

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GOJİBERRY’NİN KADIN KISIRLIĞINDA KULLANILAN GIDA
TAKVİYELERİ İLE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Afsoon SAEIDI

(Y1413.210011)

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Gıda Güvenliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

Ekim, 2017





T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı Y1413.210011 numaralı öğrencisi Afsoon SAEIDI'ın "GOJİBERRY'NİN KADIN KISIRLIĞINDA KULLANILAN GIDA TAKVİYELERİ İLE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 12.09.2017 tarih ve 2017/20 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarakedilmiştir.

kabul

aybiniği

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi : 13/10/2017

1)Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

2) Jüri Üyesi : Doç. Dr. Esin AKTAŞ

3) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ayhan BİLİR

.....
.....
.....

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.



YEMİN METNİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “GOJİBERRY’NİN KADIN KISIRLIĞINDA KULLANILAN GIDA TAKVİYELERİ İLE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ ’adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Bibliyografya ’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim.
(13/10/2017)

Afsoon SAEIDI



*Bu tez
çalışması bilgisine, çözüm bulma yeteneğine ve sabrına hayran olduğum ve
empatisini takdir ettiğim Sayın Doç. Dr. Mine ERGÜVEN'e ve hayatım boyunca
yanımda olan, desteğini benden hiç esirgemeyen canım anneme ithaf olunmuştur.*



ÖNSÖZ

Bu çalışmada başta bilgisine, pratik çözüm bulma yeteneğine, hızlı karar verme yetisine ve sabrına hayran olduğum ve takdir ettiğim tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mine ERGÜVEN'e, Bölüm Başkanım ve Enstitü Müdürüm Sayın Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR'a, Flow sitometride yardımlarını bizden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Esin Aktaş'a, hayatımda attığım her adımda yanımda olan ve maddi-manevi olarak hep yanımda olan anneme teşekkürü bir borç bilir saygılarımı ve sevgilerimi sunarım.

Ekim, 2017

Afsoon SAEIDI



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Lösemi.....	3
2.1.1 Lösemi çeşitleri	3
2.1.1.1 Kronik myeloid lösemi.....	4
2.2 Fitoterapotik Yöntemler	6
2.2.1 Goji berry	7
2.2.1.1 Goji berry içeriği	7
2.2.1.2 Goji Berry'nin Faydaları	9
2.3 Multivitaminler.....	10
2.3.1 Fertilovit® F 35 Plus.....	12
3 MATERYAL ve METOD	15
3.1 Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal Ve Sarf Malzemeler.....	15
3.2 Goji Berry.....	17
3.3 Gojiberry Ekstraktının Hazırlanması	18
3.4 Antioksidan Kapasite Tayini Deneyleleri	18
3.4.1 Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini	18
3.4.2 Total Flavonoid Miktar Tayini	19
3.5 Multivitamin.....	19
3.6 Tek Tabakalı Hücre Kültürü	20
3.7 Tek Tabakalı Hücre Kültürü ile Yapılan Deneyleleri	20
3.8 Hücre Proliferasyon İndeksi.....	21
3.9 Canlılık ve Apoptoz Tayini	22
3.10 Apoptotik, Nekroapoptotik ve Anti-Apoptotik Protein Miktar Tayini ...	22
3.10.1 Protein Konsantrasyonlarının Saptanması	22
3.10.1.1 Kaspaz-3 Düzeyleri	22
3.10.1.2 Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, MK, RIPK-1 ve NF-kB	
Düzeyleri	23
3.11 İstatistiksel Analiz	24
4 SONUÇLAR	25
4.1 Goji berry'de Antioksidan Kapasite Tayini (Fenolik ve Flavonoid)	25
4.2 Hücre Proliferasyon İndeksi.....	25
4.3 Hücre Canlılığı ve Apoptotik İndeks Bulguları	27
4.3.1 Canlı KML Hücre Oranları	28
4.3.2 Apoptotik KML Hücre Oranları.....	29

4.3.3. Ölü KML Hücre Oranları	30
4.4 ELIZA Bulguları	31
4.4.1 Kaspaz-3 Düzeyleri	31
4.4.2 Kaspaz-8 Düzeyleri	33
4.4.3 Kaspaz-9 Düzeyleri	36
4.4.4 Bax Düzeyleri.....	38
4.4.5 Bcl-2 Düzeyleri	39
4.4.6 NF-kB Düzeyleri	41
4.4.7 Midkin Düzeyleri	42
4.4.8 RIPK-1 Düzeyleri.....	44
5 TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	57



KISALTMALAR

ABL1	: Abelson onkogeni 1
Ac-DEVD-Pna	: Asetil-Asp-Glu-Val-Asp nitroanilidin
Akt	: protein kinaz B
ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
Anneksin-V-FITC	: Anneksin-V-Fluoresan isotiyosiyanat
ATCC	: Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
Bap-1	: BRCA1 ilişkili protein-1
BCA	: Biçinkromik Asit
BCR	: Breakpoint cluster region
BSA	: Serum albümin
CAE	: Meyve ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı
DS	: Down sendromu
DW	:mg gallik asid ekivalanları/g kuru meyve ağırlığı
DXR	: Doksorobisin
EC	: Ekstre edilebilen bileşik miktarı
ELIZA	: Enzim bağlantılı immünosorbent test
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
FBS	: Fötal sığır serumu
FV	: Fertilovit® F35 Plus
GAE	: Meyve ağırlığının her gramı için gallik asid ekivalanı
GB	: Gojiberry
GBP	: Gojiberry polisakkaridleri
GRB2	: büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
JAK	: Janus kinaz
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
KML	: Kronik myeloid lösemi
LRP	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein
MDS	: Myelodisplastik sendromu
MK	: Midkin
MV	: Multivitamin
MVM	: Multivitamin minerallerin
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NRV	: Beslenme referans değeri
PARP	: Poly (ADP-riboz) polimeraz
PHS II	: Hekimlerin Sağlık Çalışması II
PI	: Propidyum iodid
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
pNA	: p-nitroanilinin
PTP –ζ	: Protein tirozin fosfataz

ROT	: Reaktif oksijen türleri
SD	: Standart sapma
SOD	: Süperoksit dismutaz
STAT	: Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktive edicileri
tGBF	: Total GB flavonoidleri
TGF-β	: Tümör büyüme faktörü- β
TMB	: 3,3',5,5'-tetrametillbenzidin
Vit C	: Vitamin C
Vit E	: Vitamin E



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: KML oluşum mekanizması	6
Şekil 2.2: Oksidan-Antioksidan Sistem.....	8
Şekil 3.1: K562 lösemi hücreleri (Orijinal büyütme x30)	20
Şekil 3.2: Tek tabakalı hücre kültürü	21
Şekil 3.3: ELIZA	24
Şekil 4.1: Hücre sayıları	25
Şekil 4.2: Flow sitometri ile hücre canlılığı ve apoptoz analizi	27
Şekil 4.3: Kaspaz-3 düzeyleri	32
Şekil 4.4: Kaspaz-8 düzeyleri	34
Şekil 4.5: Kaspaz-9 düzeyleri	36
Şekil 4.6: Bax düzeyleri.....	38
Şekil 4.7: Bcl-2 düzeyleri	39
Şekil 4.8: NF-kB düzeyleri	41
Şekil 4.9: Midkin düzeyleri	43



GOJİBERRY’NİN KADIN KISIRLIĞINDA KULLANILAN GIDA TAKVİYELERİ İLE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Fertilovit® F35 Plus (FV; Gonodasan AG, Almanya) B,C,D,E vitaminleri, koenzim Q10 ile Fe, I ve Zn mikroelementlerini içeren, kadında hamilelik öncesi önerilen, antioksidan etkili gıda takviyesidir. FV ile benzer içeriğe sahip, geleneksel Çin tıbbi bitkisi ve gıda takviyesi olan Gojiberry (GB, *Lycium barbarum*) antioksidan etkili olup kanser dahil birçok çeşitli hastalıkta tedavi edici/tedaviye yardımcı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, GB'nin kronik myeloid lösemi üzerine tek başına ve FV ile birlikte etkisini saptamak ve bu etki mekanizmalarının yollarını araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Antioksidan kapasiteleri belirlenen GB meyve özütleri, hücre kültüründe tek başına ve FV ile birlikte K562 lösemi hücrelerine 72 saat boyunca uygulandı. Etkileri hücre sayısı ve canlılığı, apoptotik indeks (akan hücre ölçer), apoptotik (Kaspazlar-3,8,9; bax) /nekroapoptotik (RIPK-1) ve direnç proteinleri [Midkin (MK), bcl-2, nf-kappaβ] seviyeleri (ELIZA) ile araştırıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde Anova testi kullanıldı ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Hücre sayısını ve canlılığını, 72 saat sonunda en etkili azaltan grup FV olarak saptandı ($P_{FV}<0.05$). En yüksek apoptotik indeks ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve nf-kappaβ seviyeleri, FV grubunda belirlendi ($P_{FV}<0.05$). En yüksek bax ve bcl-2 seviyeleri, GB grubunda saptandı ($P_{LB}<0.05$). En yüksek MK seviyeleri, GB grubunda belirlendi ($P_{LB}>0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada ilk defa FV'nin anti-kanser etkisi olduğu,GB ile FV kullanımının antagonist etki gösterdiği, ekstrinsik apoptoz yolunu kullandığı ve direnç proteini MK'yı inhibe ettiği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: *Lycium barbacum* (Gojiberry), Kronik Myeloid Lösemi, Kadın kısırlığı, Apoptoz, Midkin



THE EVALUATION OF GOJIBERRYS' EFFECT WITH DIETARY SUPPLEMENTS USED IN FEMALE INFERTILITY

ABSTRACT

Objective: FertiloVit® F35 Plus (FV; Gonodasan AG, Germany) containing B,C,D,E vitamins, coenzyme Q10 with Fe, I and Zn microelements, advised for female preconceptional is a dietary supplement with antioxidant effect. A traditional Chinese medical herb and dietary supplement Gojiberry (GB, *Lycium barbarum*) having similar content as FV and an antioxidant effect is used as a therapeutic agent/an adjuvant at various illnesses. In this current study, we aimed to determine the effect of GB in single agent and in combination with FV on chronic myeloid leukemia and the pathway of this mechanism action.

Materials and methods: Antioxidant capacity determined GB fruits' extracts in single and in combination with FV were applied to K562 leukemia cells for 72 h. Their effects were evaluated by cell viability, apoptotic index (flow cytometry), the levels of apoptotic (Caspases-3,8,9; bax)/ necroapoptotic (RIPK-1) and resistance [Midkine (MK), bcl-2, nf-kappa β] proteins (ELISA). Anova test was used and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Potent inhibition of cell number and viability was determined at the FV group ($P_{FV} < 0.05$). Highest apoptotic index and caspase-8, nf-kappa β and caspase-3 levels were detected at the FV group ($P_{FV} < 0.05$). Highest bax and bcl-2 levels were determined at the GB group ($p < 0.05$). Highest MK levels were detected at the GB group ($P_{GB} > 0.05$).

Conclusion: In this study, it's shown for the first time that FV has anti-cancer effect, the usage of GB with FV shows antagonist effect, actions via extrinsic apoptosis pathway and inhibit a resistance protein MK.

Keywords: *Lycium barbacum* (Gojiberry), Chronic Myeloid Leukemia, Female Infertility, Apoptosis, Midkine



1 GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada yaklaşık 1.5 milyon kişinin yakalandığı kronik myeloid lösemi (KML) hastalığı, Abelson onkogeni (ABL1) ve breakpoint cluster region (BCR) geni arasında meydana gelen genetik translokasyon t(9;22)(q34;q11.2) sonucu oluşan tedaviye rağmen çoğu zaman ölümlü sonuçlanan bir kan hastalığıdır [1]. Yaygın olarak kullanılan kemoterapi, cerrahi, radyoterapi, hormon terapisi ve immunoterapi gibi eski ve yeni tüm kanser tedavi modellerinin mide toksisitesi, iltihap, kalp hastalığı, saç kaybı, kas atrofisi, kısırlık ve libido kaybı gibi başka hastalıkları beraberinde getiren ve hayat kalitesini düşüren yan etkileri bulunmaktadır [2]. Bunun sonucunda yan etkileri azaltmak için bitki özütleri ve türevleri kanser tedavileri için tercih edilmekte ve klinik olarak test edilmiş güvenilir birçok antineoplastik ajan bitkilerden ve sebzelerden üretilmektedir [2, 3].

Gojiberry (GB, *Lycium barbacum*), proteoglikanları, fitoaleksini (Skopoletin), vitamin C analogunu, C ve E vitaminlerinin yanı sıra B vitaminlerini (B1, B2, B3, B6), 18 adet amino asidi, protein yapısında bulunmayan amino asitleri (Taurin, c-aminobütirik asit, betain), 21 adet iz minerali, esansiyel yağları ve yağ asitlerini (Hekzadekanoik asit, linoleik asit, miristik asit v.b.), karotenoidleri (Zeaksantin ve çeşitli türevleri, b-karoten v.b.), çeşitli flavonoidleri (Mirisetin v.b.) ve p-koumarik asit gibi diğer çeşitli maddeleri içeren geleneksel Çin tıbbi bitkisi ve buna ek olarak gıda takviyesidir [4,5]. GB yaşlanmayı önler ve yavaşlatır, savunma sistemini düzenler, sinirleri korur, hücreyi korur, metabolizmayı hızlandırır, karbonhidrat ve yağ seviyelerini düzenleyerek bunlarla ilişkili semptom ve/veya hastalıkları önler, kontrol altına alır ve tedavi eder [4-7]. GB'nin lösemi de dahil olmak üzere birçok kanser tipi için tedavi edici, tedavi yan etkilerini azaltıcı ve birçok kanser terapisininin tedavi edici etkilerini artırma (sinerjistik veya aditif etki) gibi görevleri de bulunmaktadır [3,5-8]. Kanseri önleyici ve tedavi edici etkilerini anti-oksidan mekanizma, apoptoz, hücre döngüsü tutulumu ve

immünomodülasyon yolu ile gösterir [3,5-8]. GB'nin ayrıca kadın üreme sağlığında [hiperandrojenizm, polikistik yumurtalık sendromu] ve erkek üreme sağlığında [testisleri korumada (hipertermiden ve reaktif oksijen türlerinden (ROT) spermatogenezi korumada] terapötik etkileri bulunmaktadır [9-11].

Üreme sağlığı vitamini Fertilovit® F35 Plus (FV; Gonodasan AG, Almanya), B vitaminleri (B1, B2, B3, B6, B7, B9, B12), C vitamini, D vitamini E vitamini, çinko, magnezyum, demir, iyot ve koenzim Q10 içeren hamile kalmak isteyen kadınlar için önerilen besin takviyesidir [12]. Bu multivitamin etkisini anti-oksidan mekanizmayı, steroid hormon metabolizmasını ile homosistein metabolizmasını ve tiroid metabolizmasını, hücre büyümesi ve çoğalmasını, kan yapımını ve oksijen taşınmasını, sinir gelişimini ve mitokondri sağlığı üzerinden enerji üretimini aktifleyerek gösterir [12].

GB'nin hücre sayısını azaltıcı kanseri tedavi edici etkisi *in vitro*'da 3 farklı lösemi hücresi (HL-60 [insan akut myeloid lösemi (AML)], L1210 (fare lenfositik lösemi hücresi), bazofilik hücreler) ile yapılan deneyler ile gösterilmiştir [3,13,14]. GB'nin KML tedavisi alanında etkileri üzerine yaptığımız literatür araştırmalar sonucunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrı ayrı bileşenlerinin (C vitamini, E vitamini..), kanser ve antikanser etkileri gösterilse de [15,16] bir bütün olarak MV olan FV'nin kanser ve/veya antikanser etkisi hiçbir çalışmada gösterilmemiştir. Buna ek olarak içerikleri ve etki mekanizmaları (anti-oksidan) benzer GB ile ve FV'nin birarada kullanıldığı kanser dahil olmak üzere hiçbir çalışma da bulunmamaktadır. Yaptığımız bu çalışmadaki hedeflerimiz 1) Fitoterapotik ajan olan GB'nin KML'de etkisini ve etki mekanizmasını araştırmak, 2) Kimyasal multivitamin gıda takviyesi FV'nin KML'de etkilerini ve etki mekanizmasını araştırmak, 3) Kısırlık/üreme sağlığında rahatsızlığı olan ile birlikte eş zamanda kansere yakalanma riski olan (aile öyküsü, çalışma şartları v.b.) ve/veya kansere yakalanmış ve/veya kanser tedavisi bitmiş bireyler için fitoterapotik ajan olan GB gibi yüksek anti-oksidan kapasiteye ve onunla benzer içeriğe sahip bir kimyasal ajan FV'nin yine GB birlikte KML'de uygulanmasının sonuçlarını ve sonuçlarının nedenlerini araştırmaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Lösemi

Kan kanseri olarak da bilinen lösemi, kan ve kemik iliğindeki lökositlerin mutasyon ve/veya epigenetik değişiklikler sonucunda hasarlı olarak meydana gelmesi ve control edilemeyen hızla çoğalması ile oluşan tedaviye rağmen çoğu zaman ölümlü sonuçlanan yaygın görülen bir kanser tipidir (Şekil 1.1). Lösemi vakalarında kemik iliğinde akyuvar oluşum hızı sağlıklı bir kişi ile kıyaslandığında aşırı denebilecek kadar fazladır. Sağlıklı kişilerde, akyuvarlar immün sistemi dirençli hale getirerek hastalıkları önler, fakat lösemi vakalarında görevini yapamayan hasarlı akyuvarların sayısının çok fazla olması hastalık meydana getirir [1]. Kan hücreleri hematopoiezde pluripotent hematopoetik kök hücrelerden köken alır ve olgun periferel kan hücrelerine dönüşür [1,17,18]. Mutasyon ve epigenetik değişikliklerin meydana geldiği kök hücreler de lösemi vakalarının oluşmasında etkilidir (Şekil 1.1) [17,18].

