçülmekte ve zamanla yok olmaktadır. Bu sebeple köpek balığı kıkırdak yapılı olması nedeni ile tümör oluşumuna karşı engelleyici olarak kullanılabilen ideal bir alternatif tıp kaynağı olarak görülmektedir.

Bir çalışmada yavru bir tavşandan alınan kıkırdak, deney hayvanlarındaki tümörün yanına yerleştirildiğinde tümörün gelişiminin tamamen engellendiği tespit edilmiştir. (Ribatti ve Folkman 2008). Bu çalışma kıkırdağın anti-anjiogenez özelliğinin çalışmamızla da desteklenmesi nedeniyle uyumludur.

Tümör gelişiminde angiogenesis önemli bir faktör olup, kanseri tedavi etmede bu mekanizmanın engellenmesi bir çare olarak düşünülmektedir. Kıkırdak güçlü antiangiogenik aktiviteye sahip doğal bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. SC ekstraktı insan ve hayvanlarda antiangiogenik ve antitümör aktivitesi göstermektedir. SC'nın oral yolla alınımıyla angiogenesis'in azaldığı ifade edilmiştir. SC'ndan izole edilen antiangiogenik faktörler arasında U-995 ve neovastat (AE-941) gelmekte olup bunlar aynı zamanda antitümör etkisi de göstermektedirler. Ayrıca angiogenik doku inhibitörü metalloprotease 3 (TIMP-3) ve tümör baskılayıcı protein (snm23) genleri köpek balığı kıkırdağından tanımlanmış ve klonlanmıştır (Cho ve Kim 2002). Deneysel modelimizle aynı şekilde oralla yolla alınan SC, çalışmamızla uyumlu bir şekilde bu çalışmada da benzer tedavi edici etkilerde bulunmuştur.

Lee A, Langer (1983) köpek balığı kıkırdağının tümör angiogenesis üzerine inhibitör etkisini araştırmışlardır. Kıkırdakta damar oluşumu olmadığından tümör gelişimini engellediğini ve o nedenle neoplasmin köpek balıklarında çok nadir görüldüğünü ifade etmişlerdir.

Başka bir angiogenesis inhibitörü olan U-995, mavi köpek balığının (*Prionace glauca*) kıkırdağından Sheu JR ve ark. tarafından izole edilmiş olup, U-995'in tümör hücre büyümesine ve metazaza olan etkileri tanımlanmıştır (Sheu ve ark., 1998). Çalışmadaki genetik bulgular, çalışmamızdaki SC koruyucu etkisinin desteklenmesi açısından benzerdir.

Angiogenesis'in tümör gelişiminde önemli bir faktör olduğu anlaşıldıktan sonra yeni damar oluşumunu engelleyici alternatif tedavi veya ilaçların bulunması dikkat çeken bir konu haline almıştır. Ayrıca antiangiogenic ilaçların başka benzer patolojik rahatsızlıkların tedavisinde de etkili olduğu ifade edilmiştir. Bu noktada damarsız yapı nedeni ile kıkırdak doğal bir antiangiogenic bileşik olarak karşımıza çıkmakta. Sığır ve köpek balığı kıkırdağında antiangiogenic ve antitümör bileşenin varlığını in vivo ve in vitro çok sayıda çalışma işaret etmektedir. Bununla beraber köpek balığı kıkırdağının kanser ve diğer angiogenesis bağlantılı hastalıkların tedavisinde tam olarak etkinliği kabul edilmemiştir. Zira (i) kanser tedavisinde köpek balığı kıkırdağının kullanıldığı çalışmalarda klinik aşamada yetersiz hasta kayıtlarının bulunması, (ii) oral yolla kullanılan köpek balığı kıkırdağının farmakolojik etkisi ile biyolojik uygunluğunu gösteren bilginin yetersizliği sebepleri ile kuşku taşımaktadır. Ancak buna yönelik çalışma yetersiz olmakla beraber kıkırdak kökenli bileşiklerin intestinal emilimi olduğu köpek balığı kıkırdağı içerisindeki bu bileşiklerin farmakolojik olarak aktivite içerdiği ve oral yoldan verilebileceğini belirten birçok çalışma tarafından desteklenmiştir. (González ve ark., 2001). Benzer şekilde deneysel modelimizde SC oral olarak kullanılmış, antiangiogenic ve antitümör etkisi gözlemlenmiştir.

Başka bir çalışmada SC'nın bağışıklık sistemi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun için önce köpek balığı kıkırdağı protein parçaları izole edilerek elde edilmiş. Bu parçaların 14 ve 15 kDa ağırlığında 2 proteinden oluştuğu ifade edilmiş. Bu parçaların fareler üzerinde öldürücü hücrelerin sitotoksik etkisini azalttığı belirtilmiş. Ayrıca bu parçaların tümör içeren farelere intraperitonel olarak enjekte edilmesiyle tümöre T hücrelerinin filtrasyonunu artırmış ve tümörlü bölgenin küçüldüğü gözlenmiştir. Kıkırdağını tümörün büyümesi üzerine etkisini incelemek için 15 fare 2 gruba ayrılarak deri altına meme tümörü aşılanmıştır. 1. Grup 5 gün süre ile 0.1 ml (100 mg/kg/day protein) köpek balığı kıkırdağı deri altına verilirken, kontrol olan 2. Grup ise sadece tuzla muamele edilmiştir. Kıkırdak enjekte edilen 1. Grupta önemli düzeyde tümörün büyümesinin yavaşladığı ve kontrol grubunda ise tümörde hiçbir değişikliğin olmadığı belirtilmiştir. Köpek balığı kıkırdağındaki bu antiangiogenik etkinin matrix metalloproteinazları (MMPs) engelleyici etkisi ve damarsı endothelial büyüme faktörünün (VEGF) endothelial hücrelere bağlanmasını engelleyerek yaptığı düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre kıkırdak ve içeriğindeki etkili bileşenler kanser tedavisinde kullanılmaya aday malzemeler olarak görülmektedir. (Hassan ve ark., 2005). SC'nın bağışıklık sistemi üzerine etkisinin desteklendiği bu çalışma sonuçları, çalışmamızla benzer sonuçlar göstermiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, multipl miyelomda kemik iliği anjiyogenezinin arttığını göstermiştir; bu durum bir antiangiogenik ajan ile tedavinin faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Neovastat(köpek balığı kıkırdağı extratı), gelişmekte olan yeni antianjiyojenik ilaçlar arasında, doğal olarak oluşan birçok fonksiyonlu antianjiyojenik ajan olarak sınıflandırılabilir(AE-941; Aeterna Laboratories, Quebec City, Canada). Yapılan bu çalışmada gözlemlenmiş olan antianjiyojenik etki, benzer şekilde çalışmamızla da uyumludur.

Tavuk embriyo vaskularizasyon (EVT) deneyinde ve endotel hücre çoğalmasında kan damarlarının oluşumu üzerinde belirgin bir inhibisyon etkisi vardır. Dahası, in vivo deneyler, Neovastat'ın oral uygulamasının bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) içeren Matrigel implantlarında, kan damarlarının oluşumunu bloke ettiğini göstermektedir. Neovastat'ın antianjiyojenik aktivitesinin iki etki mekanizması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Neovastat, matriks metaloproteinaz aktivitelerinin engellenmesine ilaveten, vasküler endotelial büyüme faktörünün(VEGF) endotel hücrelerine bağlanmasını, VEGF'ye bağlı tirozin fosforilasyonunu ve VEGF ile uyarılan vasküler geçirgenliği farelerde inhibe etmektedir. Böylece Neovastat'ın önemli bir antitümör aktivitesi olduğu tesbit edilmiştir. Subkutan aşılanmış göğüs kanseri hücrelerine sahip farelerde Neovastat'ın ağızdan uygulanması tümör hacminde belirgin bir azalma göstermiştir. Neovastat ayrıca Lewis akciğer karsinom modelinde akciğer metastazlarının sayısını da azaltmıştır. Sıçanlarda ve maymunlarda yapılan toksikoloji çalışmaları, 1 yıllık kronik maruziyet sonrasında doz sınırlayıcı toksisite veya hedef organ hasarını göstermediğinden, Neovastat'ın insanlarda güvenle uygulanabileceğini düşündürmektedir. Ağızdan uygulanan Neovastat'ın dozaj, emniyet ve erken etkinliğini belirlemek için dört klinik çalışma yapılmıştır. Onkoloji çalışma alanında 482 hastaya oral olarak Neovastat uygulanmış, bunlardan solid tümörlü 146 hastaya 6 aydan fazla süreyle ilaç verilmiştir. İki aşamalı üç klinik çalışma yapılmıştır. Birinci aşama; non-small cell akciğer kanseri evresi IIIA ve IIIB olan hastalarda, kemoterapi / radyoterapi kombine tedavi yönteminin yanı sıra Neovastat'ın etkinliğini de değerlendirmek için plasebo kontrollü çalışma yapılmıştır. İkinci aşama; non-small cell akciğer kanseri evresi III olan hastalardan rastgele seçilmiş, plasebo kontrollü bir çalışma olup, birinci basamak immünoterapiyi takiben, ilerlemiş metastatik renal hücreli karsinoma hastalarında, Neovastat'ın monoterapi olarak etkinliğini değerlendirmek için yapılmıştır. Neovastat'ın etkinliği, multipl miyelomalı hastalarda, evre II çalışmasında da değerlendirilmiştir. (Falardeau ve ark., 2001). Bir SC extratı olan neovastat'ın antitümör etkisinin tesbit edildiği ve tümör hacminde belirgin bir azalma gözlemlendiği bu çalışmaya ait patoloji raporları, çalışmamızda elde edilen benzer sonuçlarla da desteklenmektedir.