2.1.1 Lösemi çeşitleri

Lösemiler akyuvar hücrelerin tipine göre lenfoid ve myeloid, hastalığın oluşum süresine göre de akut ve kronik olarak kategorize edilir. Löseminin akut tipi, erken evredeki hücrelerden (blast) oluşurken, löseminin kronik tipi (KML) olgun hücrelerden meydana gelir [17]. Akut lösemi hücreleri hızlı gelişir ve çoğalır, buna karşın kronik lösemi hücreleri yavaş gelişim gösterir ve bölünmeyip birikirler [17]. Miyeloid lösemiler (ML) miyeloid hücre hattından meydana gelir. ML'ler kronik myeloid lösemi (KML) ve AML olmak üzere iki grupta sınıflandırılır [17]. Lenfositik lösemi tipinde ise kemik iliğinde bulunan lenfoblastlar veya lenfositlerde sorun olup, bu lösemi tipi de kronik lenfositik lösemi (KLL) ve akut lenfositik lösemi (ALL) olmak üzere iki grup olarak değerlendirilir [17].

2.1.1.1 Kronik myeloid lösemi

Kromozomun 9q34 bölgesinde bulunan ABL geninin ekspresyonu sonucunda 145 kDa ağırlığında ABL proteini oluşur. Tirozin kinaz aktivitesine sahip ABL proteini hücre çoğalması gibi birçok biyolojik aktivitenin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Şekil 1.1). 11 ekzona sahip genin ilk ekzonunda translokasyon, füzyon gibi farklı değişik mutasyonlar gerçekleşir. ABL proteininin yapısında bulunan 3 farklı SRC homoloji alanı (SH1-SH3), proteinin N-terminal ucunda bulunur. SH1 alanı, tirozin kinaz aktivitesine sahip olup SH2 ve SH3 alanları ABL proteinlerinin diğer proteinlerle temasında görev alır. Mutasyon görülmeyen normal ABL proteini hücre döngüsünü, apoptozu, hücre büyüme ve çoğalması ile hücrelerin strese karşı verdiği cevabı düzenler [1,18,19].

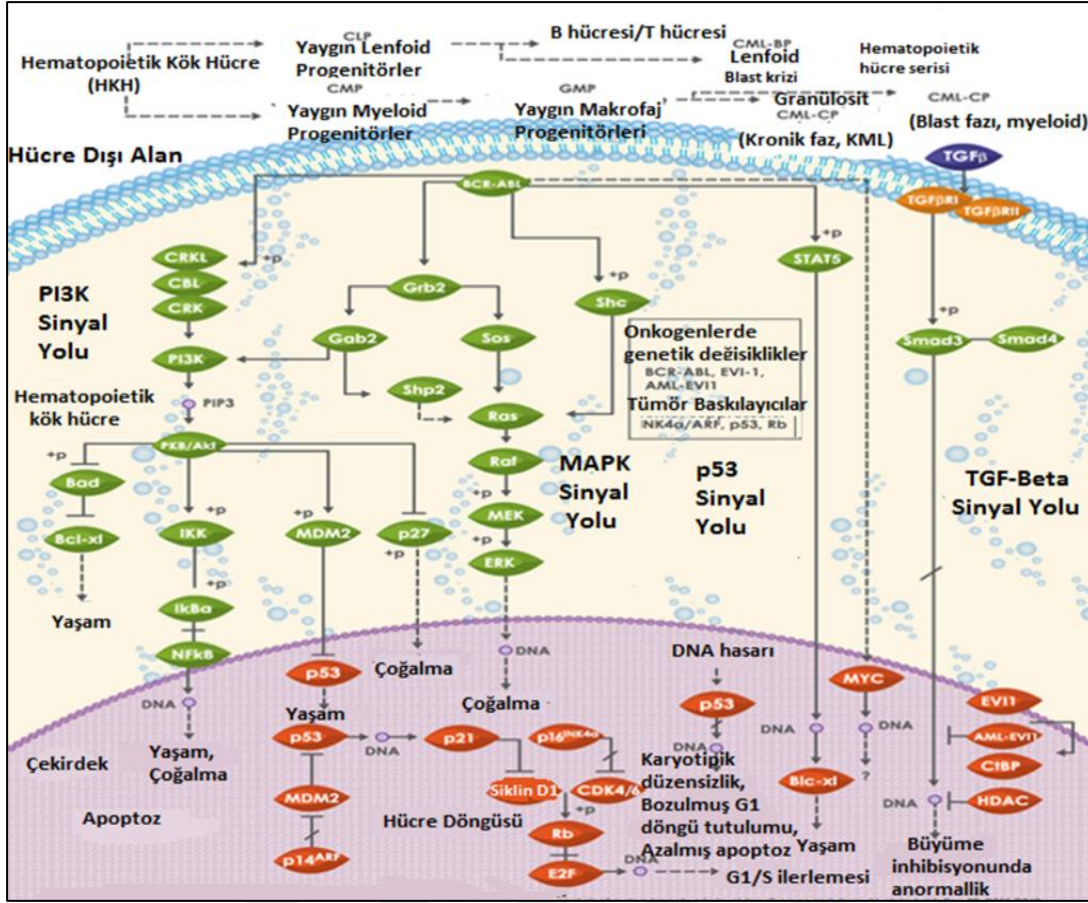
22. kromozomda yer alan BCR geni, 160 kDa ağırlığında BCR proteinin sentezini yapar. BCR proteininin N-terminal ucunda yer alan ilk ekzon, BRCA1 ilişkili protein (Bap)-1 diğer adı ile ubiquitin karboksi-terminal hidrolaz proteininin ve BCR proteinini fosfatlayan serin treonin kinazın sentezinde görev alır. BCR proteininin merkez bölgesinde Rho-Guanidin faktörlerinin bağlanma bölgesi bulunmaktadır ve bu faktörler, Nükleer Faktör kappa B (NF-κB) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda görev alır. BCR proteininin C-terminal ucunda guanozin trifosfataz (GTPaz) aktivitesi görülür. BCR proteini, en fazla 177. tirozin amino asidi kalıntısı olmak üzere diğer birçok tirozin kalıntısından kinazlar aracılığıyla fosfatlanabilir. Bu fosfatlanma sonucunda, BCR'nin çoğalma ve dirençte etkili olan RAS sinyal yolunun aktivasyonunu sağlayan büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein (GRB)-2 proteinine bağlanmasını sağlar [1,18,19].

Çalışmalar 9. kromozomun 9q34 bölgesinde bulunan ABL geninin, 22. kromozoma translokasyon mutasyon çeşidi ile aktarıldığını saptamıştır. 22. kromozomdaki DNA'nın 5-6 kb'lık bir bölümünde kırılma noktaları meydana gelmektedir ve bu noktaya kırılma noktasının kümeleşmiş bölgesi BCR adı verilmiştir. Bu translokasyon ve füzyon sonucunda Philedelphia (Ph) kromozomu oluşur. Bu kromozom oluşurken ABL genindeki kırık genellikle ABL'nin 2 ekzonunun 5' ucunda 300 kb'lık bir bölgede gerçekleşirken, BCR geninde yer alan kırık çeşitli bölgelerde oluşabilir ve değişik büyüklükteki

füzyon tirozin kinaz genlerinin meydana gelişi görülebilir. Mutasyona uğramamış normal c-ABL proteini çekirdekte yer alır ve kinaz aktivitesi hücrenin ihtiyacına göre düzenlenir. BCR-ABL füzyonu sonucunda aşırı sitoplazmik tirozin kinaz aktivitesi görülür. Bu tirozin kinaz aktivitesinin farklılaşma üzerine etkisi olmamasına rağmen myeloid hücrelerin yaşam direncini ve çoğalmasını artırır. [1,18,19].

KML'de progenitör hücrelerin, kemik iliği stroma hücreleri ve ekstraselüler matrikse tutunması zayıflar. Yapılan son çalışmalar, stroma ile progenitör hücreler arasındaki etkileşimde hücre dışından hücre içine sinyal gönderimini başlatan proteinlerin β -integrinler olduğunu saptamıştır. KML hücrelerinin, sağlıklı progenitör hücrelerde bulunmayan β 1-integrin varyantını taşıdığı görülmüştür [1,18]. Hücre dışı alandan tümör büyüme faktörü (TGF)- β ile gelen sinyal SMAD proteinleri ile DNA'ya aktarılır ve büyüme engellenmesinde anormallikler görülür (Şekil 1.1) [1,18].

BCR-ABL onkoproteini, hücre büyümesi ve çoğalmasında etkili yolları [RAS, Janus kinaz/sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktive edicileri (JAK/STAT), fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/Akt), NF- κ B) aktive ederek ekstraselüler matriks ile stroma arasında patolojik bir etkileşime neden olur ve bunun sonucunda apoptoz engellenir, hücre direnci ve aşırı hücre büyüme ve çoğalması görülür (Şekil 2.1) [1,18,19].



Şekil 2.1: KML oluşum mekanizması [19]

2.2 Fitoterapötik Yöntemler

Fitoterapi, “tıbbî bitkilerle tedavi” anlamına gelmektedir. Hastalıkların, tedavi edici değere sahip taze veya kurutulmuş bitki kısımları (drog) ya da bunlardan elde edilen ekstraksiyon ürünleri kullanılarak üretilen çay, damla, draje, kapsül, şurup, tablet ile tedavi edilmesi “fitoterapi” olarak değerlendirilmektedir. Fitoterapi, günümüzde alternatif tıp konuları arasında değerlendirilmekte olup tarih süreci içerisinde birikimi, gelişimi ve uygulanışı ile birçok tıp bilimine öncülük etmiştir. Kronolojik olarak fitoterapi, klasik tıp yöntemleri ve tıp kurallarına karşı bir alternatif değil, aksine diğer tedavi yöntemleri fitoterapiye bir alternatif olarak gelişmişlerdir [2, 20].

Almanya, Fransa, İsviçre gibi ülkelerde bitkisel ilâçları modern tıpla birleştirmek için güçlü bir eğilim vardır. Herbalistler (bitkisel tedavi uzmanları) bitki tedavisinde, sadece etken maddenin izole edilip verilmesini amaçlayan konvansiyonel tedavinin aksine, maksimum etkinin bir bütünsellik içinde ortaya

çıkıldığını, bitkinin tüm bileşenlerinin olumlu etki üzerinde bir payı olduğunu savunmaktadırlar. Onlara göre saflaştırılmamış bitkinin kullanımı, bitkiyi oluşturan maddelerin birbirini nötralize etmesi sebebiyle yan etki olasılığını azaltmaktadır [20].

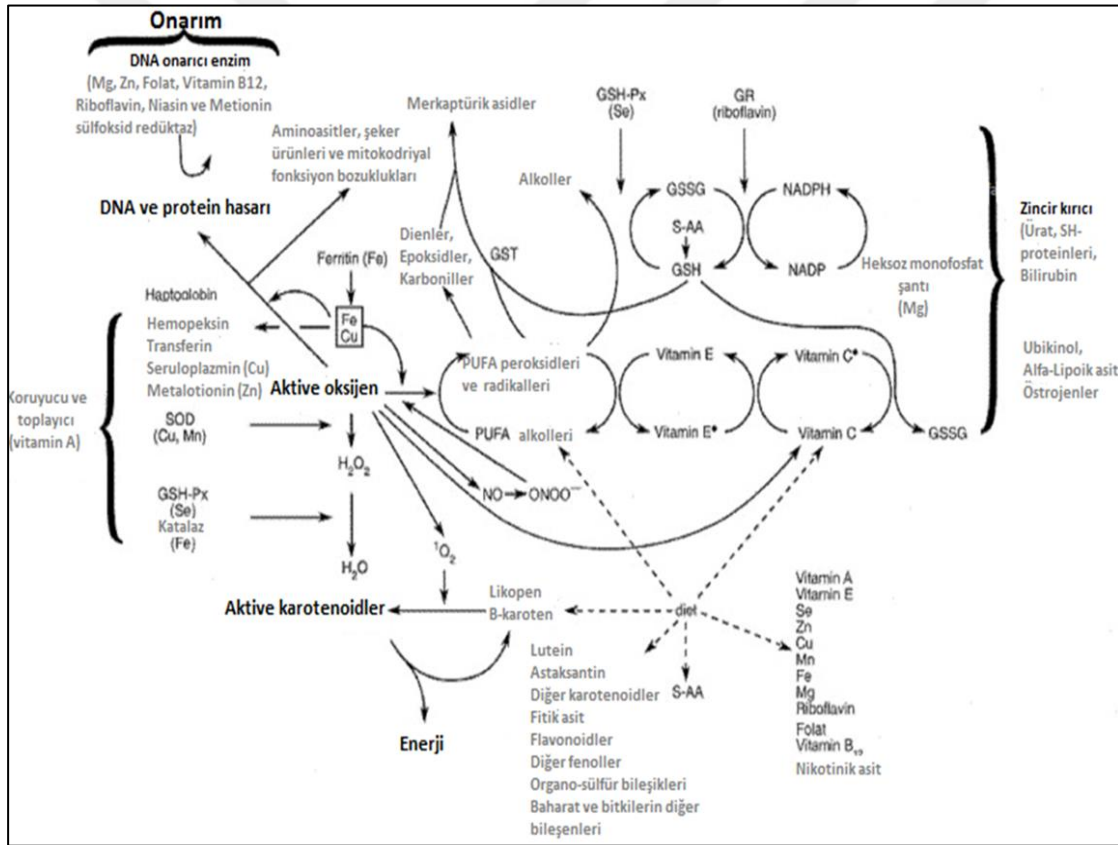
Unutulmamalıdır ki, doğal olan her zaman güvenli demek değildir. Pek çok bitkinin yüksek derecede toksik olduğu, diğer tedavi yöntemleri içinde fitoterapinin (bitkilerle tedavi) yan etki ve toksisite yönünden çok daha fazla risk taşıyabileceği de bildirilmiştir [21]. Tıbbî amaçla kullanılan bitkilerin bir kısmının hepatotoksik olduğu yönünde literatür bilgisi vardır [21]. Ayrıca bilinçsiz fitoterapi uygulaması sonucu zaman zaman ölümle sonuçlanan olgular bildirilmiştir Fitoterapi uygulamasının direkt toksik etkilerinden başka hastanın kullandığı diğer konvansiyonel ilâçlarla toksikolojik etkileşmelerin olabileceği de gösterilmiştir [21].

2.2.1 Goji berry

2.2.1.1 Goji berry içeriği

Dünyada Goji berry ya da wolf berry diye bilinen ancak ülkemizde pek bilinmeyen kurt üzümü “süper meyve” olarak günümüzde telafuz edilmektedir. Asya kaynaklı çoğunlukla Tibet ve Moğolistan’da dünyanın en yüksek dağları olan Himalayalar’da yetişen Goji Berry, dünyadaki besin değeri en yüksek olan meyvelerden biri olup Solanaceae bitkisi Lycium barbarum’dan elde edilmektedir. Goji, su içeriği yüksek ve tatlıdır, tadı yaban mersini ve kirazın arasındadır. Goji üzümü, her türlü toprakta yetiştirilebilmektedir. Genel olarak yarı gölge güneşten hoşlanır. Goji bitkisinin boyu yaklaşık 2.5-3 metre civarında olup, odunsu çalı görünümü vardır. Goji Berry yani kurt üzümü, 2 yaşından sonra meyve vermeye başlar. Beş yaşına gelince de olgunlaşır, güzel meyveler vermeye başlar. Çok kuvvetli bir antioksidan olan bu meyve, Çin’de tıp alanında 2000 yıldır kullanılmaktadır. Meyvelerde bulunan proteoglykanlar GB polisakaritleri (GBP) olarak bilinmekte ve oldukça geniş spektrumlu farmakolojik aktiviteler göstermektedir. Yapraklarından çay yapılarak kullanıldığı gibi kurutulan GB meyveleri de aynı önemde ayrıca besin kaynağıdır [4,5].

GB bir protein deposudur. 19 ayrı aminoasit, %13 protein, yüksek miktarda beta-karoten, 21 iz minerali, çinko, demir, fosfor, % 8 E vitamini (tokoferol), Zeaksantin, Germanyum, Karotenoidler, Beta Sitosterol, Siperon, Solavetivon, Fizalin, Betain, Lutein, Likopen, Polisakkaritler (iç özünün %30' u), yüksek oranda C vitamini, yağ asitleri ve peptidoglikanları içerir [4,5]. Meyvenin 500 mg lipolisakkarit ekstraktının antioksidan aktivitesi, 500 mg C vitamininden bile daha fazladır [4,5]. Yaşlılıkta kalp, beyin ve karaciğer gibi organlarda azalan antioksidan kapasiteyi bu sayede artıran GB meyvesinin yaşlanma karşıtı etkisinden faydalanılmaktadır [22]. Günde 120 ml GB meyve suyunun bir ay tüketilmesi ile Şekil 2.2'de gösterilen vücudun antioksidan kapasitesinde belirgin bir artış olmaktadır [23].



Şekil 2.2: Oksidan-Antioksidan Sistem

Antioksidan savunma mekanizmaları. İnsan vücudundaki antioksidan sisteme genel bir bakış. Çeşitli antioksidan sistemleri, farklı etkilere yanıt olarak zamanla ortaya çıkmıştır. Aynı amaçla farklı formlar geliştirilmiştir, örneğin SOD'lar, peroksidazlar ve GPx antioksidan enzim grubunun önemli üyeleridir. Antioksidan ağının temsilcileri olan tokoferoller ve askorbik asit, yalnızca

bitkilerde üretilir ancak hayvanlar tarafından ihtiyaç duyulmaktadır. Askorbik asit, önemli bir antioksidandır, ancak insanlar tarafından sentez edilemez. Bu nedenle, insanlarda, toksik oksijen ara ürünlerine karşı antioksidan savunma, beslenme ile yoğun şekilde etkilenen karmaşık bir ağı içermektedir [23]. GR, glutatyon redüktaz; GSG, indirgenmiş glutatyon; GSH-Px, glutatyon peroksidaz; GSSG, okside glutatyon; GST, glutatyon-S-transferaz; MSR, metiyonin sülfoksid redüktaz; PUFA, çoklu doymamış yağ asitleri; S-AA, kükürt amino asitler; SH-proteinleri, sülfidril proteinleri; SOD, süperoksit dismutaz; Fe Cu, geçiş metali katalizli oksidan hasarı [23].

2.2.1.2 Goji Berry'nin Faydaları

Goji berry'nin faydaları aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

1. GB'deki ana molekül olan polisakkaritler hasarlı DNA'nın tamiri ve restorasyonunu gerçekleştirir [24].
2. Antioksidan oranı en yüksek bitkilerden biri olması nedeniyle güçlü bir antioksidan kaynak besindir. Portakalın içindeki C vitamininin yüzlerce kat fazlasını barındırması nedeniyle, C vitamini içeren besinlerin en baştakilerden biridir. % 8 oranında E ve B vitaminlerini içerir. Çinko, kalsiyum, selenyum, fosfor vb. mineraller bakımından oldukça zengindir [4-7]. Hastalıklara karşı direnç artırıcıdır. Serbest radikallerden olan süperoksitin hastalıkların oluşumu ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [5-7]. Süperoksit vücutta bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi sayesinde etkisiz hale getirilir. Ancak bu enzim yaş ile birlikte azalmaya başlar. GB alımının SOD enzimi ile birlikte diğer antioksidan enzim değerlerini artırdığı ispatlanmıştır [25].
3. Yüksek protein içeriği ile oldukça besleyicidir, içerdiği protein kepekli buğdayda bulunandan bile daha fazladır [4-7].
4. Güçlü bir anti-mikrobiaaldir [26].
5. GB çok bilinen bir hepatoprotektandır [27,28].
6. Menapoz semptomlarını yok edici etkisi bulunmaktadır [2].
7. GB'nin ayrıca kadın üreme sağlığında [hiperandrogenizm, polikistik yumurtalık sendromu] ve erkek üreme sağlığında [testisleri korumada (hipertermiden ve ROT) spermatogenezi korumada] terapötik etkileri bulunmaktadır [9-11].

8. Beta karoten kaynağı olarak havuçtan daha güçlüdür. Göz retinasında bulunan maddelerden biri olan Zeaksantin içermesi nedeniyle, göz sağlığı için oldukça faydalıdır [29]. Glokom, iskemi/reperfüzyon, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, retinitis pigmentosa ve diyabetik retinopati gibi çeşitli retinal hastalıklarda GBP tedavisi uygulanmaktadır [29].
9. GB, kolesterol, trigliserid seviyelerini düşüren beta-sitosterol maddesi içerir. Ayrıca antioksidanları sayesinde kolesterolün oksidasyonunu ve damar duvarında plak oluşturmasını engeller. GB içerisindeki flavonoidler ise atar damarlarınızın açık kalmasını ve esnekliğinin korunmasını sağlar. GB bir seskuiterpen olan ve kalp ile kan basıncı ayarlamalarına yardımcı olan siperon içerir. Antosiyanin maddesi ise kalp damarlarının dayanıklılığını artırır. Düzenli kullanımında kalp ve kan basıncına yararları olduğu gözlenmiştir [30].
10. Uzun yıllardır Çin’de tip 2 (erişkin tip) diyabet tedavisinde kullanılan GB’nin polisakkaritleri sayesinde kan şekerini ve insülin cevabını düzenlediği görülmüştür [31].
11. Asya’da yapılan bir anti-obesite (aşırı şişmanlık) çalışmasında, hastalara sabah ve öğleden sonra GB verilmiştir. Sonuçlar çoğu hastanın belirgin kilo vermesi şeklinde olmuştur. Bir başka çalışma ise GB içerisindeki polisakkaritlerin alınan gıdaları yağ şeklinde depolanması yerine enerjiye dönüştürdüğünü göstermektedir [5, 32].
12. GB’nin lösemi de dahil olmak üzere birçok kanser tipi için tedavi edici, tedavi yan etkilerini azaltıcı ve birçok kanser terapisinin tedavi edici etkilerini artırma (sinerjistik veya aditif etki) gibi görevleri de bulunmaktadır [3,5-8]. Kanseri önleyici ve tedavi edici etkilerini anti-oksidan mekanizma, apoptoz, hücre döngüsü tutulumu ve immünomodülasyon yolu ile gösterir [3, 5-8].

2.3 Multivitaminler

Multivitaminler (MV'ler) yeteri kadar beslenme alımını sağlamak, yaşlanmanın ve kanserin önlenmesi gibi riskler için düzenli olarak kullanılmaya teşvik edilen vitamin ve/veya mineral bileşikleridir. Bununla birlikte, MV’ler ile ilişkili riskler nadiren belirtilmiştir. Genellikle güvenli olarak kabul edilmesine

rağmen, vitamin takviyeleri zararlı etkilere de sahip olabilir ve kullanımını önermek için destekleyici bir neden bulunması gerekir [33].

D vitamin desteği kalsiyum ile birlikte kemik erimesi gibi vakalarda sıklıkla önerilir. Yapılan çalışmalar, D vitamininin melanom nüksü için koruyucu bir role sahip olduğunu ve daha yüksek dozda vitamin D'nin daha ince primer melanomlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. British Skin Foundation tarafından yapılan bir araştırmada, görmede etkili olan A vitamininin, melatomada genel sağ kalım açısından D vitamini koruyucu etkisini azaltabileceğini göstermiştir [16]. Sonuç olarak, MV preparatları yerine tek başına D3 vitamini alımının tercih edilmesi önerilmiştir [16]. Buna ek olarak, D vitamininin daha az agresif primer melanomlarla ilişkili olduğu ve kendisinin de tedavi sonucunun başarısını artırabileceğini bu çalışma sonucunda belirtilmiştir [16].

Down sendromlu (DS) çocuklarda bilişsel yeteneklerin iyileştirilmesi ile immün veya tiroid fonksiyonlarının iyileştirilmesi için vitamin takviyeleri önerilmiştir [15]. Birçok yeni araştırma bu popülasyondaki düşük çinko düzeylerini sağlıklı gruplarla karşılaştırarak göstermiştir ki DS'li çocukların yaşamın ilk 5 yılı boyunca akut lösemi geliştirme riski 50 kat fazladır. Bu verilere dayanarak yapılan bir vaka kontrol çalışmasında [15], çocuk vitaminleri ile bitki desteği kullanımı arasındaki ilişkiyi ve lösemi riskini araştırıldı ve DS'li 158 çocuk ve 0-18 yaş arası akut lenfoblastik lösemi (ALL) veya AML ile çalışıldı. Bu çalışmada çocukların ilk MV, çinko, vitamin C, demir ve bitkisel takviyeleri kullanımları, bunların sıklığı ve süreleri hakkında bilgi alınarak değerlendirme yapıldı. Çocukların düzenli MV kullanımı ile ALL veya AML arasında bir ilişki bulgusu bulunmadığı saptanmıştır [15]. Yaşamın ilk yılında veya uzun süre MV kullanımı ile ilişkili AML riski artışına dair bazı veriler olmasına rağmen, örneklem büyüklüğü küçük olduğu için beslenme durumu ile çocukluk lösemi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için bu önerinin şüpheli olduğu sonucuna varılmıştır [15].

Hardry ve arkadaşları, bireysel vitamin içeren takviyelerin, birkaç seçkin vitamin kombinasyonunun veya multivitamin minerallerin (MVM) etkilerinin değerlendirilmesi için birkaç randomize, kontrollü çalışma içeren Hekimlerin Sağlık Çalışması II'ye (PHS II) ait sonuçları gözden geçirdi [34]. PHS II'de ortalama 11 yıllık bir süre için günlük MVM takviyesi alan sağlıklı, orta yaşlı

erkeklerle (ortalama yaş 64) randomize bir çalışma yapılmıştır [34]. Bu çalışma sonucunda MVM alan erkeklerin toplam kanser insidansında istatistiksel olarak % 8'lik bir azalma olduğu ve plaseboya göre kıyaslandığında kanser öyküsü olan erkeklerde MVM takviyesi alınması ile kanser insidansının % 27 daha düşük olduğu bulunmuştur [14]. PHS II'nin pozitif sonuçlarının, çoğunlukla nötr etki gösteren ve bazen de kanser riskinde olumsuz bir etkiye sahip olan tek başına vitamin kullanımının veya bunların küçük kombinasyonlarının kullanıldığı randomize çalışmalarla ters düştüğü görülmüştür [34].

2.3.1 Fertilovit® F 35 Plus

Yeni piyasaya sürülen bir multivitamin olan Fertilovit® F 35 Plus (FV, Gonadosan, Almanya), hamile kalmayı planlayan olgun kadınların gereksinimlerini karşılamak için özel olarak tasarlanmış bir diyet takviyesidir. FV demir sitrat, koenzim Q10, nikotinamid, D-alfa-tokoferil asetat, kalsiyum-D-pantotenat, çinko oksit, piridoksin HC1, tiamin HC1, riboflavin, pteroil monoglutamik asit, potasyum iyodür, biyotin, kolkalsiferol, siyanokobalamin, askorbik asit, folik asit içermektedir. Gebelik planlayan olgun kadınların antioksidan ve mitokondriyal sağlık desteğini karşılamaktadır [12].

Folik asit, B vitaminlerinden biridir (B9), sebzeler ve meyvelerde bol miktarda bulunur. Ancak, ısıya ve ışığa karşı çok hassastır. Hücre bölünmesi (DNA ve RNA sentezi) ve büyümesi için öneminin yanı sıra kan yapımında da önemli olması onu hamilelik planlayan bayanlar için tasarlanan takviyelerde gerekli kılmıştır. B6 (piridoksin) ve B12 (kobalamin) vitaminleri gibi diğer B vitaminleri de hücre bölünmesi ve sağlıklı homosistein metabolizması için gereklidir. B5 vitamini (pantotenik asit) seks hormonlarının da dahil olduğu steroid hormon metabolizması için gereklidir [35]. Demir, iyot ve antioksidanlar gibi diğer yaşam bileşenleri hamilelik öncesi ve erken hamilelikte vücudu desteklemektedir. Demir kanda oksijen taşınması ve iyot sağlıklı tiroid fonksiyonu için gerekliken E ve C vitaminleri DNA'yı, proteinleri ve yağları oksidatif stressden korur [35, 36]. En iyi etkiyi sağlamak için FV'nin sürekli ve uzun süreli salınımlı C vitamini içermesi formülüzasyonunda sağlanmıştır [12].

Oksidatif stres terimi, ROT tarafından vücut hücrelerinin bozulması olarak tanımlanır. Vücudun koruyucu antioksidan sistemi tarafından engellenir.

Bununla birlikte, çok fazla ROT veya çok az antioksidan ortamda olursa oksidan-antioksidan sistem arasındaki denge bozulur ve tüm vücut hücreleri zarar görür. Oositler özellikle ROT saldırılarına duyarlıdır ve yaşa bağlı doğurganlığın azalmasında oksidatif stresin de büyük bir rolünün olduğu düşünülmektedir [37].

Hamileliği planlayan olgun kadınlar için Koenzim Q10 gibi mitokondrial besinler yararlanması şarttır. Bu mikrobeyin, oositlerde özellikle bol miktarda bulunan hücresel organeller olan mitokondrinin enerji üretiminde görev alır ki oositler olgunlaşırken ve erken hamilelik dönemi için çok fazla enerjiye ihtiyaç vardır [38]. Bu nedenle antioksidanlar yanında mitokondri sağlığı için Koenzim Q10'da içerecek şekilde FV içeriğinin oluşturulduğu görülmüştür.

GB'nin hücre sayısını azaltıcı kanseri tedavi edici etkisi in vitro'da 3 farklı lösemi hücresi (HL-60 [insan akut myeloid lösemi (AML)], L1210 (fare lenfositik lösemi hücresi), bazofilik hücreler) ile yapılan deneyler ile gösterilmiştir [3,13,14]. GB'nin KML kanser tipi üzerine etkisi ve diğer kanser türlerinin yanı sıra lösemi tedavisinde FV'nin etkisi üzerine herhangi bir çalışma bulunamadı.



3 MATERYAL ve METOD

Bu çalışma in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup Gojiberry [Lycium barbarum (L. Barbarum); kurt üzümü] meyvesi ekstraktlarının eldesi İstanbul Üniversitesi (İ.Ü) Eczacılık Fakóltesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda, GB ekstratının antioksidan kapasite tayini (Fenolik bileşikler, Flavonoidler) İ.Ü. Eczacılık Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, hücre kültürü deneyleri ve flow sitometri ile hücre ölümü analizleri İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (ASDETAE) İmmunoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda, Enzim bağlantılı immünosorbent test (ELIZA) deneyleri gerçekteştirildi.

3.1 Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal Ve Sarf Malzemeler

Kullanılan Multivitamin

1. Fertilovit ® F35 Plus (Gonadosan AG, Almanya)

Kullanılan Hücre Hattı

1. K562 KML hücresi (ATCC ® CCL-243™)

Kullanılan Cihazlar

1. Laminar akım hücre kültür kabini (CESNA)
2. İnkübatör (THERMO)
3. Santrifüj (VWR)
4. Akım Sitometri Cihazı (Becton Dickinson)
5. ELIZA okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis)
6. Orbital sallayıcı (Orbital Shaker-Stuart, SSL1)
7. Derin dondurucu (Thermo, Bosch)
8. Karıştırıcı (İka)
9. Rotavapor (Buchi R-210)
10. Buzdolabı (Arçelik)

11. Distile su cihazı (Labconco)
12. pH metre (Radiometer PHM 92)
13. Hassas terazi (AND HM 200)
14. Işık mikroskobu (Olympos)

Kullanılan Kimyasallar

1. Fötal Sığır Serumı (Sigma-Aldrich 12106C, St. Louis, MO, USA)
2. Anti-mikoplazma solüsyonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
3. Antimikotik-antibiyotik (Sigma-Aldrich A5955, St. Louis, MO, USA)
4. Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich 4333, St. Louis, MO, USA)
5. Sodyum piruvat solüsyonu (Sigma-Aldrich S8636, St. Louis, MO, USA)
6. Dondurma medyumu (Sigma-Aldrich C616, St. Louis, MO, USA)
7. Kültür medyumu (Gibco 11875085)
8. Petrol eteri (Merck Chemicals 1.01775.5000, Damstadt, Germany)
9. Kloroform (Sigma-Aldrich 34854, St. Louis, MO, USA)
10. Metanol (Sigma-Aldrich 34885, St. Louis, MO, USA)
11. Sodyum karbonat (Merck 106398)
12. Sodyum wolframmat (Merck 106672)
13. Sodyum molibdat (Merck 386521)
14. %85'lik fosforik asid (Merck 100564)
15. derişik hidroklorik asid (Merck 100314)
16. Lityum sülfat (Merck 105694)
17. Brom (Merck 101945)
18. Gallik asid (Sigma G7384)
19. Sodyum nitrit (Merck 106544)
20. Alüminyum klorür (Merck 101083)
21. Sodyum hidroksit (Merck 106462)
22. Kateşin (Fluka 22110)

23. Etanol (Merck 100983)

24. CHAPS hücre parçalayıcı solüsyon (Invitrogen ZC10003)

25. Dimetil sülfoksit (DMSO)-Hybri-Max™ (Sigma-Aldrich D2650)

Kullanılan Sarf Malzemeler

1. İnsert (ThinCert™-Greiner Bioone 657640, Bioone 662640)
2. Pipet uçları (Eppendorf)
3. DNA saklama kabı (Cryotechnics 5400948)
4. Enjektör (5 cc, 10 cc ve 50 ml'lik; Set Inject)
5. Enjektör filtre (TPP 99722)
6. Kriyo tüp 2 ml (TPP 89020)
7. 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik hücre kültür flaskı (TPP 90075, TPP 90025)
8. 6 ve 24 kuyucuklu steril hücre kültür kabı (TPP 92006, TPP 92024)
9. 5 ml'lik ve 10 ml'lik tek kullanımlık steril pipet (TPP 94010, TPP 94005)
10. 3.0 ml'lik tek kullanımlık pasteur pipeti (LP Italiana 135138)
11. 15 ml'lik ve 50 ml'lik santrifüj tüpü (TPP 91015, TPP 91050)

Apoptotik ve anti-apoptotik protein seviyelerin saptanmasında kullanılan kitleler

1. Hücre ölümü saptama kiti (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen-556570)
2. Kaspaz-3 seviyesi saptama kiti (Sigma-Aldrich CASP-3C)
3. Kaspaz-8 seviyesi saptama kiti (USCN SEA853Hu)
4. Kaspaz-9 seviyesi saptama kiti (USCN SEA627Hu)
5. Bcl-2 seviyesi saptama kiti (USCN SEA778Hu)
6. Bax seviyesi saptama kiti (USCN SEB343Hu)
7. Midkin seviyesi saptama kiti (USCN SEA631Hu)
8. Nf-kappaB seviyesi saptama kiti (USCNSEB824Hu)
9. RIPK-1 seviyesi saptama kiti (MBS2022046)

3.2 Goji Berry

Bu çalışmada kullanılan GB'nin meyveleri Çin'de üretilmiş ve ticari bir web sitesi üzerinden alındı. Alınan ürünün İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda GB olduğu onaylandıktan sonra bitki ekstraktları hazırlandı.