Başka bir çalışmada SC'den elde edilen AE-941 ekstraktının antiangiogenik çok fazla molekül içerdiğinden III. seviye klinik araştırmalarda Avrupa ve Kuzey Amerikada böbrek hücresi karsinomu ve metastatik akciğer kanserinin tedavisinde denendiği ifade edilmiş, biyolojik açıdan aktif olan antianjiyojenik bir ürün olarak kullanılabilceği sonucuna ulaşılmıştır. (Gingras ve ark., 2000). SC'nın karsinomlarda tedavi edici etkisini belirleyen bu çalışma verilerinin, bizim çalışmamızla da uyumlu olduğu görülmüştür.

5.6. SLO'nun İyileştirici Etkisi Üzerine Yapılmış Çalışmalar

SLO'dan türetilen alkoksigliiserol Danimarka'da pazarlanmaktadır ve son dönemde yapılan çalışmalarda kanser tedavisinde yardımcı bir ajan olarak bahsedilmektedir. Odense Hastanesi Onkoloji ve Hematoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen bir anket araştırması, aktif neoplastik tedavide hastaların yaklaşık 1 / 3'ünde SLO preparatları kullanıldığını göstermiştir. Alkoksigliiserolün klinik araştırmaları rahim ve serviks kanseri olan hastalar üzerinde de yürütülmüştür ve deneklerin sadece az bir kesiminde tümör büyümesi kısıtlanabilmiştir. Alkoksigliiserol ile tedavi sonucunda inhibe tümör büyümesi veya düşük mortalite için herhangi bir belge bulunamamıştır. Alkoksigliiserol ile tedavi edilen gruplarda ışınlama hasarı vakalarının sayısı daha az bulunmuştur. Alkoksigliiserol, lökosit ve trombosit sayılarında artışa neden olurken, daha yüksek veya daha düşük dozlarda, görünüşe göre ters etki göstermektedir. Alkoksigliiserolün klinik etkisi ile ilgili mevcut literatür sayısı sınırlıdır ve sistematik değildir(Hasle ve ark., 1991).

Yapılan bir çalışmada SLO 'nun alkilgliserollerin doğal bir kaynağı olduğu ve yan etkisi olmaksızın günde 3 kez 100 mg dozlarında kullanılabilceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada alkilgliserollerin bağışıklık sistemini takviye edici olarak alternatif tedavide kullanılabilceği ifade edilmiştir. (Pugliese ve ark., 1998). SLO 'nun antioksidan olarak kullanılabilceğinin belirlendiği bu çalışma ile deneysel modelimiz, aynı sonuca ulaşmıştır.

Köpek balığı yağı alkilgliserol ve squalene açısından oldukça zengin olup, düşük miktarda n-3 çoklu doymamış yağ asidi içermektedir. Alkilgliseroller bağışıklık sistemini platelet aktive edici faktör (PAF) ve diacylglycerol (DAG) üretimi üzerinden kontrol etmekte olduğu belirtilmiştir. SLO alkilgliserol ve squalene kaynağı olup, antijen oluşumunu ve yangısal cevabın ortaya çıkışını artırmaktadır. Ayrıca alkilgliserol ve squalene neoplastik hücrelerde apoptozisi teşvik ederek; sinyal iletimini baskılayarak; angiogenesisi engelleyerek ve sitotoksik ajanların taşınımını teşvik etmesi gibi farklı yollardan antitümör etkisine sahiptir. Köpek balığı yağının bağışıklık sistemiyle ilgili ve özellikle farklı tip kanserlerin tedavisinde yararlı olduğu ifade edilmiştir (Lewkowicz ve ark., 2006). Bu çalışmada bir SLO extratı olarak kullanılan alkilgliserol ve squalene, çalışmamızla uyumlu sonuçlar göstermiştir.

Başka bir çalışmada ise memeli karsinomlarında n3 çoklu doymamış yağ asitlerinin anti-carsinogenic etkisi olduğu ifade edilmiştir. n3 yağ asitleri yüksek düzeylerde deniz balıklarının yağlarında ve özellikle de köpek balığı yağında bulunmaktadır. Köpek balıklarında nadir olarak kanser görünmesinde n3 yağ asitleri ve köpek balığı yağında bulunan diğer bileşiklerin anti-carsinogenic etki yaptığı ve bu sebeple nadiren kanser görüldüğü belirtilmiştir. (Davidson ve ark., 2007). Bu çalışmada da yine bir SLO extratı olarak kullanılan n3 çoklu doymamış yağ asitlerinin gösterdiği anti-carsinogenic etki, çalışmamızla benzer sonuçlar göstermiştir.

SLO, düşük düzeydede çoklu doymamış yağ asidi (EFA) içermekte olup, özellikle bakteri ve mantar kaynaklı enfeksiyonlara ve kansere karşı bağışıklığı artırıcı rol oynadığı ifade edilmiştir (Nowicki ve Barańska 2007).

Yapılan bir çalışmada; doğal alkil-Gro karışımının, yani 12: 0,14: 0,16: 0,18: 0,16: 1 n-7 ve 18: 1 n-9 alkil-Gro'nun altı ana bileşeni sentezlendikten sonra anti-tümör ve anti-metastatik etkinlikler farelerde (3LL hücreler) aktarılan tümör modelinde kullanılmıştır. Sonuç olarak; 16: 1 ve 18: 1 alkil-Gro akciğer metastaz sayısının azaltılmasında belirgin bir etki gösterirken, diğer alkil-Gro daha zayıf bir etki göstermiştir (Deniau ve ark., 2010). Bu çalışmada kullanılan alkil-Gro karışımının çalışmamızdaki SLO ile aynı antioksidan özelliği göstererek bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve dolayısıyla metastaz sayısının azaltılmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

SLO'nun deri içine tümör hücresi aşılınmış fareler üzerine angiogenesisteki etkisi bir çalışmayla araştırılmıştır. SLO'da bulunan ve Ecomer denilen bileşenin sarcoma L-1 tipi tümör içeren farede yeni damar oluşumunu baskıladı ve kan gronüosit sayısını artırdığı belirtilmiştir (Skopinska ve ark., 1999). Ecomer denilen bileşenin bu çalışmada, çalışmamızdaki SLO ile paralel etki göstererek bağışıklık sistemini güçlendirdiğini kan gronüosit sayısını artırmasından anlayabilmekteyiz.

Eş merkezli L-1 sarkomunun transplantasyonundan sonra Balb/c türü farelerde, bu maddelerin anti-anjiyojenik ve anti-tümör etkilerinin belirlenmesine dayanan bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada tüm test edilen maddelerin, tümör hücreleri tarafından indüklenen anjiyogenezi ve tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Skopinska ve ark., 2003).

SLO, in vivo olarak anti-tümör ve anti-metastaz aktiviteleri de dahil olmak üzere çok fonksiyonlu bir role sahip olan alkilgliserol içeriğiyle çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilir. Köpekbalığı karaciğeri, özellikle kanser önleyici bir ajan olarak, terapötik ve koruyucu ajanlar olarak 50 yıldan beri kullanılmaktadır. Tümörlü farelerde SLO enjeksiyonunun, tümöre T hücre infiltrasyonuna neden olduğu ve tümör hacmini düşürdüğü dikkate alındığında; kanser tedavisinde herhangi bir yan etki olmadan başarıyla kullanılacağı düşünülmektedir (Hajimoradi ve ark., 2009).

5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Apelin, G protein kenetli orfan apelin reseptörünün (APJ) endojen ligantıdır. Apelinin hipotalamusta özellikle arkuat, supraoptik ve paraventrikuler nukleus gibi hipotalamik alanlarda dağılım göstermesi testis, prostat ve meme dokusunda APJ'nin bulunması, üreme sistemi üzerinde apelinin önemli fizyolojik etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir. Yapılan bir çalışmada ilk olarak, östrojen duyarlı insan meme kanseri hücre hattına (MCF-7), apelin-13'un 0.1, 1 ve 10 nM'lık konsantrasyonları, östrojen hormonunun 1, 10, 100 nM'lık konsantrasyonları uygulanmıştır. Daha sonra apelinin, 1 ve 10 nM olan dozları ile östrojen hormonunun 1, 10, 100 nM'lık dozları eş zamanlı olarak kültüre uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu maddelerin MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkileri, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ile belirlenmiştir. Sonuçlar, % hücre canlılık değeri olarak belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattına uygulanan apelin-13'ün hücre canlılığını azalttığı ($p < 0.05$), östrojenin ise hücre canlılığını arttırdığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Apelin-13'un, MCF-7 hücre serilerinde canlılığı azaltması (östrojen induklemeli gruplarda dahil) poliferatif etkinin östrojen reseptör kaynaklı olduğunu ve apelin-13'un anti-kanserojenik bir ajan olarak kullanılabilmesini akla getirmektedir. Bu çalışmada anti-kanser olarak hücre kültüründe kullanılan apelin-13, çalışmamızda kullanılan SC ve SLO'nun iyileştirici etkileri ile benzerlik göstermektedir. (Koyunoğlu ve ark., 2013)

Yapılan bir çalışma, yağ doku ile meme kanseri arasındaki bağlantıya dikkati çekmekte ve yağ dokunun bir başka hormonu olan apelinin, meme kanserindeki olası rolleri üzerinde durmaktadır. Apelin hormonu ile kanser arasındaki ilişkiyi gösteren fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Berta ve ark., insan akciğer kanser hücresi (NSCLC) üzerinde apelin uygulamasının etkilerini, hem *in vitro* hemde *in vivo* olarak araştırmışlardır. Sonuç olarak *in vitro* apelin uygulamasının hücre canlılığını etkilemediğini, *in vivo* çalışmada ise apelinin anjiyogenezi uyararak tümör hücresinin gelişimini arttırdığını göstermişlerdir. Yapılan hücre kültürü çalışmasında, çalışmamızla benzeri yöntemler kullanılmıştır. (Berta ve ark., 2010).

Ceyhan ve ark., genç yetişkin sıçan kemik iliği stromal hücrelerinin kültüre edilebilirliği ve kültür hücrelerinin genel histomorfolojik ve osteoblastik formasyon yönünden değerlendirilmesi amaçlı bir çalışma yapmışlardır. Sonuçta sıçan kemik iliği stromal hücrelerinin kültürde üreme yüzdesi % 93.8 olarak bulunmuştur. Kültür flasklarında, zamanla birbirine yapışarak çoğalan farklı morfolojide stromal hücreler ve aralarında pikrotionin ile boyanan çok nükleoluslu büyük çekirdekli osteoblastlara benzeyen hücreler gözlemlenmişlerdir. Bu çalışmada kültür edilen kemik iliği hücreleri, çalışmamızda kültür ederek çoğaltılan kolon kanseri hücreleri ile benzer yöntemle elde edilmiştir. (Ceyhan ve ark., 2006).

Başka bir çalışmada ise tavşan modelinde in vitro fonksiyonel özofagus segmenti hazırlamaya yönelik olarak, fetus ve erişkin distal özofagus düz kas hücrelerinin morfolojik özellikleri ve büyüme kinetiklerinin hesaplanarak karşılaştırılması sağlanmıştır. Erişkin ve fetus Yeni Zelanda tipi tavşanların özofaguslarının distal kısmındaki dokuların kas tabakası kültüre edilmiş ve üreyen hücreler anti-aktin ve anti-miyozin antikorları ile immünohistokimyasal boyama yapılarak tiplendirilmiştir. Çalışma sonucunda, farklı dokulardan elde edilen düz kas hücrelerinin kültür ortamında benzer üreme özellikleri gösterdikleri görülmüştür. (Korkmaz ve ark., 2004).

Urginea maritima (Um), Akdeniz bölgesine özgü bir bitkidir. Yapılan bir çalışmada, Um ekstresinin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olup olmadığını araştırılmıştır. Çeşitli Um ekstreleri hazırlanmış, bu ekstreler A549 Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu (KHDAK) hücre kültürüne tek başına veya Gemsitabin ve/veya Sisplatin ile birlikte uygulanmıştır. Sonuçta, Um soğanı ekstresinin, Sisplatin, Gemsitabin ve Um yaprak ekstresinden daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, Um ekstresinin solid tümörlerin tedavisi için geliştirilebilecek bir ilaç adayı olabileceği literatürde ilk kez kayıtlara geçmiştir. Bu çalışmada kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki yapması gözlemlenen Um ekstresi ile çalışmamızda kullandığımız SC ve SLO'nun etkileri, benzer iyileştirici etkiler göstermiştir (Bozcuk ve ark., 2011).

Kekik bitkisinde bulunan karvakrol, fenolik bir monoterpen olup gıdalarda baharat olarak kullanılmaktadır. Karvakrol'un H-ras transform edilmiş 5RP7 ve N-ras transform edilmiş CO25 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin incelenmesi ve karvakrol'un kemoterapötik ajan olabilme olasılığının değerlendirilmesi amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada ulaşılan sonuçlar, karvakrol'un her iki hücre üzerinde de zamana ve doza bağımlı sitotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir. IC50 değeri 5RP7 hücreleri için 0.04 mg/mL ve CO25 hücreleri için ise 0.1 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu değerler doğrultusunda, karvakrol her iki hücre tipinde morfolojik değişime neden olduğu halde akım sitometrisi kullanılarak tespit edilen fosfotidilserin hareketliliği yalnızca 5RP7 hücrelerinde gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, geç apoptoz mekanizmasının göstergesi olan DNA'nın merdiven görünümü, IC50 değerinde ya da altındaki bir değerde H-ras onkogenine sahip hücrelerde gözlenirken, N-ras onkogenine sahip hücrelerde gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, H-ras hücrelerinin N-ras hücrelerine oranla karvakrol'e daha hassas olduğunu göstermiştir. Karvakrol'un kemoterapötik ajan olabilme olasılığının değerlendirildiği bu çalışmada, çalışmamızda olası kemoterapötik ajan olarak kullanılan SC ve SLO ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. (Akalın ve İncesu 2011).

6. SONUÇ

6.1. BİYOKİMYA SONUÇLARI:

Biyokimyasal değerlerin analizinde Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Buna göre sadece DMH, DMH + SC ve DMH + SLO iyileştirmeleri arasında istatistiksel olarak bir tek CA19-9 değerinde fark gözlenmiştir ($p<0,05$). CA19-9 tümör markeri açısından, DMH verilen ratlarda diğer markerlara göre daha fazla yükselme olduğu gözlenmiş, DMH+ SC ve DMH+SLO verilen ratlarda CA19-9 değerlerinin düştüğü görülmüştür. Bu düşüş SC'de SLO'ya göre daha fazla olduğu tesbit edildiğinden dolayı, tedavi etme başarısı olarak SC'nin SLO'ya göre daha başarılı olduğu söylenebilir.

FA'in akciğer üzerine olan toksik etkileri karşılaştırıldığında ise FA, FA + SC ve FA + SLO değerlerine bakıldığında CAT(Katalaz), GPX(glutasyon peroksidaz) ve SOD(süperoksit dismutaz) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir($p<0,05$). Sadece MDA(malondialdehit) değerinde fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Antioksidan etkiler açısından 3 enzim(CAT, SOD ve GPx) değerleri FA uygulamasında kontrole kıyasla artmakta ve tedavi edici olarak hem SC hemde SLO verilmesi bu 3 enzimde yine kontrole kıyasla azalma olduğunu göstermektedir. Kendi içerisinde karşılaştırma yaparsak SC 'ye kıyasla özellikle SLO verilmesi bu 3 enziminde düzeyinde kontrol grubuna göre çok belirgin düşmeye neden olmuş olup FA uygulamasının toksik etkisi ile bu 3 enzimin daha fazla antioksidan etki ortaya koymalarına bağlı olarak düzeyleri yükselmiş, sonrasında SC ve SLO verilerek tedavi imkanı yaratıldığında ise değerlerde belirgin düşme gözlenmiş olup SC ve SLO'nun tedavideki etkin başarısına bağlı olarak bu 3 antioksidan savunma mekanizmasının enzimine duyulan ihtiyacın azaldığı şeklinde bir sonuç ile karşılaşmaktayız.

Biyokimyasal parametrelerden MDA değerlerine baktığımızda ise, FA verilen ratlarda lipit peroksidasyonuna bağlı olarak fazla miktarda arttığını, SC ve SLO verilmesi sonucu başlayan hasar tamiri ile bu değerlerin düştüğünü, yine de kontrol grubu ile kıyaslandığında bu değerlerin kontrol grubunun biraz üzerinde kaldığını görmekteyiz. Buradan yola çıkarak SC ve SLO hasarın tamiri açısından belli derecelerde iyileşme sağladığını söyleyebiliriz. MDA değerlerini düşürmede ise SC ve SLO yaklaşık aynı düzeyde başarı göstermiştir.

Tedavi bazında ele alındığında; DMH içeren grupların ve kontrol grubu biyokimyasal sonuçları karşılaştırıldığında CA19-9 ve AFP değeri arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir($p<0,05$). Buna rağmen CEA ve CA125 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). CA19-9 tümör markeri açısından, DMH verilen ratlarda diğer markerlara göre daha fazla yükselme olduğu gözlenmiş, DMH+ SC ve DMH+SLO verilen ratlarda CA19-9 değerlerinin düştüğü görülmüştür. Bu düşüş SC'de SLO'ya göre daha fazla olduğu tesbit edildiğinden dolayı, tedavi etme başarısı olarak SC'nin SLO'ya göre daha başarılı olduğu söylenebilir.

Tedavi bazlı incelemede; FA içeren deneklerin ve kontrol grubunun biyokimyasal MDA(malondialdehit) ve GPX(glutatyon peroksidaz) değerleri arasında ise istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Fakat SOD(süperoksit dismutaz) ve CAT(Katalaz) değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrole kıyasla SOD ve CAT antioksidan savunma sistemi enzimlerinin değerlerinde önemli düzeyde bir düşme meydana gelmiş olup; kullanılan toksik etkili FA uygulamasında bu enzimlerin yükselerek savunmayı başlattığı; tedavi edici olarak verilen kıkırdak ve SLO uygulamaları ile SOD ve CAT antioksidan enzimlerinin düzeyinde belirgin bir düşme görülmesi ile bunun tedavide kullanılan maddelerin başarısına bağlı olarak savunma mekanizmalarına ihtiyacın azalması ile pasifize olduğu şeklinde düşünölmektedir.

6.2. GENETİK SONUÇLAR:

DMH uygulaması kontrole kıyasla CHOP ve EDEM1 genlerinin aktivitesini olumsuz etkilemiştir. DMH nin olumsuz etkisine karşı verilen SC uygulaması özellikle CHOP gen aktivitesini bariz artırarak iyileştirici etki göstermiştir. ATF4 ve ATF6 gen aktivitelerinin düşmüş olması da bu etkiyi desteklemektedir. SLO verilmesi ise CHOP ve EDEM1 genlerinin aktivitesinin artırarak, ATF4 gen aktivitesini azaltarak iyileştirici etki göstermiştir. Tedavi edicilik açısından kıyaslama yapıldığında ise SC'nin etkisi SLO'ya oranla daha başarılı bulunmuştur.