3.3 Gojiberry Ekstraktının Hazırlanması

GB meyveleri aktif bileşenlerin ısı ile bozulmaması için steril ortamda ve karanlıkta 30 gün boyunca kurutularak ufak parçalara ayrıldı. 30 g GB meyve parçaları metanol (100 ml), petrol eteri (30 ml) ve kloroform (50 ml) ile yaklaşık olarak 24 saat Soxhlet cihazında reflüks yapıldı. Bunun sonucunda alınan karışım rotaevaporatöre kondu ve metanol, petrol eteri ve kloroform ekstreden uzaklaştırıldı. Ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) saptandı. Bundan sonra, ekstre hemen deneylerde kullanılmayacağı için küçük flakonlara konularak -20°C’de saklandı [39].

3.4 Antioksidan Kapasite Tayini Deneyleri

3.4.1 Total Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Metanol ile elde edilen ekstrelerin total fenolik bileşik miktarı, Slinkard ve Singleton metodunda değiştirilerek, Folin-Ciocalteu ayıracı kullanılarak kolorimetrik olarak saptandı [39]. Tüplere ekstreler 40 mg/mL olacak kondu ve 20 saniye banyoda (ultrasonik) tutularak çözüldü. Ekstreler belirli çözücüler kullanılarak belirli oran dilimlerinde (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) seyreltildi ve deneylerde kullanıldı.

8 µL farklı konsantrasyonlardaki ekstreler mikropalkanın kuyucuklarına kondu ve üzerine 260 µL distile su eklendi, 8 µL Folin-Ciocalteu ayıracı ve 24 µL % 2’lik sodyum karbonat çözeltisinden eklendi. Mikroplaka karanlıkta 2 saat kadar tutulduktan sonra konsantrasyona bağlı oluşan mavi rengin absorbansı, köre (distile su) karşı, 760 nm’de ELIZA mikropalaka okuyucuda ölçüldü ve raporlandı [39].

Sonuçlar gallik asid standart eğri denklemi kullanılarak “mg gallik asid ekivalanları/g meyve” olarak ifade edildi. Sonuçlar, ayrıca “mg gallik asid ekivalanları/g kuru meyve ağırlığı (DW)” olarak da hesaplandı. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları hesaplandı [39].

3.4.2 Total Flavonoid Miktar Tayini

Metanollü ekstrelerin total flavonoid miktarları Kim ve arkadaşları (2003) tarafından bulunan standart kalorimetrik metod değişiklikler yapılarak saptandı [39].

Ekstreler 40 mg/mL konsantrasyonda tüplere kondu ve banyoda (ultrasonik) 20 saniye süresince tutularak çözüldü. Uygun çözücüler kullanılarak seyreltilmiş çözeltilerle (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) deneyler gerçekleştirildi [39].

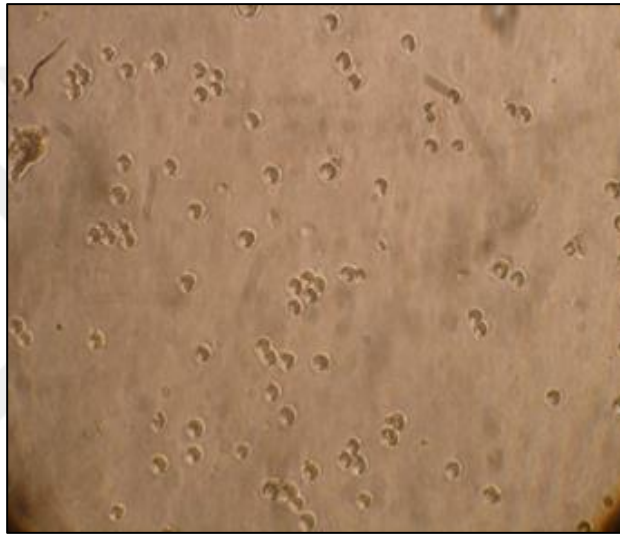
25 µL ekstre ve standartlar (kateşin çözeltileri) üzerine 125 µL distile su ilave edildi. 7.5 µL % 5'lik sodyum nitrit (5 dakika tutuldu), 15 µL % 10'luk alüminyum triklorür (5 dakika tutuldu) ve en son karışıma 50 µL 1 M sodyum hidroksid eklendi. Son elde edilen karışıma, 27.5 µL distile su eklendi ve karıştırıldı [42]. Oluşan rengin absorbansı 510 nm'de distile su olarak tayin edilen ayıraç körüne karşı ölçüldü ve raporlandı. Sonuçlar kateşin standart eğri denklemi kullanılarak mg kateşin ekivalanları/g meyve olarak ifade edildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve aritmetik ortalamaları hesaplandı [39].

3.5 Multivitamin

Deneyde kullanılan 35 yaş ve sonrasındaki kadınların üreme sağlığı için tercih edilen hamilelik öncesi (prekonsepsiyonel) gıda takviyesi Fertilovit ® F35 Plus (Gonadosan AG, Almanya) gluten, laktoz ve jelatin içermemekle birlikte 1 kapsül 8.5 g olup 100 mg Vitamin C [Askorbik asit; Beslenme referans değeri (NRV): % 125], 20 mg Vitamin E (Tokoferol; NRV: % 166), 3 mg Vitamin B1 (Tiamin; NRV: % 272), 3 mg Vitamin B2 (Riboflavin; NRV: % 214), 12 mg Vitamin B5 (Pantotenik asit; NRV: % 200), 4 mg Vitamin B6 (NRV: % 285), 7 µg Vitamin B12 (Kobalamin; NRV: % 280), 800 µg Vitamin B9 (Folik asit; NRV: % 400), 5 µg Vitamin D (Kolekalsiferol; NRV: % 100), 35 mg Vitamin B3 (Niasin; NRV: % 218), 200 µg Vitamin H (Biotin; NRV: % 400), 5 mg Çinko (NRV: % 50), 100 mg Magnezyum (NRV: % 26), 150 µg İodin (NRV: % 100), 7.5 mg Demir (NRV: % 54) ve 35 mg Koenzim Q10 içermektedir.

3.6 Tek Tabakalı Hücre Kültürü

K562 insan KML hücre hattı (ATCC® CCL-243™) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından (Manassas, VA, A.B.D) alındı. KML hücre hattını üretmek için kullanılan medyum 1% antibiyotik-antimikotik solüsyonu, 1.0 mM sodyum piruvat, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, ısı ile inaktive edilmiş % 10 fötal sığır serumu (FBS) eklenmiş RPMI-1640'dır (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Hücreler bu medyumu içeren hücre kaplarında (25 cm² ve 75 cm²'lik flask) 37 °C sıcaklıktaki, % 5 CO₂ içeren nemli inkübatör içinde çoğaltıldı (Şekil 3.1) [40].



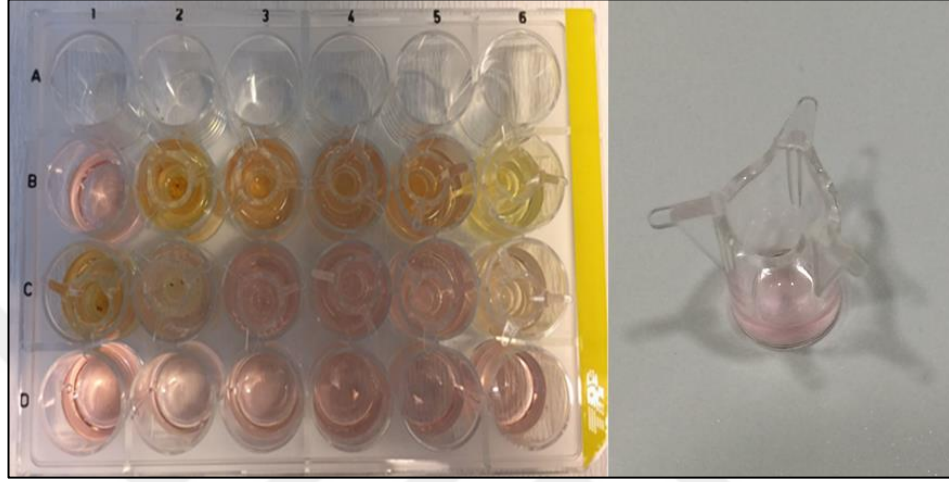
Şekil 3.1: K562 lösemi hücreleri (Orijinal büyütme x30)

3.7 Tek Tabakalı Hücre Kültürü ile Yapılan Deneyler

3×10^5 KML hücresi 72 saat boyunca test materyalleri uygulanması için 3 ml RPMI-1640 medyum bulunan 3 kuyucuğa ekildi ve inkübatörde stres uzaklaşması için tutuldu. GB ve FV ayrı ayrı ve birarada hücrelere uygulandı (Şekil 3.2). Deney grupları aşağıdaki gibi belirlendi:

1. Kontrol grubu (Distile su uygulanan grup)
2. GB grubu
3. FV grubu
4. Kombinasyon grubu (Tekli uygulamaların birlikte kullanımı)

Bu grupların etkileri, hücre proliferasyon indeksi (toplam hücre sayısı), canlı/ölü/apoptotik hücre oranları [Flow sitometri ile Anneksin-V-Fluoresan isotiyosiyanat/propidyum iodid (Anneksin-V-FITC/PI) ikili boyaması], apoptotik (Kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, bax)/nekroapoptotik (RIPK-1) proteinlerin seviyeleri ve anti-apoptotik/direnç proteinlerin seviyeleri [bcl-2, NF-kB, midkin (MK)] (ELIZA yöntemi) ile araştırıldı.



Şekil 3.2: Tek tabakalı hücre kültürü.

GB ve FV insertler kullanılarak KML hücrelerine 72 saat boyunca uygulandı.

3.8 Hücre Proliferasyon İndeksi

Hücre proliferasyon indeksi deneyleri için 5×10^5 K562 hücresi 72 saat için 5'er ml RPMI-1640 medyumunu bulunan 3 kuyuya ekildi ve inkübatörde bekletildi. Total hücre sayısı PI boyaması temeline dayanan ve liziz solüsyonu, stabilizasyon tamponu ve nükleokasetler içeren kit (A starter kit; ChemoMetec A/S, Allerod, Denmark) yardımı ile otomatik hücre sayıcı kullanılarak saptandı. 24. ve 72. saatlerde K562 hücreleri toplandı. Hücrelere liziz solüsyonu ve stabilizasyon tamponu eklendi ve hücreler 5-8 dakika bu çözeltiler içinde tutuldu. Bunun sonucunda hücreler küme halinden çıkartılarak tek hale getirilip parçalandı. Parçalanmış hücreler PI kaplanmış olan nükleokasetlere aktarıldı ve hücre çekirdekleri PI ile boyandı. Hücre sayıcıda 30-35 saniye içinde PI floresansına bakılarak hücreler sayıldı, cihaza özel bir yazılım programı kullanılarak analiz edildi ve raporlandı [41].

3.9 Canlılık ve Apoptoz Tayini

Canlılık ve apoptoz tayinlerinin flow sitometri ile tespiti için deney prensibinde Anneksin-V-FITC ve PI ikili boyaması bulunan ticari kitin uygulama talimatları bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı [41]. Deneyleerde 3×10^5 K562 hücresi 24. ve 72. saatler için 3'er ml RPMI-1640 medyumunu bulunan 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatörde bekletildi. 24. ve 72. saatlerde hücreler sayıldı, yıkandı ve içinde 0.01 M HEPES, 0.14 mM sodyum klorür, 2.5 mM kalsiyum klorür içeren bağlama tamponu ile süspanse edildi. Bu süspanسیونuna (1×10^5 hücre/100 µl bağlama solüsyonu) 5 µl FITC-etiketli Anneksin V-FITC ve PI konarak oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika bekletildi. Sonra Anneksin-V-FITC ve PI ile verdiği floresans flow sitometri ile ölçüldü, ölçümler CellQuest ve WinMDI programları kullanılarak değerlendirildi.

3.10 Apoptotik, Nekroapoptotik ve Anti-Apoptotik Protein Miktar Tayini

3.10.1 Protein Konsantrasyonlarının Saptanması

Örneklerin protein konsantrasyonlarının tayini için Biçinkromik Asit (BCA) yöntemi kullanıldı [41,42]. Deney ayıracı oranı 1:8 ve protein konsantrasyonu çalışma aralığı 20-2000 µg/ml olarak saptandı. Standartlar sığır serum albumin (BSA) ile hazırlandı. Mikroplaka yönteminde 96 kuyucuklu mikroplaka kullanıldı.

Kuyulara 25 µL örneklerden ve standartlardan yerleştirildi. Çalışma solüsyonu, 50 kısım çalışma çözeltisi A (0.1 M sodyum hidroksit içinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkromik asit, sodyum tartarat) ve 1 kısım çalışma çözeltisi B % 4 (bakır sülfat) karıştırılarak hazırlandı. Her kuyuya 200 µl çalışma solüsyonu ilave edildi ve 37 °C'de 30 dakika reaksiyona girmesi için bekletildi. Absorbans değerleri (A) 540 nm dalga boyunda ölçüldü ve kaydedildi. Örneklerin protein konsantrasyonları BSA standart eğri grafiği kullanılarak saptandı.

3.10.1.1 Kaspaz-3 Düzeyleri

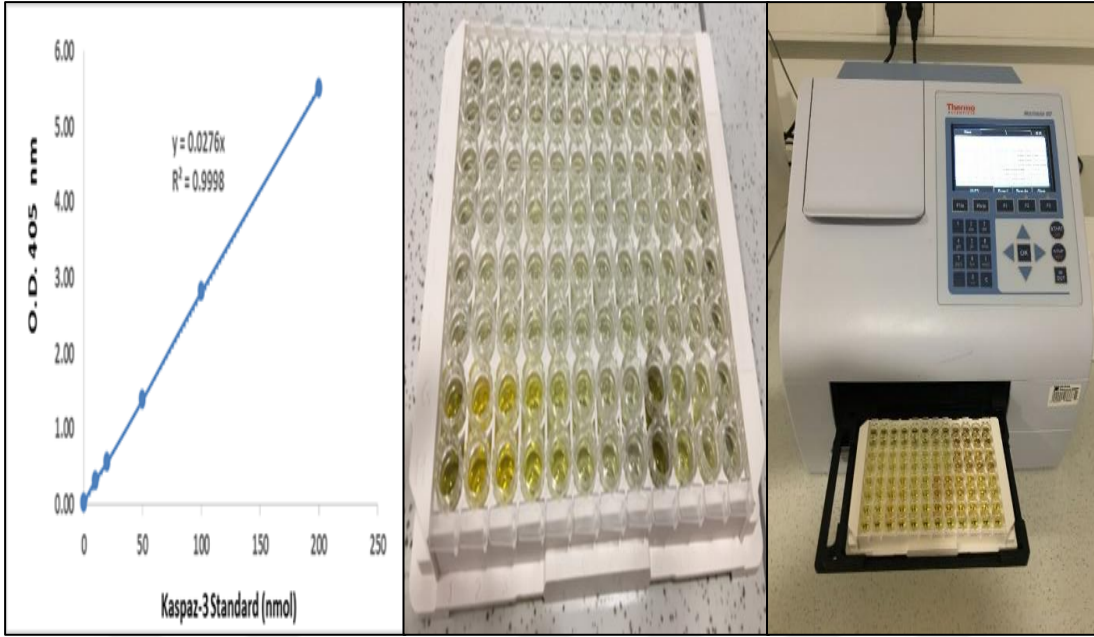
Kaspaz-3 seviyelerini araştırmak için ticari kitin deney kuralları değişiklikler uygulandı [41,42]. Kaspaz-3 enziminin kaspaz-3 peptid substratı olan asetil-

Asp-Glu-Val-Asp nitroanilidini (Ac-DEVD-pNA) hidroliz etmesi sonucunda açığa çıkan p-nitroanilininin (pNA) kolorimetrik olarak ölçülmesi ile kaspaz-3 seviyeleri değişiklikleri saptandı. Örneklerden 5 µl 96'lık mikropalakaların kuyularına kondu ve sonra 85 µl 1x deney tamponu (200 mM HEPES (pH:7.4), % 1 CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA) eklendi. Bir sonraki aşamada 10 µl hacimde 2mM Ac-DEVD-pNA kondu. p-NA'den deney tamponu ile 10 µM'den 200 µM'a kadar çeşitli konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Herbir örneğin bulunduğu kuyucuklara 100 µl bu p-NA standartlarından eklendi. Tüm absorbans ölçümleri, 2-5 dakikada 405 nmde ELIZA okuyucuda yapıldı ve kaydedildi. pNA kalibrasyon denklemleri kullanılarak absorbanslar konsantrasyon (µmol) cinsine dönüştürüldü.