FA uygulaması CHOP ve EDEM1 genlerinin tümör baskılayıcı özelliklerini azaltarak akciğer hasarı oluşumunda etkin rol oynadığını göstermiştir. SC'nin koruyucu etkisi ise ATF4, ATF6 ve GRP78 gen ekspresyonlarının azalmasından anlaşılmaktadır. SLO'nun FA üzerine koruyucu etkisi de aynı şekilde ATF4, ATF6 ve GRP78 gen ekspresyonlarının azalması ile kendini göstermektedir. Tedavi edicilik açısından FA uygulamasına karşın özellikle SLO 'nun daha başarılı olarak akciğer hasarını iyileştirici etki yaptığı anlaşılmaktadır.

6.3. PATOLOJİ SONUÇLARI:

Çalışmamızdaki patolojik incelemeler sonucunda, sadece DMH verilerek kolon kanseri oluşturulmaya çalışılan grupta şiddetli lenfoid hiperplaziler gelişmiştir.

DMH verildikten sonra SC verilerek tedavi edilmeye çalışılan grupta şiddetli lenfoid hiperplaziler lenfoid hiperplaziye gerilemiş, DMH verildikten sonra SLO verilerek tedavi edilmeye çalışılan grupta da şiddetli lenfoid hiperplazilerin lenfoid hiperplaziye gerilediği görülmüştür.

Sadece FA verilerek akciğer hasarı oluşturulmaya çalışılan grupta çalışma sonunda şiddetli amfizem gelişmiştir. FA verildikten sonra SC verilerek tedavi edilmeye çalışılan grupta şiddetli amfizem olan alanlar hafif şiddetli amfizemli alanlara gerilemiştir. FA verildikten sonra SLO verilerek tedavi edilmeye çalışılan grupta ise şiddetli amfizem olan alanlar orta şiddetli amfizemli alanlara gerilediği görülmüştür.

6.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

Caco-2 kanser hücre hattı ve SC kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmasında; IC50 etkin doz değeri 6.saatte 120 mg/l olarak bulunmuştur. Bu değer SC'nin 6. saatte ve 120mg doz verildiğinde en etkin şekilde kanser hücrelerinin ölümüne neden olabildiği anlamına gelmektedir.

Caco-2 kanser hücre hattı ve SLO kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmasında; IC50 etkin doz değeri 24.saatte 200 mg/l olarak bulunmuştur. Bu değer SLO'nun 24. saatte ve 200mg doz verildiğinde en etkin şekilde kanser hücrelerinin ölümüne neden olabildiği anlamına gelmektedir.

DMH'in biyokimyasal, genetik, patolojik ve hücre kültürü açısından rat kolonu üzerine olumsuz etkileri gözlemlenebilmiş; FA'in akciğer üzerine olumsuz etkileri biyokimyasal, genetik ve patolojik açıdan değerlendirilebilmiştir. Tedavide kullanılan SLO ve SC, akciğer hasarı ve kolon kanserini tedavisine yönelik olarak elde ettiğimiz bulgular hasar ve tümör hücrelerinin gerilemesine yol açarak iyileşme kaydettiği şeklinde değerlendirilmektedir. Bulgularımız hücre kültürü çalışma sonuçları ile de desteklenmektedir. Rakamsal sonuçlara bakıldığında tedavi açısından, SC'nin DMH'nin etkisini düzeltmede, SLO'nun ise FA'nın etkisini düzeltmede daha başarılı ve etkili olduğu söylenebilir. Deneysel modelimizin bu yönüyle istenilen amacı ve başarıyı sağladığı söylenebilir. Diğer yandan, kolon kanseri ve akciğer hasarının biyokimyasal, genetik, patolojik, hücre kültürü düzeyinde aydınlatılması tedavi seçeneklerinin ve/veya ortaya çıkmadan önlenebilir yolların aydınlatılması için daha geniş katılımlı ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

ÖZET

Formaldehit Maruziyeti Sonucu Rat Akciğerinde Oluşan Oksidatif Hasara Karşı ve Deneysel Olarak Oluşturulan Kolon Kanseri Üzerine Köpek Balığı Kıkırdağı ve Köpek Balığı Karaciğer Yağının Koruyucu Etkisinin Belirlenmesi.

Amaç: Bu çalışma ile, FA'in akciğer üzerine olan toksik etkileri ile DMH'in kalın bağırsak üzerine kanser yapıcı etkisi; bu toksik ve kanser yapıcı etkilere karşı SC ve SLO'nun koruyucu etkisini araştırmak.

Yöntem: Temin edilen 80 rat şu şekilde gruplandırıldı.

40 adet DMH grubu:4 adet: Kontrol grubu,6 adet: DMH verilen fakat tedavi edilmeyen grup,15 adet: DMH verilen ve SC ile tedavi edilen grup,15 adet: DMH verilen ve SLO ile tedavi edilen grup.

40 adet Formaldehit grubu:4 adet: Kontrol grubu,6 adet: FA verilen fakat tedavi edilmeyen grup,15 adet: FA verilen ve SC ile tedavi edilen grup,15 adet FA verilen ve SLO ile tedavi edilen grup.

DMH grubundaki ratların kalbinden biyokimyasal analizler için kan, kalın bağırsağından patolojik incelemeler için doku örnekleri ve genetik analizler içinde -20 derecede saklanmak üzere doku örnekleri alındı. FA grubundaki ratların da kalbinden biyokimyasal analizler için kan, sağ akciğerin cranial lobundan patolojik incelemeler için doku örnekleri ve genetik analizler içinde -20 derecede saklanmak üzere doku örnekleri alındı. Ayrıca SC ve SLO'nun kolon kanseri üzerine tedavi edici etkisinin tesbiti için hücre kültürü çalışmaları yapıldı.

Sonuç: DMH'in olumsuz etkileri, biyokimyasal, genetik ve patolojik açıdan rat kolonu üzerinde gözlemlenebilmiş; FA'in akciğer üzerine olumsuz etkileri biyokimyasal, genetik ve patolojik açıdan değerlendirilebilmiş, kolon kanser hattı üzerinde SC ve SLO'nun iyileştirici etkileri tesbit edilebilmiştir.

Biyokimyasal değerlerin analizinde Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. CA19-9 tümör markerı açısından, DMH verilen ratlarda diğer markerlara göre daha fazla yükselme olduğu gözlenmiş, DMH+ SC ve DMH+SLO verilen ratlarda CA19-9 değerlerinin düştüğü görülmüştür. Bu düşüş SC'de SLO'ya göre daha fazla olduğu tesbit edildiğinden dolayı, tedavi etme başarısı olarak SC'nin SLO'ya göre daha başarılı olduğu söylenebilir.

Antioksidan etkiler açısından 3 enzim (CAT, SOD ve GPx) değerleri FA uygulamasında kontrole kıyasla artmakta ve tedavi edici olarak hem SC hemde SLO verilmesi bu 3 enzimde yine kontrole kıyasla düşme olduğunu göstermektedir. Kendi içerisinde karşılaştırma yaparsak SC 'ye kıyasla SLO verilmesi bu 3 enziminde düzeyinde kontrol grubuna göre çok belirgin düşmeye neden olmuş olup FA uygulamasının toksik etkisi bu 3 enzimin daha fazla antioksidan etki ortaya koymaları ile SC ve SLO verilerek tamir edilebilme imkanının savunma mekanizmasına olan ihtiyacı azaltması ile kendini ortaya koymuştur diyebiliriz.

Biyokimyasal parametrelerden MDA değerlerine baktığımızda ise, FA verilen ratlarda lipit peroksidasyonuna bağlı olarak fazla miktarda arttığını, SC ve SLO verilmesi sonucu başlayan hasar tamiri ile bu değerlerin düştüğünü, yine de kontrol grubu ile kıyaslandığında bu değerlerin kontrol grubunun biraz üzerinde kaldığını görmekteyiz. MDA değerlerini düşürmede ise SC ve SLO yaklaşık aynı düzeyde başarı göstermiştir.

Genetik sonuçlar ele alındığında; DMH uygulaması kontrole kıyasla CHOP ve EDEM1 genlerinin aktivitesini olumsuz etkilemiştir. Tedavi edicilik açısından kıyaslama yapıldığında ise; CHOP ve EDEM1 genlerinin aktivitesinin artışı buna karşın, ATF4 ve ATF6 gen aktivitelerinin azaltılması baz alınınca SC'nin etkisi SLO'ya oranla daha başarılı bulunmuştur.

FA uygulaması CHOP ve EDEM1 genlerinin tümör baskılayıcı özelliklerini azaltarak akciğer hasarı oluşumunda etkin rol oynadığını göstermiştir. Tedavi edicilik açısından FA uygulamasına karşın ATF4, ATF6 ve GRP78 gen ekspresyonlarının azalması baz alındığında SLO'nun akciğer hasarını iyileştirmede daha etkili olduğu değerlerden anlaşılmaktadır.

Çalışmamızdaki patolojik incelemeler sonucunda, sadece DMH verilerek kolon kanseri oluşturulmaya çalışılan grupta şiddetli lenfoid hiperplaziler gelişmiştir. DMH verildikten sonra SC ve SLO verilerek tedavi edilmeye çalışılan her iki grupta da şiddetli lenfoid hiperplaziler lenfoid hiperplaziye gerilemiştir.

Caco-2 kanser hücre hattı ve SC ile SLO kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmasında; SLO'nun 24. saatte ve 200mg doz verildiğinde; SC'nin ise 6. saatte ve 120mg doz verildiğinde en etkin şekilde kanser hücrelerinin ölümüne neden olabildiği anlamına gelmektedir.

DeneySEL modelimizin bu yönüyle istenilen amacı ve başarıyı sağladığı söylenebilir. Diğer yandan, kolon kanseri ve akciğer hasarının biyokimyasal, genetik ve patolojik düzeyde aydınlatılması, bu konuda daha çok hücre kültürü çalışmaları yapılması, tedavi seçeneklerinin ve/veya ortaya çıkmadan önlenabilir yolların aydınlatılması için daha geniş katılımlı ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dimetil hidrazin, Formaldehit, Kolon kanseri, Akciğer hasarı, Köpek balığı kıkırdağı, Köpek balığı karaciğer yağı, Kolon kanser hattı.

SUMMARY

Determination of Conservative Effects of Shark Liver Oil and Shark Cartilage on Oxidative Damage Occurred in Rat Lung Exposed to Formaldehyde and Colon Cancer Originated Experimentally.

Target: During this study; toxic effects of formaldehyde on lung , carcinogen effect of DMH on large intestine , SC and SLO 's conservative effects against these toxic and carcinogenic effects has been researched.

Method: 80 rats have been classified as follows :

40 DMH Group: 4 ;control group- 6 ; given DMH but not cured group – 15; given DMH and cured with SC group -15; given DMH and cured with SLO group

40 Formaldehyde group : 4; control group – 6; Given FA but not cured group.- 15 ; given FA and cured with SC group -15 ; given FA and cured with SLO group.

Tissue samples were taken from the heart of rats in the DMH group for blood biochemical analyzes, tissue samples for pathologic examinations from the large intestine, and tissue samples for storage at -20 in genetic analyzes. Rats in the FA group received blood samples for biochemical analysis from the heart, tissue samples for pathological examinations from the cranial lobe of the right lung, and tissue samples for genotyping -20. In addition, cell culture studies were carried out to determine the therapeutic effect of SC and SLO on colon cancer.

CONCLUSION: The adverse effects of DMH could be observed on the rat column in terms of biochemical, genetic and pathological; The adverse effects of FA on the lungs could be evaluated biochemically, genetically and pathologically, and the healing effects of SC and SLO on the colon cancer line could be determined.

Kruskal Wallis test was used for the analysis of biochemical values. CA19-9 tumor markers were found to be more elevated in DMH-fed rats than in other markers, and CA19-9 values in DMH + SC and DMH + SLO-fed rats decreased. It can be said that SC is more successful than SLO as a treatment success, since this decrease is found to be more in SC than in SLO.

In terms of antioxidant effects, 3 enzymes (CAT, SOD, and GPx) values are increased compared to control in FA application, indicating that administration of both SC and SLO as therapeutics is also reduced in these 3 enzymes compared to control. In comparison with SC, the administration of SLO compared to SC did not cause a significant decrease compared to that of the control group, and the toxic effect of FA application showed that these 3 enzymes showed more antioxidant effect and SC and SLO could be repaired by decreasing the need for defensive mechanism we can say that it has revealed itself.

When we look at the MDA values from the biochemical parameters, we see that FA increases in excess amount due to lipid peroxidation in the rats given FA and decreases these values with damage recovery beginning with SC and SLO administration, but these values are slightly above the control group when compared to the control group. When the MDA values were lowered, SC and SLO were about the same level.

When genetic results are considered; DMH administration negatively affected the activity of CHOP and EDEM1 genes compared to control. When comparison is made in terms of treatment; The activity of the CHOP and EDEM1 genes was increased, whereas the effect of SC was found to be more successful than the SLO, based on the reduction of ATF4 and ATF6 gene activities.

FA application has shown that the CHOP and EDEM1 genes play an active role in the formation of lung damage by reducing the tumor suppressor properties. Based on the reduction of ATF4, ATF6 and GRP78 gene expressions despite treatment with FA for treatment, it is understood that the SLO has more effective in healing effect on lung injury.

As a result of pathological examinations of our study, severe lymphoid hyperplasia developed in the group where only DMH was given and colon cancer was tried to be formed. Severe lymphoid hyperplasia is lymphoid hyperplasia in both groups treated with SC and SLO after DMH administration.

In cell culture study using Caco-2 cancer cell line and SC and SLO; When the SLO is administered at the 24th hour and 200mg dose; SC means 6 hours and 120mg doses are the most effective way to kill cancer cells.

It can be said that our experimental model provides the desired aim and success in this direction. On the other hand, it is believed that colon cancer and lung damage are biochemically, genetically and pathologically illuminated, more cell culture studies are needed in this area, and more extensive follow-up studies are needed to elucidate the treatment options and / or preventable pathways.

Keywords: Dimethyl hydrazine, Formaldehyde, Colon cancer, Lung damage, Shark cartilage, Shark liver oil, Colon cancer line.

KAYNAKLAR

- AKALIN G., İNCESU Z., (2011). The Effects of Carvacrol on Apoptosis of H-RAS and N-RAS Transformed Cell Lines. *Turk J. Pharm. Sci.* **8 (2)**: 105-116.
- AKÇALI A., (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi.* **25(3)**: 119-123.
- AKGÜL E., DOSAY AKBULUT M., (2014). Use of Complementary or Alternative Medicine In Patients With Cancer In Turkey. *Journal of US-China Medical Science.* In press. 159. Sayfa.
- AKTARUL I.S., VIJAY M., SIVARANJANI A., NISHA S. T., NALINI N., (2017). Asiatic acid attenuates pre-neoplastic lesions, oxidative stress, biotransforming enzymes and histopathological alterations in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis. *Toxicology Mechanisms and methods.* **27(2)**: 136–150.
- AKYÜREK S., ÖNAL C., KURTMAN C., (2005). Akciğer kanserli hastalarda alternatif tedavi kullanımı. *Türk Hematoloji- Onkoloji Dergisi.* **15**: 73-77.
- ARMUTCU F., DOĞAN B., ALTIN R., GUREL A., (2007). Examination of lung toxicity oxidant/antioxidant status and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambience. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **24(2)**: 106-113.
- ATF4- activating transcription factor 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/468>.
- ATF6-activating transcription factor 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22926>.
- AYDINTUĞ Y.S., MUTLU İ., (2003). Hücre kültürü ve dış hekimliğindeki uygulamaları, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dış Hekimliği Bilimleri Merkezi, Ankara. 2-22.
- BACKOROVA M., BACKOR M., MIKES J., JENDZELOVSKY R., FEDOROCKO P., (2011). Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol in Vitro.* **25**: 37-44.

- BALKISSOON R., (2002). Occupational upper airway disease. *Clin. Chest Med.* **23**: 717–725.
- BAYDAR H., (2005). Tıbbi, aromatik ve keyf bitkileri. Yayın no:51. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. Isparta.
- BAYSAL K., SERHATLI M., ADIGÜZEL Z., (2008). İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli. 5-14.
- BROOKS, STUART M., (2007). Inhalation Airway Injury: A Spectrum of Changes. *Clin. Pulm. Med.* **14(6)**: 330-33.
- BEATRİZ S. I., CRİSTIANE M. S., ÉRIC D. B., MATHEUS C.-C., CARİNE C. D., NİELS O. S. C., WOTHAN T. L., SANDRA H. P. F., ADRIANA L., SANTOS F., (2015). Formaldehyde inhalation during pregnancy abolishes the development of acute innate inflammation in offspring. *Toxicology Letters.* **235 (2015)**: 147–154.
- BERNSTEİN C.N., (2008). Surveillance programmes for colorectal cancer in inflammatory bowel disease: have we got it right? *Gut.* **57**: 1194-6.
- BERTA J., KENESSEY I., DOBOS J., TOVARİ J., KLEPETKO W., JAN A.H., HEGEDUS B., RENYİ-VAMOS F., VARGA J., LORİNCZ Z., PAKU S., OSTOROS G., ROZSAS A., TIMAR J., DOME B., (2010). Apelin expression in human nonsmall cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol .* **5(8)**: 1120-9.
- BİLGİR O., BOLAMAN Z., AYYILDIZ O., (1995). Sitotoksik ilaçlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* **15**: 134-143.
- BLAIS J.D., FILIPENKO V., BI M.X., HARDING H.P., RON D., KOUMENIS C., (2004). Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol.* **24**: 7469–82.
- BLUM C.A., XU M., ORNER G.A., FONG A.T., BAILEY G.S., STONER G.D., HORIO D.T., DASHWOOD R.H., (2001). Beta-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2- dimethylhydrazine and 2- amino- 3-methylimidazo [4,5 f] quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* **22**: 315–320.
- BOYACI H., MARAL H., TURKAN , BAŞYİĞİT I., DİLLİOĞLUGİL M.O., YILDIZ F., TUGAY M., (2006). Effects of erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **28**: 129–137.