3.10.1.2 Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, MK, RIPK-1 ve NF-kB Düzeyleri

Bu proteinlerin seviyelerini araştırmak için ticari kitin deney kuralları değişiklikler uygulandı [42,43]. Protein standartları ve örnekler Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, RIPK-1 ve nf-kappaB kaplanmış olan 96'lık mikropalaka kuyucuklarına 100 µl hacimde kondu ve 90 dakika 37 °C'de bekletildi. MK seviye tespiti için MK kaplı kuyulara, 100 µl medyum kondu ve 2 saat 37 °C'de bekletildi. Standartlar konsantrasyon aralığı Kaspaz-8'de 0-40 ng/ml, Kaspaz-9'da 0-20 ng/ml, Bcl-2'de 0-100 ng/ml, Bax'da 0-25ng/ml, nf-kappaB'de 0-10 ng/ml, MK'da 0-10 ng/ml ve RIPK-1'de 0-10 ng/ml olacak şekilde hazırlandı (Şekil 3.3a).

Kuyulara primer antikoru içeren saptama solüsyonu A 100 µl eklendi ve 1 saat 37 °C'de tutuldu. Bundan sonraki aşamada, sekonder antikoru ve buna bağlı streptavidin bağlı yaban turpu peroksidazı (HRP) içeren 100 µl saptama solüsyonu B eklendi ve 40 dakika 37 °C'de tutuldu. 90 µl 3,3',5,5;-tetrametilbenzidin (TMB) kromojen substratı eklenerek karanlıkta 37 °C'de tutuldu ve 10-20 dakika içinde bazı kuyularda pozitif reaksiyon olduğunu gösteren konsantrasyona göre değişen mavi renk saptandı. Reaksiyonu sonlandırmak için 50 µl durdurucu (stop) solüsyon ilave edildi. Bunun göstergesi olarak da mavi rengin sarıya dönmesi kabul edildi (Şekil 3b,c). Absorbans değerleri 3-5 dakika içinde 450 nmde ELIZA okuyucuda ölçüldü ve kaydedildi. Protein standart eğri denklemleri ile absorbanslar konsantrasyona (ng/ml, pg/ml, µmol) dönüştürüldü.



Şekil 3.3: ELIZA a) Kaspaz-3 standart eğrisi, b) 96 kuyucuklu protein kaplanmış mikroplakalarda kromojenden sonra durdurucu solüsyon konduktan sonra mikroplakada oluşan sarı renk, c) Mikroplaka okuyucusunda absorbans ölçümü.

3.11 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler yapılırken IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro Wilks testi kullanılarak değerlendirildi. Uygulamalar arasındaki farkın değerlendirilmesinde Anova testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

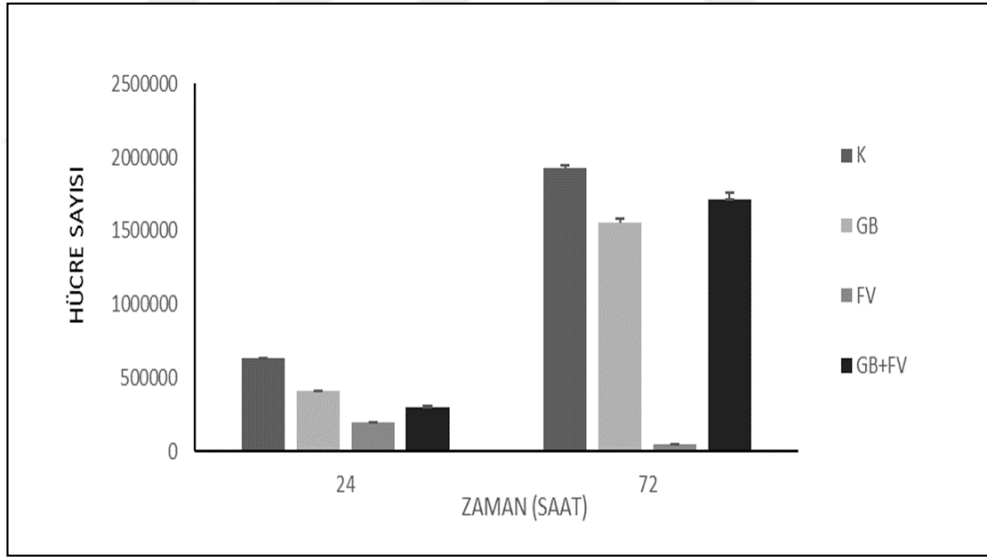
4 SONUÇLAR

4.1 Goji berry'de Antioksidan Kapasite Tayini (Fenolik ve Flavonoid)

Fenolik bileşik içeriği (Meyve ağırlığının her gramı için gallik asit ekivalanı (GAE) olarak) 3.35 ± 0.23 mg GAE/g ekstre ve flavonoid içeriği (Meyve ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı (CAE) olarak) 1.7 ± 0.18 mg CAE/g ekstre olarak saptandı.

4.2 Hücre Proliferasyon İndeksi

Uygulamaların ortalama hücre sayısı üzerindeki etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Hücre sayıları

Grafiklerdeki veriler ortalama ($n:18$) \pm SD şeklinde gösterildi. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama ($n:18$) \pm SD şeklinde gösterildi.

- Deney grubu hücre sayıları, kontrol grubu hücre sayıları ile karşılaştırıldığında 24 saatteki hücre sayısı ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{FV} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.00001$).

- Deney grubu hücre sayıları, kontrol grubu hücre sayıları ile karşılaştırıldığında 72 saatteki hücre sayısı ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{FV} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.0001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama hücre sayıları üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

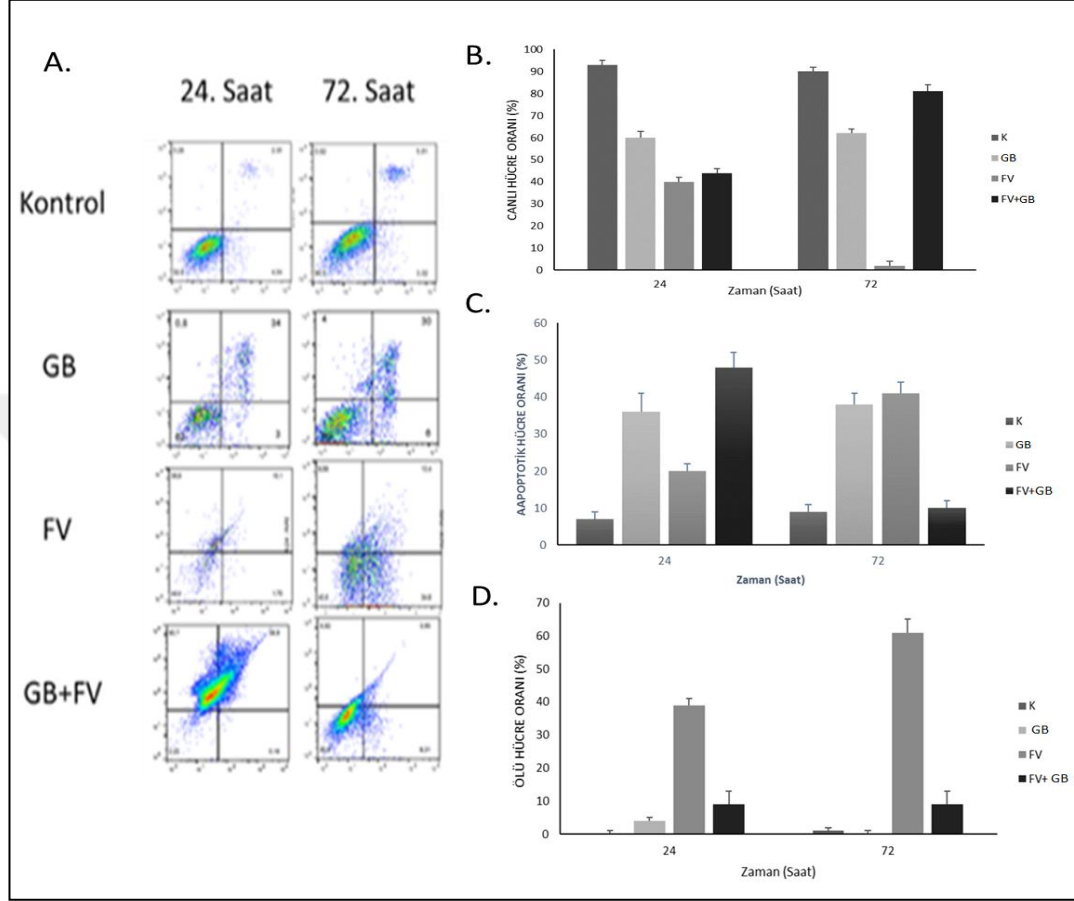
- GB grubunda belirlenen hücre sayısı ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.00001$).
- FV grubunda belirlenen hücre sayısı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. ($P_{GB+FV} > 0.05$).
- GB+FV grubunda belirlenen hücre sayısı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$), FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{FV} > 0.05$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen hücre sayısı ortalaması, FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0000001$), GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.00001$).
- FV grubunda belirlenen hücre sayısı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen hücre sayısı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$), FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.000001$).

4.3 Hücre Canlılığı ve Apoptik İndeks Bulguları

Uygulamaların apoptoz ile canlı ve ölü oranları üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Flow sitometri ile hücre canlılığı ve apoptoz analizi **A.** Flow sitometri histogramları: Sol alt taraftaki bölüm canlı hücreleri (Anneksin V-; PI-), sağ alt taraftaki bölüm erken apoptotik hücreleri (Anneksin V+; PI-), sağ üst taraftaki bölüm geç apoptotik hücreleri (Anneksin V+; PI+) ve sol üst taraftaki bölüm ise ölü hücreleri göstermektedir; **B.** 24. ve 72. saatlerdeki canlı KML hücre oranı grafiği; **C.** 24. ve 72. saatlerdeki erken apoptoz ve geç apoptoz oranlarının toplamı olan apoptotik KML hücre oranı grafiği; **D.** 24. ve 72. saatlerdeki ölü KML hücre oranı grafiği. **K**, Kontrol grubu; **GB**, Gojiberry; **FV**, Fertilovit; **GB+FV**, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

4.3.1. Canlı KML Hücre Oranları

- Deneş grubu canlı hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile karşılaştırıldığında 24. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.0000001$, $P_{FV}<0.000000000001$, $P_{GB+FV}<0.000000000001$).
- Deneş grubu canlı hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile karşılaştırıldığında 72. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$, $P_{FV}<0.000000000001$, $P_{GB+FV}<0.001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama canlı hücre oranları üzerine etkisinin gruplar arası değeriendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen canlı hücre oranı ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV}<0.00001$, $P_{GB+FV}<0.00001$).
- FV grubunda belirlenen canlı hücre oranı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.00001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{FV}>0.05$).
- GB+FV grubunda belirlenen canlı hücre oranı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.00001$), FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{FV}>0.05$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen canlı hücre oranı ortalaması, FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV}<0.000000001$), GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV}<0.000001$).
- FV grubunda belirlenen canlı hücre oranı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı

($P_{GB} < 0.000000001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.0000001$).

- GB+FV grubunda belirlenen canlı hücre oranı ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.000001$), FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0000001$).

4.3.1 Apoptotik KML Hücre Oranları

- Deneysel gruba toplam apoptoz oranları, kontrol grubu toplam apoptoz oranları ile karşılaştırıldığında 24. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{FV} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.000001$).
- GB ve FV deneysel grupları toplam apoptoz oranları, kontrol grubu toplam apoptoz oranları ile karşılaştırıldığında 72. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000000001$, $P_{FV} < 0.0000001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{GB+FV} > 0.05$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama apoptoz oranları üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen toplam apoptoz oranları ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0001$), GB+FV grubunun ortalaması istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.001$).
- FV grubunda belirlenen toplam apoptoz oranları ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{GB+FV} < 0.000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen toplam apoptoz oranları ortalaması, GB ve FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.001$, $P_{FV} < 0.000001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen toplam apoptoz oranları ortalaması GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.000000001$), FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{FV} > 0.05$).
- FV grubunda belirlenen toplam apoptoz oranları ortalaması, GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.000000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{FV} > 0.05$).
- GB+FV grubunda belirlenen toplam apoptoz oranları ortalaması GB ve FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.000000001$, $P_{FV} < 0.000000001$).

4.3.3. Ölü KML Hücre Oranları

- Deneysel gruba ölü hücre oranları, kontrol grubu ölü hücre oranları ile karşılaştırıldığında 24. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.001$, $P_{FV} < 0.000000001$, $P_{GB+FV} < 0.01$).
- GB+FV ve FV deneysel grupları ölü hücre oranları, kontrol grubu ölü hücre oranları ile karşılaştırıldığında 72. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.01$, $P_{FV} < 0.000000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P_{GB} > 0.05$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama ölü hücre oranları üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen ölü hücre oranları ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.0001$, $P_{GB+FV} < 0.05$).
- FV grubunda belirlenen ölü hücre oranları ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{GB+FV} < 0.01$).

- GB+FV grubunda belirlenen ölü hücre oranları ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV}<0.000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.05$).

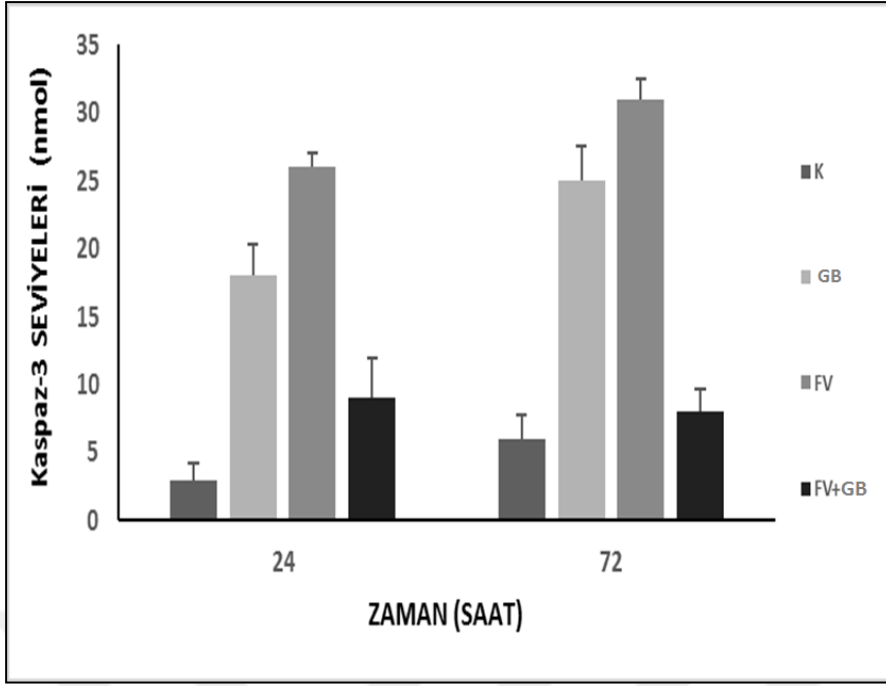
72 saat

- GB grubunda belirlenen ölü hücre oranları ortalaması, FV ve GB+FV grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV}<0.0000001$, $P_{GB+FV}<0.01$).
- FV grubunda belirlenen ölü hücre oranları ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.0000001$, $P_{GB+FV}<0.0000000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen ölü hücre oranları ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV}<0.000000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.01$).

4.4 ELIZA Bulguları

4.4.1 Kaspaz-3 Düzeyleri

Uygulamaların Kaspaz-3 düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Kaspaz-3 düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

- Deneysel grubun kaspaz-3 düzeyleri, kontrol grubun kaspaz-3 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat kaspaz-3 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00000001$, $P_{FV} < 0.0000000001$, $P_{GB+FV} < 0.00000001$).
- Deneysel grubun kaspaz-3 düzeyleri, kontrol grubun kaspaz-3 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat kaspaz-3 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000000001$, $P_{FV} < 0.00000000001$, $P_{GB+FV} < 0.05$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama kaspaz-3 düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen kaspaz-3 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.00001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.00000001$).