- BOZCUK H., ÖZDOĞAN M., AYKURT O., TOPÇUOĞLU F., ÖZTÜRK H., EKİNCİ D., KARADENİZ A., MUTLU A., BURGUCU D., (2011). Uregina maritima (L.) Baker (Liliaceae) extract induces more cytotoxicity than Standard chemotherapeutics in the A549 non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line. *Turk J Med Sci.* **41** (1): 101-108.
- BRESALIER R.S., KIM Y.S., (1998). Malignant neoplasms of the large intestine. In *Gastrointestinal and Liver disease*, (eds. Sleisenger and Fordtran) ed 6, vol 2. WB Saunders Company, Philadelphia, 1906-1942.
- CAMPHOS L., GUYOTAT D., JAFFAR C., SOLARY E., ARCHİMBAUD E., TREİLLE D., (1992). Correlation of M DR 1/p-170 expression with Daunorubicin uptake and sensitivity of leukemic progenitors in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* **48**: 254-8.
- CAMPOS L., ROUAULT J.P., SABIDO O., ORIOL P., ROUBIN., VASSELON C., ARCHİMBAUD E., MAGAUD J.P., GUYOTAT D., (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood.* **81**: 3091–3096.
- CANDA M.Ş., (1988). Temel Patoloji III Sindirir. 1. baskı, Kanser Savaş Derneği Yayınları, Sivas, 65-76.
- CASAS C., (2017). 11: 177. GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection. Published online 2017 Apr 5. doi: 10.3389/fnins.2017.00177. *Front Neurosci.* **11**: 177.
- CEYHAN T., BİLİR A., KARACA Ç., (2006). Sıçan kemik iliği stromal hücrelerinin kültüre edilebilirliği ve osteoblastik formasyonun değerlendirilmesi. *Acta Orthop Traumatol Turc.* **40** (1): 67-71.
- CHO J., KIM Y., (2002). Sharks: a potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments. *Marine Biotechnology (NY).* **4**(6): 521-5.
- CHOWDHURY A.R., GAUTAM A.K., PATEL K.G., TRIVEDI H.S., (1992). Steroidogenic inhibition in testicular tissue of formaldehyde exposed rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* **36**: 162-168.
- COOPER H.K., BUECHELER J., KLEIHUES P., (1978). DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Research,* **18**: 3063-3065.
- ÇELİKEZEN F. Ç., ERTEKİN A., (2008). Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutasyon, Seruloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Düzeylerinin İncelenmesi. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008 (2): 17-20.

- ÇEVİKBAŞ U., (2003). Robbins Temel Patoloji. 7. baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 579-585.
- ÇİÇEK C., BİLGİÇ A., (2006). Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi*. **20 (3)**: 231-241
- ÇİFTLİKÇİ A., (2002). Kolorektal kanserlerde tümör belirleyicilerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi.
- DAVIDSON B.C., ROTTANBURG D., PRINZ W., CLIFF G., (2007). The influence of shark liver oils on normal and transformed mammalian cells in culture. *In Vivo*. **21(2)**: 333-7.
- DDIT3- DNA damage inducible transcript 3.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1649>.
- DENİAU A., MOSSET P., PEDRONO F., MITRE R., LE B.D., LEGRAND A.B. (2010). Multiple Beneficial Health Effects of Natural Alkylglycerols from Shark Liver Oil. *Marine Drugs*. **8(7)**: 2175-2184.
- DENİZ G., ORAL H. B., (2011). The Official Journal of the Turkish Society of Immunology. *Turkish Journal of Immunology*. 1(18).
- DICKSON R.P., SCHWARTZ D.A., (2008). Acute and Chronic Responses to Toxic Inhalations, Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 93-1009
- DOI K., FUJIOKA M., SOKUZA Y., OHNISHI M., GI M., TAKESHITA M., KUMADA K., KAKEHASHI A., WANIBUCHI H.,(2017). Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. *In vivo*. **31**: 187-198
- DOSAY AKBULUT M., AKGÜL E., (2014). Shark Cartilage and Liver Oil Using Possibilities Against to the Cancer Formation. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. **7 (1)**: 42-45.
- DOYLE A., GRIFFITHS J.B., (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. *John Wiley&Sons*. 57-64.
- ERER H., KIRAN M.M., (2005). Tümörlerde tedavi prensipleri. *Veteriner Onkoloji*, Damla Ofset, Konya, 58-68.
- ERGENOĞLU O.M., (1999). 1,2 Dimetilhidrazin ile kolorektal kanser oluşturulan sıçanlarda selenyum, vitamin E ve levamizolün Etkileri. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi.

- ERÖZ R., KARATAŞ A., ALKOÇ O. A., BALTACI D., OKTAY M., ÇOLAKOĞLU S., (2012). Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması) The Known About Apoptosis (Review of the Literature). *Düzce Tıp Dergisi*. **14(2)**: 87-101.
- FALARDEAU P., CHAMPAGNEP.,POYET P.,HARİTON C., DUPONT E., (2001). Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin Oncol*. **Dec;28(6)**: 620-5.
- FATEMEH T., DADKHAH A., FATEMI F., DINI S., TAGHIZADEH M. M., MOHAMMAD R. M., (2015). Prevention and therapy of 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis by *Ferula assafoetida* hydroalcoholic extract / 1,2-dimetilhidrazin ile indüklenmiş kalın bağırsak kanserlerinin *Ferula assa-foetida* ekstraktı kullanılarak önlenmesi ve tedavisi. *Turkish Journal of Biochemistry*. **40(5)**: 390-400.
- FESTING M.F.W., OVEREND P., DAS R.G., BORJA M.C., BERDOY M., (2008). The Desing of Animal Experiments. London: The Royal Society of Medicine Pres Limited,; 17-28.
- FISHER D., FRANSCIS G.E., RICKWOOD D., (1998). Cell Seperation A practical approach, Oxford University. **259**: 21-27.
- FOOT M., MULHOLLAND M., (2005). Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **38(3)**: 397-407.
- FOX J.G., ANDERSON L.C., LOEW F.M., QUIMBY F.W., (2002). Loew FM, Cohen BJ Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives. Laboratory Animal Medicine 2nd Edition, American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2002; 1-16.
- FRANKLİN P., DİNGLE P., STİCKS S., (2000). Reised exhaled nitric oxide in healthy children is associated with domestic formaldehyde levels. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 1757-1759.
- FRESHNEY R.I., (1994). A Manual of Basic Techniques. *Culture of Animal Cells*. Wiley-Liss. New York. 486.
- GAPDH- glyceraldehede-3-phosphate dehydrogenase
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597>
- GINGRAS D., RENAUD A., MOUSSEAU N., BELIVEAU R., (2000). Shark Cartilage Extracts as Antiangiogenic Agents: Smart Drinks or Bitter Pills?. *Cancer and Metastasis Reviews*. **19**: 83–86.

- GLAUERT H.P., BENNINK M.R., (1983). Influence of diet or intrarectal bile acid injections on colon epithelial cell proliferation in rats previously injected with 1,2-dimethylhydrazine. *J Nutr.* 1983 Mar;**113(3)**:475-82.
- GLOBOCAN., (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/factsheets_cancer.aspx/ [last accessed 11 Apr 2016].
- GONZALEZ R.P., LEYVA A., MORAES M.O., (2001). Shark Cartilage as Source of Antiangiogenic Compounds: From Basic to Clinical Research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* **24(10)**: 1097-1101.
- GÜLCEN B., KARACA Ö., KUŞ M. A., KAMAN D., ÖGETÜRK M., KUŞ İ., (2012). Omega-3 Yağ Asitlerinin Böbrek Antioksidan Savuma Sistemi Üzerindeki Etkisi: Deneysel Bir Çalışma. *Balikesir Sağlık Bilimleri Dergisi.* Cilt:1 Sayı:2 Ağustos 2012; 70-74
- GÜREL A., COŞKUN O., ARMUTÇU F., KANTER M., OZEN O.A., (2005). Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat.* **29**: 173-178.
- HAJIMORADI M., HASSAN Z.M., POURFATHOLLAH A.A., DANESHMANDI S., PAKRAVAN N., (2009). The effect of shark liver oil on the tumor infiltrating lymphocytes and cytokine pattern in mice. *J. of Ethnopharmacology.* **126(3)**: 565-70.
- HARALDSDOTTIR S., GUDLAUGSDOTTIR E., INGOLFSDOTTIR K., OGMUNDSDOTTIR H.M., (2004). Anti proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin in vitro. *Planta Med.* **70**: 1098-100.
- HASLE H., ROSE C., UGESKR L., (1991). Shark liver oil (alkoxyglycerol) and cancer treatment. *Jan* 28;**153(5)**: 343-6.
- HASSAN Z.M., FEYZI R., SHEIKHIAN A., BARGAHI A., MOSTAFAIE A., MANSOURI K., SHAHROKHI S., GHAZANFARI T., SHAHABI S., (2005). Low molecular weight fraction of shark cartilage can modulate immune responses and abolish angiogenesis. *Int Immunopharmacol.* **5(6)**: 961-70.
- HEIJSTEK M.W., KRANENBURG O., RINKES I.H.M.M. (2005). Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Digestive Surgery.* **22**: 16-25.
- HOLT P.E., KUCKE V.M., (1985). Rectal neoplasia in the dog: A clinicopathological review of 32 cases. *Vet Rec* **116**: 400.

- IAGHER F., DE BRITO B.S.R., SOUZA W.M., NUNES J.R., NALIWAIKO K., SASSAKI G.L., BONATTO S.J., DE OLIVEIRA H.H., BRITO G.A., DE LIMA C., (2013). Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. *Lipids in Health and Disease*. 12.146.
- IDE T. Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri Türkçe Çeviri, Translation ed. ZUPTHEN LFM., BAUMANS V., BEYNEN AC., Ankara: Medipres Yayınları-Ozkan Matbaacılık: 2003; 1-11.
- JACKSON P.E., COOPER D.P., O'CONNOR P.J., POVEY A.C., (1999). The relationship between 1,2-Dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumors: tumour development in female SWR mice does not require a K-Ras mutational event. *Carcinogenesis*. **20(3)**: 509-513.
- JAYAKUMAR T., THOMAS P.A., GERALDINE P. E. G., (2007). Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. **42(3)**: 183-191.
- KARACA Ö., ERTEKİN T., CANÖZ Ö., HACIALİOĞULLARI M., EKİNCİ N., ELMALI F., ÜLGER H., (2010). 1,2-Dimetilhidrazin ile Balb/C Türü Farelerde Deneysel Kolon Kanserinin İndüklenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* **30(3)**: 1015-24.
- KAILASAPATHY K., CHIN J., (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.* **78**: 80-88.
- KAKLIKKAYA İ., MENTEŞE Ü., KORAMAZ İ., ALTUN G., MENTEŞE A., ÇAKIROĞLU Y., ÖZCAN F., (2010). Results of ethyl pyruvate application in an experimental ischemia reperfusion model. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg.* **(4)**: 310-314.
- KANEKO T., TAHARA S., TAKABAYASHI F., (2003). Suppression of lipid hydroperoxideinduced oxidative damage to cellular DNA by esculetin. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 840–844.
- KARTHIK K. V., VENNILA S., NALINI N., (2010). Effect of morin on DMH induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in experimental colon carcinogenesis. *Environ. Toxicol. Pharm.* **29**: 50–57.
- KERBEL R.S., (2000). Tumor angiogenesis: Past, present and the near future. *Carcinogenesis*, **213**: 505 515.