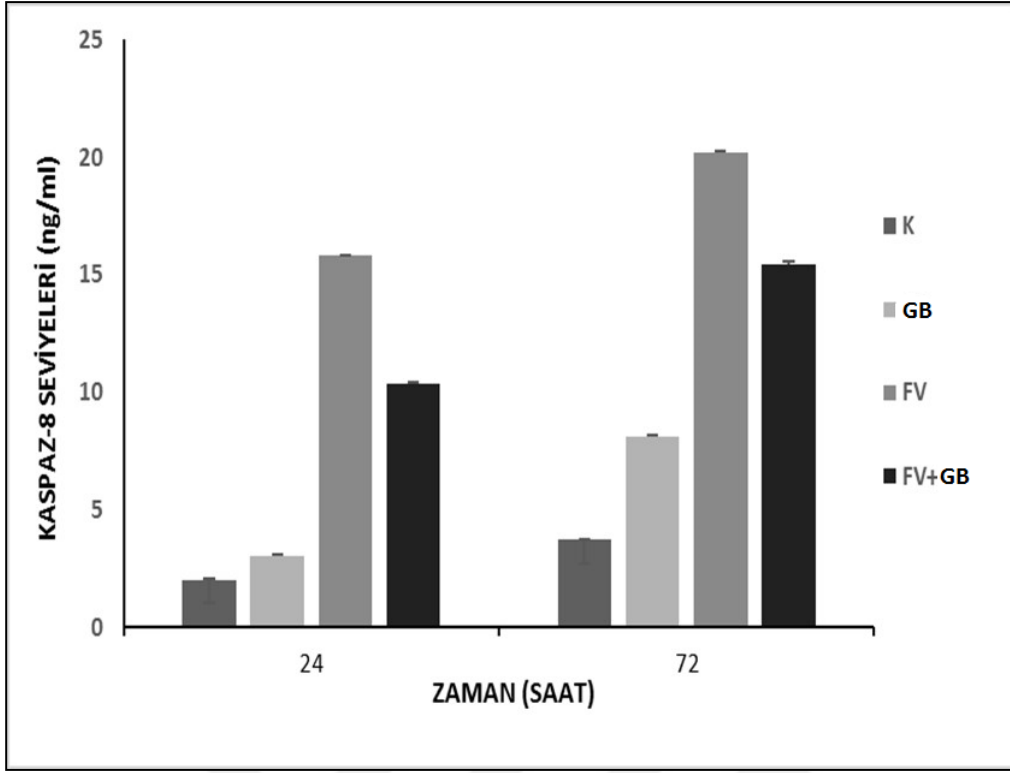
- FV grubunda belirlenen kaspaz-3 düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.000000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen kaspaz-3 düzeyleri ortalaması GB ve FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.000000001$, $P_{GB} < 0.000000001$).

72. saat:

- GB grubunda belirlenen kaspaz-3 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.00001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.000001$).
- FV grubunda belirlenen kaspaz-3 düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.000000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen kaspaz-3 düzeyleri ortalaması GB ve FV gruplarının ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.000001$, $P_{GB} < 0.001$).

4.4.2 Kaspaz-8 Düzeyleri

Uygulamaların Kaspaz-8 düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Kaspaz-8 düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-8 düzeyi gruplararası analizi sonucunda

- Deneysel grubun kaspaz-8 düzeyleri, kontrol grubunun kaspaz-8 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat kaspaz-8 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.01$, $P_{FV} < 0.000000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0000000001$).
- Deneysel grubun kaspaz-8 düzeyleri, kontrol grubunun kaspaz-8 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat kaspaz-9 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{FV} < 0.00000000000001$, $P_{GB+FV} < 0.00000001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama kaspaz-8 düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24. saat

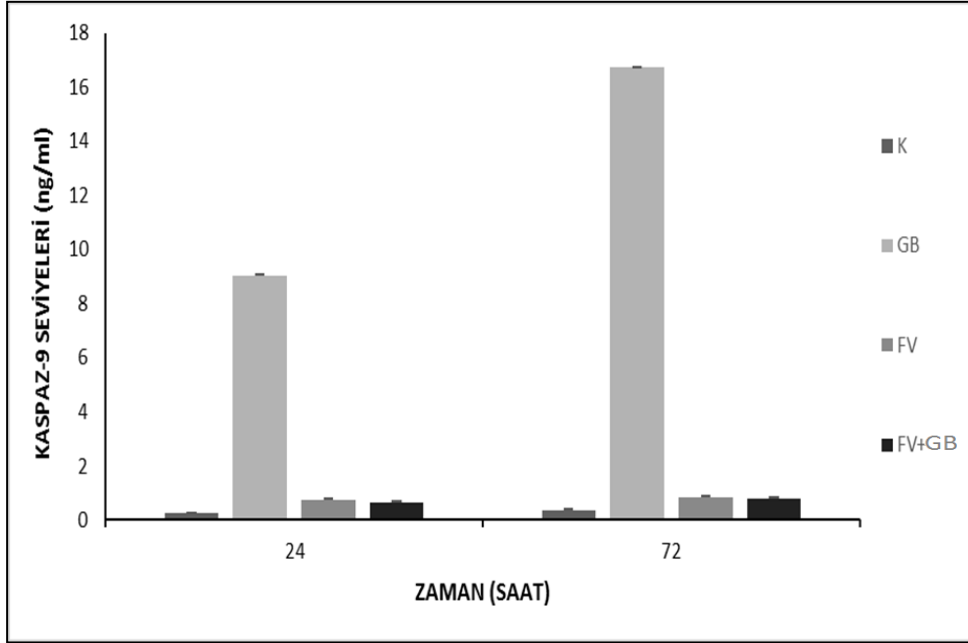
- GB grubunda belirlenen kaspaz-8 düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.0000000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0000000000001$).
- FV grubunda belirlenen kaspaz-8 düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0001$).
- GB+FV grubunda belirlenen kaspaz-8 düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.0001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000000000001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen kaspaz-8 düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.00000000001$, $P_{GB+FV} < 0.00000001$).
- FV grubunda belirlenen kaspaz-8 düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamalarından olarak anlamlı seviyede düşük bulunmuştur ($P_{GB} < 0.0000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0001$).
- GB+FV grubunda belirlenen kaspaz-8 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.0001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00000001$).

4.4.3 Kaspaz-9 Düzeyleri

Uygulamaların Kaspaz-9 düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Kaspaz-9 düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-9 düzeyi gruplararası analizi sonucunda

- Deneysel grubu kaspaz-9 düzeyleri, kontrol grubu kaspaz-9 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat kaspaz-9 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000000000001$, $P_{FV} < 0.0000000001$, $P_{GB+FV} < 0.00000001$).
- Deneysel grubu kaspaz-9 düzeyleri, kontrol grubu kaspaz-9 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat kaspaz-9 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00000000000001$, $P_{FV} < 0.00000001$, $P_{GB+FV} < 0.0000001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama kaspaz-9 düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

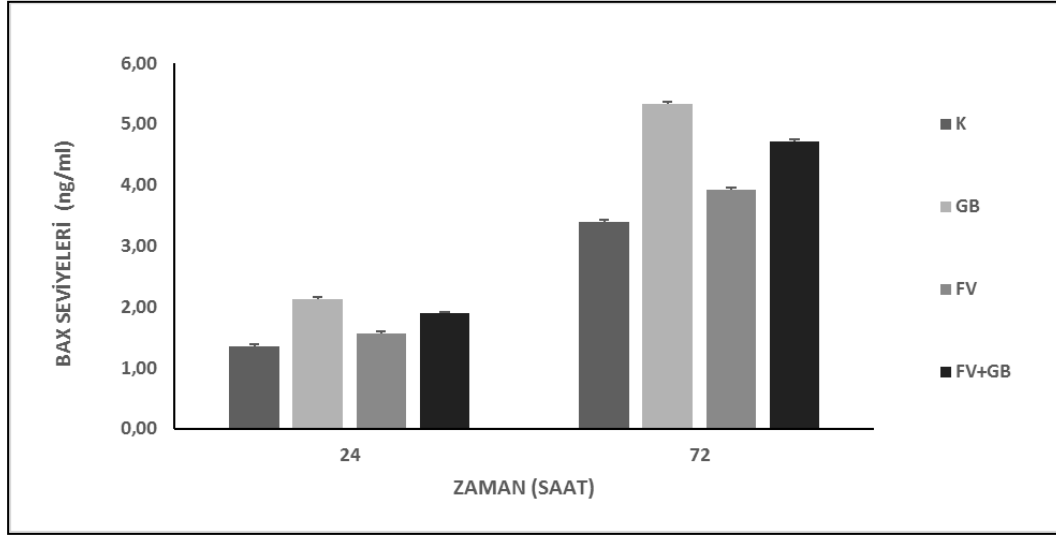
- GB grubunda belirlenen kaspaz-9 düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0000000001$).
- FV grubunda belirlenen kaspaz-9 düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000000001$), GB+FV grubunun ortalamasından düşük olarak saptandı ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P_{GB+FV} > 0.05$).
- GB+FV grubunda belirlenen kaspaz-9 düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} > 0.05$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000000001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen kaspaz-9 düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.000000000001$, $P_{GB+FV} < 0.000000000001$).
- FV grubunda belirlenen kaspaz-9 düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.000000000001$), GB+FV grubunun ortalamasından düşük olarak saptandı ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P_{GB+FV} > 0.05$).
- GB+FV grubunda belirlenen kaspaz-9 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} > 0.05$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000000000001$).

4.4.4 Bax Düzeyleri

Uygulamaların Bax düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Bax düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

- Deneş grubu Bax düzeyleri, kontrol grubu Bax düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat Bax düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.000001$, $P_{FV}<0.000001$, $P_{GB+FV}<0.000001$).
- Deneş grubu Bax düzeyleri, kontrol grubu Bax düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat Bax düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.000000000001$, $P_{FV}<0.000000001$, $P_{GB+FV}<0.0000000001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama Bax düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen Bax düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV}<0.00000001$, $P_{GB+FV}<0.000001$).
- FV grubunda belirlenen Bax düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$, $P_{GB+FV}<0.0000001$).

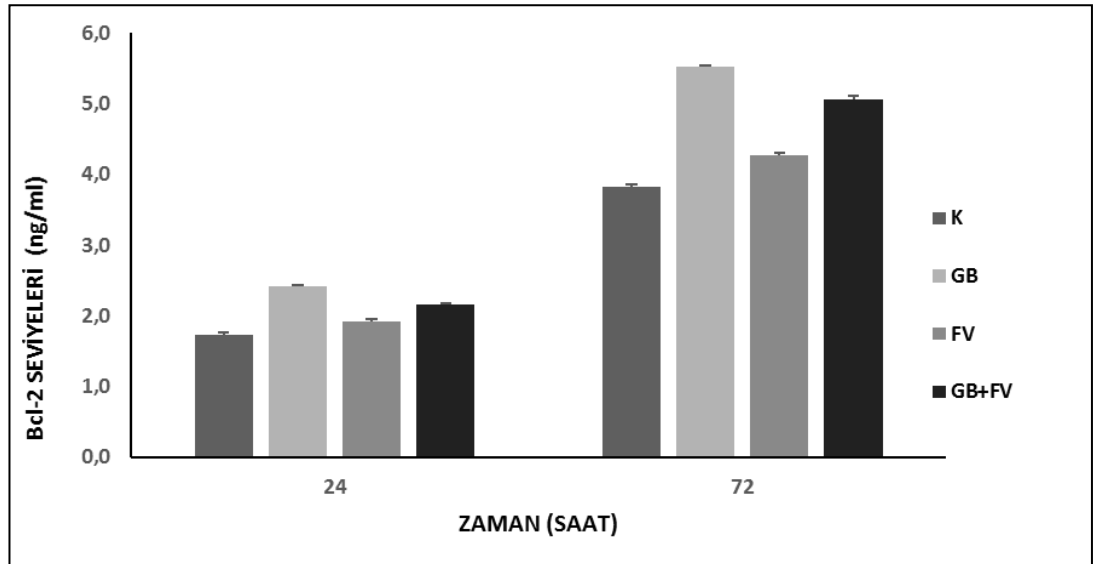
- GB+FV grubunda belirlenen Bax düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV}<0.0000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.000001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen Bax düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV}<0.0000000000001$, $P_{GB+FV}<0.000000000001$).
- FV grubunda belirlenen Bax düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.0000000000001$, $P_{GB+FV}<0.000000000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen Bax düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV}<0.00000000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000000001$).

4.4.5 Bcl-2 Düzeyleri

Uygulamaların Bcl-2 düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Bcl-2 düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

- Deneş grubu Bcl-2 düzeyleri, kontrol grubu Bcl-2 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat Bcl-2 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000000001$, $P_{FV} < 0.0001$, $P_{GB+FV} < 0.000000001$).
- Deneş grubu Bcl-2 düzeyleri, kontrol grubu Bcl-2 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat Bcl-2 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000000000000001$, $P_{FV} < 0.000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0000000000001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama Bcl-2 düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

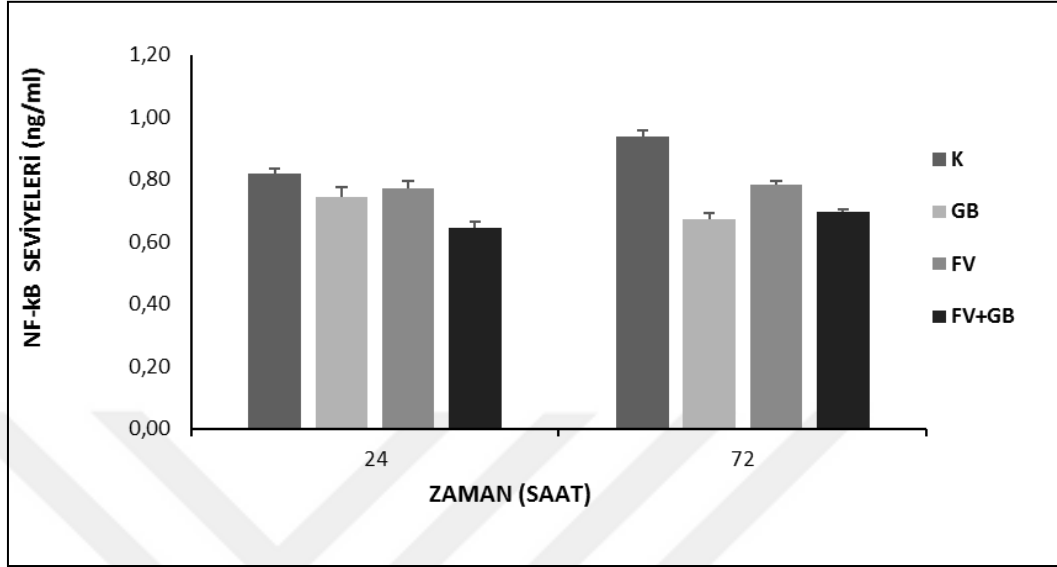
- GB grubunda belirlenen Bcl-2 düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.001$).
- FV grubunda belirlenen Bcl-2 düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.0001$).
- GB+FV grubunda belirlenen Bcl-2 düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen Bcl-2 düzeyleri ortalaması, FV ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.001$).
- FV grubunda belirlenen Bcl-2 düzeyleri ortalaması, GB ve GB+FV gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{GB+FV} < 0.001$).
- GB+FV grubunda belirlenen Bcl-2 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.001$).

4.4.6 NF-kB Düzeyleri

Uygulamaların NF-kB düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: NF-kB düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

- Deneysel grubun NF-kB düzeyleri, kontrol grubunun NF-kB düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat NF-kB düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.001$, $P_{FV}<0.001$, $P_{GB+FV}<0.0000001$).
- Deneysel grubun NF-kB düzeyleri, kontrol grubunun NF-kB düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat NF-kB düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$, $P_{FV}<0.000001$, $P_{GB+FV}<0.000001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama NF-kappaB düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen NF-kB düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından düşük bulunmuştur, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir ($P_{FV}>0.05$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV}<0.001$).

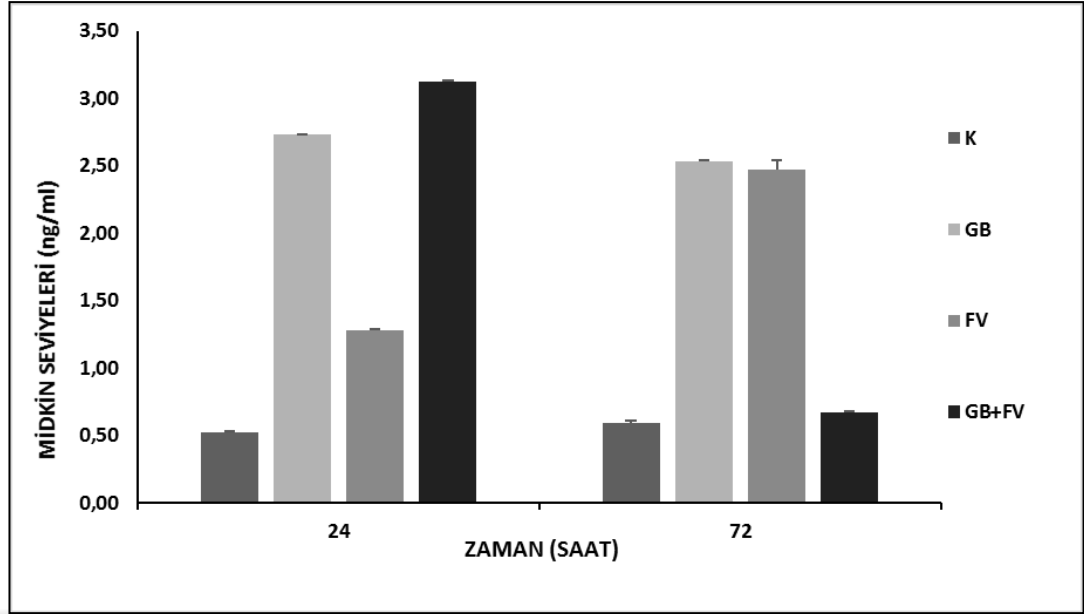
- FV grubunda belirlenen NF-kB düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından yüksek bulunmuştur saptandı, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir ($P_{FV}>0.05$), GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV}<0.00001$).
- GB+FV grubunda belirlenen NF-kB düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV}<0.00001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB}<0.001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen NF-kB düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV}<0.00001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV}<0.05$).
- FV grubunda belirlenen NF-kB düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00001$), GB+FV grubunun ortalaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV}<0.00001$).
- GB+FV grubunda belirlenen NF-kB düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV}<0.00001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}<0.05$).