- KINGSNORTH A.N., ABU-KHALAF M., ROSS J.S., MALT R.A., (1985). Potentiation of 1,2-Dimethylhydrazine-induced anal carcinoma by epidermal growth factor in mice. *Surgery*, **97 (6)**: 696-700.
- KO J.S., YANG H.Y., CHANG J.Y., SEO J.K., (2007). Lactobacillus plantarum inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- α . *World Gastro*. **13(13)**: 1962-1965.
- KORKMAZ M., YAKUT T., GÜVENÇ B.H., (2004). Fetal ve Erişkin Tavşan Özofagus Düz Kas Hücrelerinin Morfolojik Özelliklerinin ve Büyüme Kinetiklerinin Karşılaştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. **30 (1)**: 27-30.
- KOYUNOĞLU F., TEKİN S., KONAR V., SANDAL S., (2013). İnsan Meme Kanseri Hücre Serileri (MCF-7) Üzerine Apelin-13'ün Etkilerinin Araştırılması: *In Vitro* Bir Çalışma. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. **1**: 23-28.
- KOZONI V., TSIOLIAS G., SHIFF S., RIGAS B., (2000). The effect of lithocholic acid on proliferation and apoptosis during the early stages of colon carcinogenesis: differential effect on apoptosis in the presence of a colon carcinogen. *Carcinogenesis* **21 (5)**: 999-1005.
- KRIEBEL D., MYERS D., CHENG M., WOSKIE S., COCANOUR B., (2001). Short term effect of formaldehyde on peak expiratory flow and irritant symptoms. *Arch Environ Health* **56**: 11-18.
- KURAGUCHI M., COOK H., WILLIAMS E.D., THOMAS G.A., (2001). Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *Journal of Pathology*. **193**: 517-521.
- KURT N., (2008). Yaşa Bağlı Olarak Antioksidan Enzimlerinin Süperoksit Dismütaz (SOD), Katalaz (CAT) Aktivitelerinin ve Malondialdehit (MDA) Seviyesinin İncelenmesi. Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Sy. 42
- LACROIX M., (2008). Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer* . **122(1)**: 1-4.
- LAI M.D., XU J. (2007). Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr Genomics*. **8(1)**: 43-9.
- LEBLANC A.M., VALDEZ J., PERDIGON G., (2004). Regulatory effects of yogurt on intestinal inflammatory immune response. *Eur J Inflamm* **2**: 21-31.
- LEE A., LANGER R., (1983). Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science*. **221(4616)**: 1185-7.

- LEE B.M., PARK K.K., (2003). Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutation Research*. **523**: 265-273.
- LEVINE A.J., (1997). P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. **88**: 323–331.
- LEVINE A.J., HU W., FENG Z., (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. **13(6)**: 1027-36.
- LEWKOWICZ N., LEWKOWICZ P., KURNATOWSKA A., TCHORZEWSKI H. (2006). Biological action and clinical application of shark liver oil. *Pol. Merkur Lekarski*. **20(119)**: 598-601.
- LEWKOWICZ P., TCHORZEWSKI H., (2012). Anti-tumor activity of 1-O-alkylglycerols – the main component of shark liver oil. *Pol. Merkur Lekarski*. **33(198)**: 353-357.
- LIN C.Y., LOVEN J., RAHL P.B., PARANAL R.M., BURGE C.B., BRADNER J.E., (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* **151**: 56–67.
- LUO B., LEE A.S., (2013). The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*. **32**: 805–18.
- MALHI H., KAUFMAN R.J., (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. **54**: 795–809.
- MATSUMURA K., SAKAI C., KAWAKAMI S., YAMASHITA F., HASHIDA M., (2014). Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of unfolded protein response. *Biol Pharm Bull*. **37(4)**: 648-53.
- MECKLIN J.P., (2008). The implications of genetics in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 19 Suppl **5**: 87-90.
- MENEZO Y., GUERIN J.F., CZYBA J.C., (1990). Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Bio Reprod*. **42**: 301-306.
- MINN A.J., RUDIN C.M., BOISE L.H., THOMPSON C.B., (1995). Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*. **86**: 1903–1910.
- MOORGHEN M., ORDE M., FINNEY A.J., APPLETON D.R., WATSONS A.J., (1998). Sulindac enhances cell proliferation in DMH-treated mouse colonic mucosa. *Cell Prolif*. **31**: 59-70.

- MORETTI M., MARCHIONI C.F., (2007). An overview of erdosteine antioxidant activity in experimental research. *Pharmacological Research*. **55**: 249–254.
- MORUSAKI S., MUROYAMA K., YAMAMOTO Y., YASHIKAI Y., (2000). Antitumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice. *Cancer Immun. Immunother.* **49**: 157-164.
- MOSMAN T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*. **65**: 55-63.
- NEWELL L.E., HEDDLE J.A., (2004). The potent colon carcinogen, 1,2-Dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research*. **564**: 1-7.
- NOWICKI R., BARANSKA R. W., (2007). Shark liver oil as a supporting therapy in atopic dermatitis. *Pol Merkur Lekarski*. **22(130)**: 312-3.
- OKTAR N., (2009). K562 Hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana. 20-25
- OVALI E., UÇAR F., (2003). Hematolojide uygulamalı hücre teknikleri kurs kitabı. Trabzon. **217**: 7-16.
- ÖZEN O., SARSILMAZ M., (2000). Solunan havadaki formaldehit toksisitesi ve alınması gereken önlemler. *Fırat Tıp Dergisi*. **2**: 6-12.
- ÖZEN O.A., AKPOLAT N., SONGUR A., KUŞ İ., ZARARSIZ İ., ÖZAÇMAK V. H., SARSILMAZ M., (2015). Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study. *Toxicol Ind Health*. **21**: 249- 254.
- P53 Signaling Pathway Overview. <http://www.rockland-inc.com/p53-pathway.aspx>.
- PARK H.D., HO R.C. (2001). Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from kimchi Korean fermented vegetables. *Biotech. Lett.* **23**: 1583-1589.
- PATIROĞLU T.E., (1994). Sindirim Kanalı Patolojisi. 1. Baskı. Erciyes Üniversitesi Basım Evi. Kayseri. 159-179.
- PATRA D., SANDELL L.J., (2012). Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 14: e10. doi: 10.1017/erm. 3.

- PERDUE D.G., PERKINS C., JACKSON T.J., COUGHLIN S.S., AHMED F., HAVERKAMP D.S., JIM M.A., (2008). Regional differences in colorectal cancer incidence, stage, and subsite among American Indians and Alaska Natives, 1999-2004. *Cancer*. **113 (S5)**:1179-1190.
- PESSI T., SUTAS Y., HURME M., ISOLAURI., (2000). Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin. Exp. Allergy*. **30 (12)**: 1804-1808.
- PUGLIESE P. T., JORDAN K., CEDERBERG H., BROHULT J., (1998). Some Biological Actions of Alkylglycerols from Shark Liver Oil. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **4(1)**: 87-99.
- RAUSCHERT N., BRANDLEIN S., HOLZINGER E., HENSEL F., MÜLLER-HERMELINK H.K., VOLLMERS H.P., (2008). A new tumorspecific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest*. **88(4)**: 375–86.
- RIBATTI D., FOLKMAN J., (2008) A pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis*. **11(1)**: 3–10.
- ROSS R., PELTON PH., OVERHOLSER L., (1994). Alternatives in cancer therapy. Shark cartilage. A Fireside Book Published by Simon & Schuster, NY.
- RYON D.L.S., ROM W. N., (2011). Diseases caused by respiratory irritants and toxic chemicals. <http://www.iloencyclopaedia.org/part-i-47946/respiratory-system/21-10-respiratory-system/diseases-caused-by-respiratory-irritants-and-toxic-chemicals>.
- SABIO G., ROGER J. D., (2014). TNF and MAP kinase signaling pathways. *Semin Immunol*. **26(3)**: 237–245.
- SALEN J. Animal models, principles and problems. In: SVENDSEN P, Hau ed. Handbook of Laboratory Animal Science Vol. II Animal Models, Boca Raton, Florida: CRC Press: 1994; 1-6.
- SARSILMAZ M., ÖZEN O.A., ÖZYURT H., (2000). Subakut ve subkronik formaldehit inhalasyonundan sonra sıçanlarda karaciğer enzimatik antioksidan sistemin değerlendirilmesi. *Van Tıp Dergisi*. **7**: 84-89.
- SANDLER R.S., (1993). Cholecystectomy and colorectal cancer. *Gastroenterology*. **105**: 286-288.
- SARA O. A., SAMANTHA E. G., ANATOLY Z., (2015). Proteasome activity is important for replication recovery, CHK1 phosphorylation and prevention of G2 arrest after low-dose formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **286**:135–141.