4.4.7 Midkin Düzeyleri

Uygulamaların MK düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9: Midkin düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

- Deneş grubu midkin düzeyleri, kontrol grubu MK düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat MK düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000000000000001$, $P_{FV} < 0.0000000000000001$, $P_{GB+FV} < 0.0000000000000001$).
- Deneş grubu MK düzeyleri, kontrol grubu MK düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat MK düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000000000000001$, $P_{FV} < 0.00000001$, $P_{GB+FV} < 0.000001$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama MK düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen MK düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0000000000000001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.001$).
- FV grubunda belirlenen MK düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı

($P_{GB} < 0.0000000000000001$), GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.0000000000000001$).

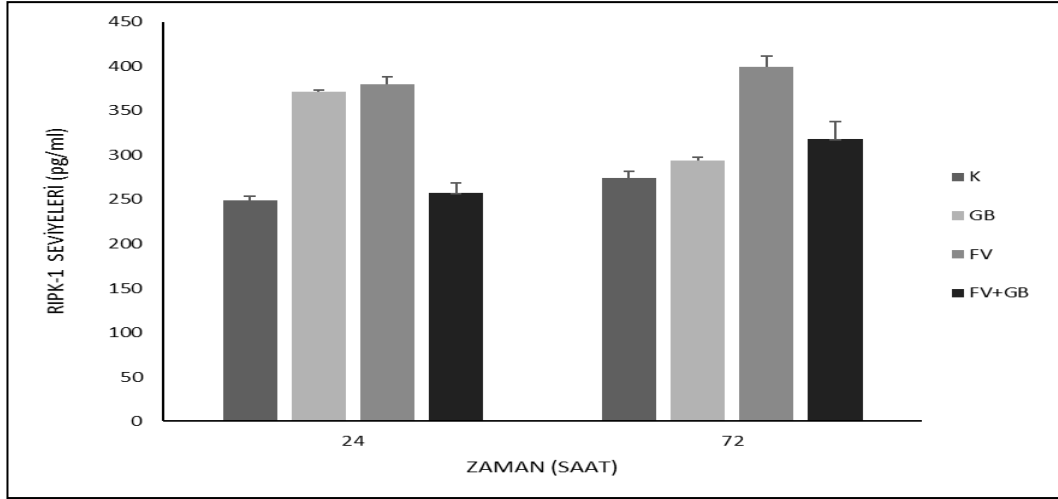
- GB+FV grubunda belirlenen MK düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.0000000000000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.001$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen MK düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından yüksek bulunmuştur, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir ($P_{FV} > 0.05$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ($P_{GB+FV} < 0.0000000000000001$).
- FV grubunda belirlenen MK düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından düşük bulunmuştur ancak bu istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir ($P_{FV} > 0.05$), GB+FV grubunun ortalaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.0000001$).
- GB+FV grubunda belirlenen MK düzeyleri ortalaması, FV ve GB gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.0000001$, $P_{GB} < 0.00000000000000000001$).

4.4.8 RIPK-1 Düzeyleri

Uygulamaların RIPK-1 düzeyleri üzerine etkilerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirilmesi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. RIPK-1 düzeyleri. K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; FV, Fertilovit; GB+FV, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki veriler ortalama (n:18)± SD şeklinde gösterildi.

- Deneş grubu RIPK-1 düzeyleri, kontrol grubu RIPK-1 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 24. saat RIPK-1 düzeyleri ortalamaları GB+FV grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000000001$, $P_{FV} < 0.000000001$, $P_{GB+FV} > 0.05$).
- Deneş grubu RIPK-1 düzeyleri, kontrol grubu RIPK-1 düzeyleri ile karşılaştırıldığında 72. saat RIPK-1 düzeyleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.01$, $P_{FV} < 0.000000001$, $P_{GB+FV} < 0.01$).

Grupların 24. ve 72. saatlerde ortalama RIPK-1 düzeyleri üzerine etkisinin gruplar arası değerlendirilmesi

24 saat

- GB grubunda belirlenen RIPK-1 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.05$), GB+FV grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.05$).
- FV grubunda belirlenen RIPK-1 düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.05$), GB+FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.000000001$).

- GB+FV grubunda belirlenen RIPK-1 düzeyleri ortalaması FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.00000001$), GB grubunun ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{GB} < 0.05$).

72 saat

- GB grubunda belirlenen RIPK-1 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.000001$), GB+FV grubunun ortalaması açısından düşük saptandı ($P_{GB+FV} < 0.05$).
- FV grubunda belirlenen RIPK-1 düzeyleri ortalaması, GB grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{FV} < 0.000001$), GB+FV grubunun ortalaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek saptandı ($P_{GB+FV} < 0.0001$).
- GB+FV grubunda belirlenen RIPK-1 düzeyleri ortalaması, FV grubunun ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük saptandı ($P_{FV} < 0.0001$), GB grubunun ortalaması açısından yüksek saptandı, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildir ($P_{GB} > 0.05$).

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Pubmedde yapılan (lycium barbarum OR goji berry) AND (leukemia OR acute myeloid leukemia OR chronic myeloid leukemia) anahtar kelime grupları ile yapılan arama sonucunda GB'nin lösemide proliferasyonu durdurucu, tedavi edici etkisi üzerine iki çalışma bulundu. Gan ve ekibi, GB polisakkaridlerini (GBP) 20-1000 mg/L konsantrasyon aralığında HL-60 hücreleri üzerinde uygulamış, bunun sonucunda hücre büyümesini doza bağlı ve membran akışkanlığını azaltma yolu ile gösterdiğini kanıtlamışlardır [3]. Huang ve ekibinin yaptığı çalışmada total GB flavonoidlerinin (tGBF) fare lenfositik lösemi hücrelerinde (L1210) ısı çıkışına nasıl etki ettiği araştırılmış ve tGBF'nin ısı çıkışını durdurduğunu göstermişlerdir [13].

Gan ve ekibi tarafından yapılan çalışmada, GB'nin HL-60 AML hücrelerinde NF-kappaB ve kaspaz-3 aktivasyonunu izleyen Poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP) bölünmesi ve sonunda da DNA parçalanması ile sonuçlanan apoptoza neden olduğu saptandı [3]. Zhu ve arkadaşlarının insan servikal karsinoma hücrelerinde (HeLa) yaptığı GBP'lerin kullanıldığı bir çalışmada GB'nin iç apoptoz sinyal yolunu (mitokondriyal sinyal yolu) aktifleyerek etki ettiğini göstermiştir [43]. Bu çalışmanın yanında Luo ve ekibinin yaptığı diğer bir çalışmada da kullanılan GBP, iki farklı prostat kanser hücresinde (PC-3,DU-145) denenmiş ve apoptotik hücre oranında artış görülmüş, bu artışın Bcl-2 seviyelerinin azaltılması ve bax oranlarının ise artırılması yolu ile iç apoptotik yolun tetiklenmesi ile gerçekleştiği görülmüştür [44]. Ceccarini ve ekibi, fenolik GB bileşenlerinin karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) oksidatif stres, proliferasyon, programlı hücre ölümü ve kanser gen ekspresyonlarını düzenleyerek etkilerini gösterdiğini saptamıştır [45]. Bu çalışmada, diğer çalışmalar ile uyumlu olarak KML kanser tipinde ve K562 hücre soyunda apoptoz indüksiyonu görülmüş ve bu indüksiyonun onlarla uyumlu olarak iç (mitokondriyal) apoptotik yolağı aktifleyerek (nekroapoptotik yolak üzerinden değil) zamana bağlı olduğu gösterildi. Buna ek olarak, GB'nin etkisinin nekroapoptotik yolak üzerinden araştırılmasına dair yine Pubmedde yapılan

(lycium barbarum OR goji berry) AND (necroapoptosis) anahtar kelime grupları ile yapılan arama sonucunda hiçbir yayın bulunamadı. Bu durum aynı zamanda apoptotik protein seviyeleri üzerinden de doğrulandı. 72. saat sonunda hücre sayısını ile canlılığı azaltmada ve apoptotik hücre oranını artırmada GB, FV'den sonra 2. sırayı aldı. Buna göre FV'den sonra 2. yüksek kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 seviyeleri istatistiksel anlamlılıkla yine GB grubunda saptandı. Bax seviyelerine incelendiğinde 72 saat sonunda düşük bulunsa da tüm grupların yine bax seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı ve en yüksek bax seviyesinin GB grubunda olduğu görüldü. Bcl-2 seviyeleri için de 72. saat sonunda aynı bulgular saptandı. Tüm grupların, nekroapoptotik yolak sinyal proteini olan RIPK-1 seviyelerini (ihmal edilebilir derecede düşük) istatistiksel olarak anlamlı artırdığı görüldü. Ancak, RIPK-1 ve yine aynı yolda görevli kaspaz-8 seviyelerinin çok düşük seviyelerde (ihmal edilebilir derecede düşük) bulunması nekroapoptotik yolak üzerinden GB'nin etkilerini göstermediğini bize kanıtladı. NF-kB'nin KML'de BCR-ABL1 tirozin kinazın alt yolağında yer alarak hücre yaşamına ve proliferasyona neden olduğu ve seviyelerinin yüksek olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [46]. Çalışmamızda, ihmal edilebilir seviyelerde düşük olan NF-kB seviyeleri tüm gruplarda istatistiksel anlamlı olarak kontrolden düşük bulundu. En düşük seviye, istatistiksel anlamlı olarak GB grubunda saptandı. Buna göre anti-apoptotik hücre yanıtında NF-kB'nin görevi olmadığı saptandı.

Temel amacı hamilelik öncesi destek sağlamak olan FV'de onu oluşturan farklı konsantrasyonlardaki C vitamini, E vitamini, Koenzim Q gibi bileşenlerin kanser ve anti-kanser etkileri yayınlarda ayrı ayrı ve lösemi dahil çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiş [15,16,34,47,48] olsa da FV'nin bu konudaki etki tarzına uygun herhangi bir yayın bulunamamıştır. Vitamin C (Vit C) içeriği çok yüksek olan GB düşünüldüğünde de kanser tedavisinde kansere doğru gelişim gibi farklı sonuçların görülebilme ihtimali vardır. Örneğin, vitamin C'nin seçici olarak bazı tümör hücrelerinde (melanom, nöroblastom, AML) anti-oksidan etki yerine pro-oksidan olarak da davrandığı birçok çalışmada gösterilmiştir [49-51]. De Laurenzi ve arkadaşları, nöroblastoma ve melanoma hücrelerine 10 nM-1 mM doz aralığında uyguladıkları Vit C'nin apoptoza neden olduğunu göstermiş [49], ancak Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Vit C'nin fare myeloma hücrelerinin büyümesini

in vitro koloni testinde düzenlediğini göstermiştir [48]. Aynı çalışmada, AML’li ve myelodisplastik sendromlu (MDS) hastaların lösemik progenitor (öncü) hücrelerinin büyümesini düzenlediğini göstermiştir [48]. Yine ilk defa bu çalışmada, FV’nin KML hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak dış apoptotik yolağı indükleyerek gerçekleştirdiğini bu çalışmada gösterildi. 72. saat sonunda hücre sayısını ile canlılığı azaltmada ve apoptotik hücre oranını artırmada en etkili grup, en yüksek kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 seviyeleri ile istatistiksel anlamlılıkla FV grubu olarak saptandı. Düşük saptanan Bax ve Bcl-2 seviyelerindeki en düşük artış yine istatistiksel anlamlı olarak FV grubunda saptandı. İhmal edilebilir RIPK-1 değerleri konusunda da en yüksek değer istatistiksel anlamlı olarak FV grubunda saptandı. Tüm bu sonuçlar, GB’de olduğu gibi FV’nin iç apoptoz yolu ile nekroapoptoz yolu ile etki göstermediğini bize kanıtladı. GB’de belirtildiği üzere ihmal edilebilir düzeyde saptanan NF-kB seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı en düşük azalma FV grubunda saptandı. Buna göre anti-apoptotik hücre yanıtında NF-kB’nin görevi olmadığı saptandı.

Chen ve arkadaşlarının hayvanlarda ve kültürde yaptığı araştırmada, GBP’ler interferon- α ile birlikte böbrek karsinoma hücre hattında uygulanmış ve bunun sonucunda uygulamanın hücre sayısını azaltarak, hücre büyümesini durdurarak ve apoptozu başlatarak (siklin D1, c-Myc ve bcl-2 seviyelerini azaltıp bax seviyelerini artırması) etki göstermesi “sinergistik immunoterapotik etki” olarak tanımlanmıştır [52]. Xin ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada GB’nin doksorobisinin (DXR) oluşturduğu oksidatif stresi engelleyerek kalbe verdiği hasarı engellediğini ve GB ile DXR’nin toksisiteyi azaltmak için birlikte kullanılabileceği sonucuna ulaşıldı [53]. Lu ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada GBP’lerin akciğer kanseri verilen C57 BL fareleri radyoterapiye duyarlı hale getirdiği fakat tek başına uygulanan GBP’nin tümörü geriletmediği saptandı [54]. Gao ve arkadaşlarının yaptığı başka bir araştırmada GBP’lerin PC12 hücrelerinde 6-hidroksidopamin kaynaklı apoptozu engelleyerek hücreleri koruduğu görüldü [55]. Mevcut çalışmada yaptığımız GB ile FV kombinasyonu ile Vit C, Vit E gibi antioksidanların yüksek dozunu sağlayarak kansere ve/veya uygulanan kanser tedavisine bağlı veya bağlı olmayan kısırlık ve/veya üreme sağlığında bozulma yaşayan ve aynı zamanda kanser özellikle lösemi olan ve/veya kanser tedavisi ve sonraki aşamaya erişen hastalarda tedavide

başarıyı, lösemnin tekrar oluşma riskini azaltmayı ve hayat kalitesinde artışı hedeflemiştik. Kombinasyon grubunun yine tekli gruplarda olduğu gibi hücre sayısında azalmaya yol açtığını ve etkisini yine GB ve FV'deki görülen aynı protein seviyelerinden yola çıkarak dış apoptotik yolak ile gösterdiğini saptadık.

Ancak kombinasyon grubundaki gerek hücre sayısındaki azalma oranı gerekse apoptoz indüksiyonu, tekli uygulanan gruplara göre çok daha azdı, buna göre etki mekanizması antagonist etki olarak değerlendirildi. En düşük kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 seviyeleri ile istatistiksel anlamlılıkla kombinasyon grubunda saptandı. RIPK-1, Bax ve Bcl-2 seviyelerinin artırılmasında ise kombinasyon grubu istatistiksel anlamlılıkla 2. sırada yer aldı. Tekli gruplarda belirtildiği üzere ihmal edilebilir düzeyde düşük saptanan NF-kB seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı 2. düşük seviye kombinasyon grubunda saptandı. Buna göre tekli gruplarda olduğu gibi kombinasyon grubuna karşı oluşan anti-apoptotik hücre yanıtında NF-kB'nın rolü olmadığı saptandı.

MK, 13 kDa ağırlığında, sitokin görevleri bulunan, heparine-bağlı büyüme bağlantılı büyüme faktörüdür. Embryonik dönemde mid-gestasyon döneminde çok yüksek eksprese edilse de yetişkinde seviyeleri oldukça azalır ve/veya kaybolur [56]. MK etkilerini anaplastik lenfoma kinaz (ALK), protein tirozin fosfataz (PTP) - ζ , Notch 2, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP), proteoglikanlar ve integrinleri kapsayan çeşitli reseptörler aracılığıyla göstermektedir [56].