- SCHMITT C.A., LOWE S.W., (1999). Apoptosis and therapy. *J Pathol.* **187**:127–137.
- SCHUETTE S.A., ROSE R.C., (1986). The effect of diets high in fat and/or fiber on colonic absorption of DMH in the rat. *Nutr Cancer.* **8(4)**:257-65.
- SCHWARTZ D.A., (1987). Acute inhalational injury, in Rosenstock L (ed), *Occupational Medicine: Occupational Pulmonary Disease.* Philadelphia, Hanlay Belfus, pp 297–318.
- SCHWARTZ D., ROTTER V., (1998). p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol.* **8**: 325–336.
- SCHWARTZ L.M., OSBORNE B.A., (1995). *Methods in Cell Biology, Cell Death.* Academic Press. San Diego. **46**: 150-181.
- SEYDEL G. Ş., AKSOY K.; (2012). Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Mechanisms. *Archives Medical Review Journal.* **21(4)**: 221-235.
- SHARADA H. S., SENTHILKUMAR T., DAVID R. C., PRABU C., SANGEETHA N., (2017). Morin and Esculetin supplementation modulates c-myc induced energy metabolism and attenuates neoplastic changes in rats challenged with the procarcinogen 1,2 – dimethylhydrazine. *European Journal of Pharmacology.* **796**: 20–31.
- SHEU J.R., FU C.C., TSAI M.L., CHUNG W.J., (1998). Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities. *Anticancer Res.* **18(6A)**: 4435-41.
- SIDDIQUE A. I., MANI V., ARIVALAGAN S., THOMAS N. S.; NAMASIVAYAM N., (2017). Asiatic acid attenuates pre-neoplastic lesions, oxidative stress, biotransforming enzymes and histopathological alterations in 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis. *Toxicology mechanisms and methods.* **27(2)**: 136–150.
- SIEGEL R., DESANTIS C., JEMAL A., (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* **64**: 104–17.
- SIMONIAN P.L., GRILLOT D.A., NUNEZ G., (1997). Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood.* **90**: 1208–1216.
- SKOPINSKA R. E., KROTKIEWSKI M., SOMMER E., ROGALA E., FILEWSKA M., BIALAS C. B., PASTEWKA K., SKURZAK H., (1999). Inhibitory effect of shark liver oil on cutaneous angiogenesis induced in Balb/c mice by syngeneic sarcoma L-1, human urinary bladder and human kidney tumour cells. *Oncol Rep.* Nov-Dec; **6(6)**:1341-4.

- SKOPINSKA R.E., CHOROSTOWSKA W.J., KROTKIEWSKI M., ROGALA E., SOMMER E., DEMKOW U., SKURZAK H., (2003). Inhibitory effect of Greenland shark liver oil combined with squalen and arctic birch ashes on angiogenesis and L-1 sarcoma growth in Balb/c mice. *Polish J. of Veterinary Sciences*. **6(3)**: 54-6.
- SLAWIENSKI M., (1997). Malignant colonic neoplasia in cats: 46 cases. *J Am Vet Med Assoc*. **211**: 878.
- SZOSTAK W.B., SZOSTAK W.D., (2006). Health properties of shark oil. *Przegl Lek*. **63(4)**: 223-6.
- TENG S., BEARD K., POURAHMAD J., MORIDANI M., EASSON E., POON R., (2001). The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*. **130**: 285-296.
- THRASHER J.D., KILBURN K.H., (2001). Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health*. **56**: 300- 311.
- THURNER N., DESCHNER E.E., STONEHILL E.H., LIPKIN M., (1973). Induction of Adenocarcinomas of the colon in mice by weekly Injections of 1,2-Dimethylhydrazine. *Cancer Research*. **33**: 940-945.
- TUCKER J.M., KORT H.I., TOLEDO A.A., (1995). Effect of coculture on subsequent survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J Assist Reprod Gen*. **12**: 689-692.
- UniProtKB - Q92611 (EDEM1_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92611>.
- USANMAZ S.E, AKARSU E.S, VURAL N. (2002).Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. *Envir Toxicol Pharmacol*. **11**: 93-100.
- ÜNSALDI E., ÇİFTÇİ M.K., (2010). Formaldehit, Kullanım Alanları, Risk Grubu, Zararlı Etkileri ve Koruyucu Önlemler. *YYU Veteriner Fakultesi Dergisi*. 21 **(1)**: 71 – 75.
- VINDEROLA C.G., PROSELLO W., GHIBERTO T.D., REINHEIMER J.A., (2000). Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco. *J Dairy Sci*. **83**: 1905-1911.

- WANG S., XIANGYUN A. C., JING H., JIANG J. K., LI Y., CHAN-SALIS, K. Y., GU Y., CHEN G., THOMAS C., PUGH B. F., WANG Y., (2015). ATF4 Gene Network Mediates Cellular Response to the Anticancer PAD Inhibitor YW3-56 in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* **14(4)**: 877–888.
- WANG J.G., WANG D.F., Lv B.J., Si J.M., (2004) A novel mouse for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol.* **10 (20)**: 2958-2962.
- WANG M., WEY S., ZHANG Y., YE R., LEE A.S., (2009). Gelişim, Kanser ve Nörolojik Bozukluklarda Katlanmamış Protein Tepkisi Regülatörü GRP78 / BiP'nin Rolü. *Antioxid Redoks Sinyali.* **11 (9)**: 2307 - 2316.
- WITAICENIS A., SEITO L.N., DI STASI L.C., (2010). Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem. Biol. Interact.* **186**: 211–218.
- WOLF J.C., GINN P.E., HOMER B., FOX L.E., KURZMAN I.D., (1997). Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. *Vet Pathol.* **34(5)**: 394-404.
- WU R.Y., CHIANG H., SHAO B.J., LI N.G., FU Y.D., (1994). Effects of 2.45-GHz microwave radiation and phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. *Bioelectromagnetics.* **15**: 531-538.
- YAKA E., EĞİLMEZ M.Y., KESKİNOĞLU P., (2006). Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS' un PC12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Geriatrics.* **9 (1)**: 1-7.
- YILDIRIM Y., (2005). Beyaz peynir yapımında bazı probiyotik bakterilerin kullanılmasının *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi. Doktora Tezi. A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- YILDIZ İ., (2006). Kanser hastalarında tamamlayıcı-alternatif tedavi kullanımı. Uzmanlık Tezi. İSTANBUL.
- ZARARSIZ İ., KUŞ İ., ÇOLAKOĞLU N., PEKMEZ H., YILMAZ H.R., SARSILMAZ M., (2004a). Formaldehit Maruziyeti Sonucu Sıçan Akciğerinde Oluşan Oksidatif Hasara Karşı Melatonin Hormonunun Koruyucu Etkisi: Işık Mikroskopik ve Biyokimyasal Çalışma. *Van Tıp Dergisi.* **11 (4)**: 105-112.,.

- ZARARSIZ İ., SÖNMEZ M. F., YILMAZ H. R., PEKMEZ H., KUŞ İ., SARSILMAZ M., (2004b). Sıçanlarda formaldehit uygulamasıyla akciğerlerde oluşan histolojik hasar üzerine omega-3 yağ asitlerinin koruyucu etkisi. VIII. Ulusal Anatomi Kongresi, Cilt I, P114, Konya-2004.
- ZARARSIZ İ., KUŞ İ., YILMAZ H. R., KÖSE E., SARSILMAZ M., (2007). Deneysel Formaldehit Toksikitesi Sonucu Hipokampusta Oluşan Doku Hasarına Karşı Omega-3 Yağ Asitlerinin Antioksidan Etkileri. XI. Ulusal Anatomi Kongresi. 26-29 Ekim 2007 Denizli.
- ZEYTİNOĞLU H., İNCESU Z., AYAZ T. B., TÜRK A.O., BARUTÇA B., (2008). Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen cetraria aculeata (Schreb.) Fr. in vitro. *Phytother Res.* **22**: 118-23.
- ZHANG P., OMAYE S.T., (2001). Antioxidant and prooxidant roles for β -carotene α -tocopherol and ascoric acid in human lung cells. *Toxicology in vitro.* **15**: 13-24.
- ZHENG L., LING P., WANG Z., NIU R., HU C., ZHANG T., LIN X., (2007). A novel polypeptide from shark cartilage with potent anti-angiogenic activity. *Cancer Biology & Therapy.* **6 (5)**: 775 – 780.
- ZHOU F.H., FOSTER B.K., ZHOU X.F., COWIN A.J., XIAN C.J., (2006). TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats. *Journal of Bone and Mineral Research.* **21(7)**:1075-88.

ÖZGEÇMİŞ

BİREYSEL BİLGİLER:

Ad Soyad: Elvan AKGÜL
Doğum Tarihi ve Yeri: 24.10.1980 MERKEZ/ESKİŞEHİR
Uyruğu: TC
İletişim Adresleri: AKÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Kliniği

EĞİTİM DURUMU:

Üniversite: Balıkesir Bandırma Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik Bölümü

Yüksek Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Bölümü.

Yüksek Lisans Tez Adı: Use of Complementary or Alternative Medicine In Patients With Cancer In Turkey.

Yabancı Dil: İngilizce

Yayınlar: 1 Use of Complementary or Alternative Medicine In Patients With Cancer In Turkey. Journal of US-China Medical Science. In press. Akgül E, Dosay-Akbulut M. 2014.

2 Shark Cartilage and Liver Oil Using Possibilities Against to the Cancer Formation. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. Dosay-Akbulut M, Akgül E, Mart 2014.

Bildiriler: 1. Shark Cartilage and Liver Oil Using Possibilities Against to the Cancer Formation. ‘‘Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi’’. Bosna- Hersek/ Saraybosna Üniversitesi. Dosay-Akbulut M, Akgül E, 2014.