MK'nın inflamasyon (iltihap), bağışıklık, kan basıncı, gelişim, doku korunması, doku yenilenmesi, doku onarımı, kanser [tümör büyümesi, kemorezistans, transformasyon, anti-apoptoz, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) dahil olmak üzere] ve hücre kaderi tayininde (otofajiden hücre yaşamasına ya da hücre ölüme kadar (otofaji / apoptozis) farklı biyolojik rolleri bulunmaktadır [58]. Yüksek MK seviyeleri lösemi de dahil olmak üzere birçok kanser tipinde saptanmış ve kötü prognoz ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [56]. Bu çalışmada, anti-apoptotik/direnç/yaşam proteinleri kapsamında GB'nin ve FV'nin değerlendirmesi ilk defa yapılmış olup her iki farklı ajanında MK seviyelerini artırdığı saptanmıştır. En yüksek MK seviyesi 72. saat sonunda, GB grubunda saptanmıştır ancak bu değer FV grubuna çok yakındır ve FV ile GB MK seviyeleri arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kombinasyon grubunda 72. saat sonunda artış saptanmış olsa da bu değer kontrol grubuna yakın bir değerdir ve kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir fark bulunmamıştır. GB ve FV grupları ile kontrol grubu arasındaki fark yüksek olup istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Bu da çalışmamızda lösemi tedavisinde etkin olarak saptanan tekli GB ve FV gruplarına hücrenin direnç olarak yanıtının MK proteini üzerinden gerçekleştiğini bize göstermektedir.

Sonuç olarak,

Bu çalışmada ilk defa, 1) GB'nin AML kanser tipinde anti-kanser etkisi olduğunu ve bunu dış apoptotik yolak üzerinden gerçekleştirdiğini, 2) GB'nin AML kanser tipinde nekroapoptotik yolu kullanmadığını, 3) FV'nin AML kanser tipinde anti-kanser etkisi olduğunu ve bunu dış apoptotik yolak üzerinden gerçekleştirdiğini, 4) FV'nin AML kanser tipinde nekroapoptotik yolu kullanmadığını, 5) GB ile FV'nin birlikte kullanımının antagonist etki gösterdiğini, yine dış apoptotik yolak üzerinden etki gösterdiğini ancak bunu dış apoptotik yolak aktivasyonunu azaltarak gerçekleştirdiğini, 6) Tüm grupların direnç mekanizmasının ilk defa MK proteini üzerinden değerlendirildiği ve anti-apoptotik yanıtı MK proteini üzerinden yanıt verdiğini gösterdik. Çalışmamıza göre vardığımız sonuç, GB ile FV'nin kombine kullanımının kanser tedavisinde, öncesi ve sonrasında ve hatta sağlıklı bireylerde tehlikeli olduğu ve yapılmaması gerektiğidir. Tek başına FV ve GB kanser tedavisinde özellikle araştırdığımız AML tipi lösemi tedavisinde kullanılabileceğidir.



KAYNAKLAR

1. **Kang, ZJ, Liu, YF, Xu, LZ, Long, ZJ, Huang, D, Yang, Y, Liu, B, Feng, JX, Pan, YJ, Yan, JS, Liu, Q** 2016, 'The Philadelphia chromosome in leukemogenesis.', *Chin J Cancer.*, vol. 35, pp. 48.
2. **Yi, SS, Hwang, E, Baek, HK, Kim, TH, Lee, HH, Jun, HS, Kim, SJ** 2015, 'Application of Bioactive Natural Materials-based Products on Five Women's Diseases.' *J Menopausal Med.*, vol. 21, no.3, pp.121-5
3. **Gan, L, Wang, J, Zhang, S** 2001, Inhibition the growth of human leukemia cells by Lycium barbarum polysaccharide.', *Wei Sheng Yan Jiu.*, vol.30, no. 6 ,pp.333-5.
4. **Qian, D, Zhao, Y, Yang, G, Huang, L** 2017, Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus Lycium (Solanaceae). *Molecules.* vol. 22, no.6, pii: E911.
5. **Seeram, NP** 2008, 'Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease.', *J Agric Food Chem.*, vol.56, no.3, pp.627-9.
6. **Jiao, R, Liu, Y, Gao, H, Xiao,, J, So KF** 2016, 'The Anti-Oxidant and Antitumor Properties of Plant Polysaccharides.' *Am J Chin Med.*, vol.44, no.3, pp. 463-88.
7. **Jin, M, Huang, Q, Zhao, K, Shang, P** 2013, 'Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from Lycium barbarum L.' *Int J Biol Macromol.*, vol. 54, pp.16-23.
8. **Tang, WM, Chan, E, Kwok, CY, Lee, YK, Wu, JH, Wan, CW, Chan, RY, Yu, PH, Chan, SW.** 2012, 'A review of the anticancer and immunomodulatory effects of Lycium barbarum fruit.' *Inflammopharmacology.*, vol. 20, no. 6, pp.307-14.
9. **Shi, GJ, Zheng, J, Wu, J, Qiao, HQ, Chang, Q, Niu, Y, Sun, T, Li, YX, Yu, JQ.** 2017, 'Beneficial effects of Lycium barbarum polysaccharide on spermatogenesis by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in streptozotocin-induced diabetic male mice.' *Food Funct.*, vol. 8, no. 3, pp.1215-1226.
10. **Lee, MJ, Jang, M, Bae, CS, Park, KS, Kim, HJ, Lee, S, Lee, SW, Kim, YO, Cho, IH.** 2016, 'Effects of Oriental Medicine Kyung-Ok-Ko on Uterine Abnormality in Hyperandrogenized Rats.' *Rejuvenation Res.*, vol. 19, no.6, pp. 456-466.
11. **Jang, M, Lee, MJ, Lee, JM, Bae, CS, Kim, SH, Ryu, JH, Cho, IH** 2014, 'Oriental medicine Kyung-Ok-Ko prevents and alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats.' *PLoS One.*, vol. 9, no. 2, pp.e87623.
12. **Fertilovit-F35Plus.** Alındığı tarih: 24.08.2017, adres: <http://www.fertilovit.com/files/en/Fertilovit-F35plus.pdf>
13. **Huang, Y, Tan, A, Shen, Y, Lu, J.** 1998, 'Scavenging effect of total flavonoids of lyceum barbarum L on active oxygen radicals and inhibitory effects on heat output from L1210 cells.' *Wei Sheng Yan Jiu.*, vol. 27, no. 2, pp.109-11, 115.

14. **Yamada, P, Nemoto, M, Shigemori, H, Yokota, S, Isoda,, H** 2011, 'Isolation of 5-(hydroxymethyl)furfural from *Lycium chinense* and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells.' *Planta Med.* vol. 77, no.5, pp.434-40.
15. **Blair, CK, Roesler, M, Xie, Y, Gamis, AS, Olshan, AF, Heerema, NA, Robison,, LL, Ross, JA** 2008, 'Children's Oncology Group (COG). Vitamin supplement use among children with Down's syndrome and risk of leukaemia: a Children's Oncology Group (COG) study.', *Paediatr Perinat Epidemiol.*, vol. 22, no.3, pp. 288-95.
16. **O'Shea, SJ, Davies, JR, Newton-Bishop,, JA,** 2016 'Vitamin D, vitamin A, the primary melanoma transcriptome and survival.', *Br J Dermatol.*, vol. 175, no. 2 (suppl), pp. 30-34.
17. **Holyoake, TL, Vetrie, D** 2017, 'The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence.' *Blood.*, vol. 129, no.12, pp.1595-1606.
18. **Subtil, A** 2017, Myeloid Neoplasms'. *Clin Lab Med.*, vol. 37, pp.575-585.
19. **Deininger, MW, Goldman, JM, Melo, JV.** 2000, 'The molecular biology of chronic myeloid leukemia.' *Blood.*, vol. 96, no.10, pp.3343-56.
20. **Vickers, A, Zollman, C** 1999, 'ABC of complementary medicine: herbal medicine.' *BMJ.*, vol. 319, no. 7216, pp. 1050-3.
21. **Asher, GN, Corbett, AH, Hawke, RL** 2017, 'Common Herbal Dietary Supplement-Drug Interactions.' *Am Fam Physician.*, vol. 96, no. 2, pp.101-107.
22. **Yi R, Liu, XM, Dong, Q** 2013, 'A study of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) extraction technology and its anti-aging effect.' *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, vol. 10, no. 4, pp.171-4.
23. **Ruiz-Núñez, B, Pruijboom, L, Dijck-Brouwer, DA, Muskiet, FA** 2013, 'Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context.' *J Nutr Biochem.*, vol. 24, no.7, pp.1183-201.
24. **Li, J, Shi, M, Ma, B, Zheng, Y, Niu, R, Li, K,** 2017, 'Protective effects of fraction 4a of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* against KBrO(3)-induced renal damage in rats.' *Food Funct.*, vol. 8, no. 7, pp. 2566-2572.
25. **Zhang, L, Li, Q, Zheng, G, Chen, Y, Huang,, M, Zhang, L, Lin, X** 2017, 'Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides against cadmium-induced testicular toxicity in male mice.' *Food Funct.*, vol. 8, no.6, pp.2322-2330.
26. **Dai, JX, Du, XN** 2017, 'Antimicrobial and anti-tumor activities of endophytes from *Lycium barbarum* of Ningxia.' *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* vol. 42, , no.11, pp.2072-2077.
27. **Jia, L, Li, W, Li, J, Li, Y, Song, H, Luan,,Y, Qi, H, Ma,, L, Lu X, Yang Y** 2016, '*Lycium barbarum* polysaccharide attenuates high-fat diet-induced hepatic steatosis by up-regulating SIRT1 expression and deacetylase activity.' *Sci Rep.*, vol. 6, pp.36209.
28. **Li, JJ, Gao, H, Lv, Y, Li MH, Ren, CR, So, KF, Xiao, J** 2017, 'Zeaxanthin dipalmitate alleviates hepatic injury induced by superimposed chronic hepatitis B and non-alcoholic steatohepatitis in non-obese mice.' *J Asian Nat Prod Res.*, vol. 19, no.9, pp. 910-923.
29. **Manthey, AL, Chiu, K, So, KF** 2017, 'Effects of *Lycium barbarum* on the Visual System.' *Int Rev Neurobiol.*, vol. 135, pp. 1-27.

30. **Guo, XF, Li, ZH, Cai, H, Li, D** 2017, 'The effects of *Lycium barbarum* L. (*L. barbarum*) on cardiometabolic risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials.' *Food Funct.*, vol. 8, no.5, pp.1741-1748.
31. **Cai, H, Liu, F, Zuo P, Huang, G, Song, Z, Wang, T, Lu,H, Guo, F, Han, C, Sun, G** 2015, 'Practical Application of Antidiabetic Efficacy of *Lycium barbarum* Polysaccharide in Patients with Type 2 Diabetes.' *Med Chem.*, vol. 11, no.4, pp.383-90.
32. **Amagase, H, Nance, DM** 2011, '*Lycium barbarum* increases caloric expenditure and decreases waist circumference in healthy overweight men and women: pilot study.' *J Am Coll Nutr.*, vol. 30, no.5, pp.304-9.
33. **Basch, CH, Mongiovi,, J, Berdnik A, Basch, CE** 2016, 'The most widely viewed YouTube videos with content related to multivitamins.', *Health Promot Perspect.*, vol. 6, no.4, pp. 213-216.
34. **Hardy, ML, Duvall, K** 2015, 'Multivitamin/multimineral supplements for cancer prevention: implications for primary care practice.', *Postgrad Med.*, vol. 127, no.1, pp. 107-16.
35. **Genç, S, Gürdöl F,** 2017, 'Vitaminler', in Figen Gürdol (ed), *Tıbbi Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevi*, pp. 491-505.
36. **Ademoğlu, E,** 2017, 'Eser ve Ultraeser Elementler', in Figen Gürdol (ed), *Tıbbi Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevi*, pp. 513-524.
37. **Khazaei, M, Aghaz, F** 2017, 'Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes.' *Int J Fertil Steril.*, vol. 11, no. 2, pp.63-70.
38. **Ben-Meir, A, Burstein, E, Borrego-Alvarez, A, Chong, J, Wong, E, Yavorska, T, Naranian, T, Chi, M, Wang, Y, Bentov, Y, Alexis, J, Meriano, J, Sung, HK, Gasser, DL, Moley, KH, Hekimi, S, Casper, RF, Jurisicova, A** 2015, 'Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging.' *Aging Cell.*, vol. 14, no.5, pp.887-95.
39. **Bitis, L, Kultur, S, Melikoglu, G, Ozsoy, N, Can, A** 2010, 'Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves.' *Nat Prod Res.*, vol. 24, no.6, pp. 580-9.
40. **Li, Y, Wang, H, Zhang, R, Zhang, G, Yang Y, Liu Z** 2017, 'Biofabrication of polyphenols coated Nano palladium and its in-vitro cytotoxicity against human leukemia cell lines (K562).' *J Photochem Photobiol B.*, vol. 175, pp.173-177.
41. **Erguven, M, Oktem, G, Kara, AN, Bilir A** 2016, 'Lithium chloride has a biphasic effect on prostate cancer stem cells and a proportional effect on midkine levels.' *Oncol Lett.*, vol. 12, no. 4, pp.2948-2955.
42. **Erguven, M, Yazihan,N, Aktas, E, Sabanci, A, Li, CJ, Oktem, G, Bilir, A** 2010, 'Carvedilol in glioma treatment alone and with imatinib in vitro.' *Int J Oncol.*, vol. 36, no.4, pp. 857-66.
43. **Zhu, CP, Zhang, SH** 2013, '*Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis.' *J Sci Food Agric.*, vol. 93, no.1, pp.149-56.
44. **Luo, Q, Li, Z, Yan, J, Zhu, F, Xu, RJ, Cai, YZ** 2009, '*Lycium barbarum* polysaccharides induce apoptosis in human prostate cancer cells and inhibits prostate cancer growth in a xenograft mouse model of human prostate cancer.' *J Med Food.*, vol. 12, no. 4, pp.695-703.
45. **Ceccarini, MR, Vannini, S, Cataldi, S, Moretti, M, Villarini, M, Fioretti, B, Albi, E, Beccari, T, Codini, M** 2016, 'In Vitro Protective Effects of *Lycium*

- barbarum Berries Cultivated in Umbria (Italy) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells.' *Biomed Res Int.*, vol. 2016, pp.7529521.
46. Carrà, G, Torti, D, Crivellaro, S, Panuzzo, C, Tauli, R, Cilloni, D, Guerrasio, A, Saglio, G, Morotti, A 2016, 'The BCR-ABL/NF-κB signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias.' *Oncotarget.*, vol. 7, no.40, pp.66287-66298.
 47. Saha, SP, Whayne, TF Jr. 2016, 'Coenzyme Q-10 in Human Health: Supporting Evidence?' *South Med J.*, vol. 109, no.1, pp.17-21.
 48. Park, CH, Kimler, BF 1991, 'Growth modulation of human leukemic, preleukemic, and myeloma progenitor cells by L-ascorbic acid.' *Am J Clin Nutr.*, vol. 54, no. 6 Suppl, pp.1241S-1246S.
 49. De Laurenzi, V, Melino, G, Savini, I, Annicchiarico-Petruzzelli, M, Finazzi-Agrò, A, Avigliano, L 1995, 'Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell lines.' *Eur J Cancer.*, vol. 31A, no.4, pp.463-6.
 50. Du, J, Cullen, JJ, Buettner, GR 2012 'Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer.' *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1826, no.2, pp.443-57.
 51. Chen, Q, Espey, MG, Krishna, MC, Mitchell, JB, Corpe, CP, Buettner, GR, Shacter, E, Levine, M 2005, 'Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues.' *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 102, no.38, pp.13604-9.
 52. Chen, S, Liang, L, Wang, Y, Diao, J, Zhao, C, Chen, G, He, Y, Luo, C, Wu, X, Zhang, Y 2015, 'Synergistic immunotherapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide and interferon-α2b on the murine Renca renal cell carcinoma cell line in vitro and in vivo.' *Mol Med Rep.*, vol. 12, no.5, pp.6727-37.
 53. Xin, YF, Wan, LL, Peng, JL, Guo, C 2011, 'Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by Lycium barbarum polysaccharides through the suppression of oxidative stress.' *Food Chem Toxicol.*, vol. 49, no. 1, pp.259-64.
 54. Lu, CX, Cheng, BQ 1991, 'Radiosensitizing effects of Lycium barbarum polysaccharide for Lewis lung cancer'. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.*, vol. 11, no. 11, pp.611-2, 582.
 55. Gao, K, Liu, M, Cao, J, Yao, M, Lu, Y, Li, J, Zhu, X, Yang, Z, Wen, A 2014, 'Protective effects of Lycium barbarum polysaccharide on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells through the ROS-NO pathway.' *Molecules.*, vol. 20, no.1, pp.293-308.
 56. Erguven, M., Muramatsu, T., & Bilir, A. (2012). 'Midkine: from embryogenesis to pathogenesis and therapy (1ST ed.). İsviçre: Springer.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Afsoon SAEİDİ

İletişim Bilgileri

Adres : Yesilkent mah., Mehter Çeşme Bulvarı, Innovia 2, G Blok,
21. Kat, D: 150 İstanbul, Beylikdüzü.

Telefon : 05384762044

Mail : ladyafsoon@yahoo.com

2. Doğum Tarihi : 27/02/1978

3. Unvanı : Hemşire

4. Öğrenim Durumu : Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Hemşirelik	Firuzabad Üniversitesi	1997-2001
Yüksek Lisans	Gıda Güvenliği	İstanbul Aydın Üniversitesi	2014-2017
Doktora			

5. Akademik Unvanlar :

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri :

6.1. Yüksek Lisans Tezleri :

6.2. Doktora Tezleri:

7. Yayınlar:

7.1. Uluslar arası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Saeidi A. A method for allocating transition line losses and power over a particular generator in power systems. Organic Electronics Journal, 2015
2. Saeidi A. Design and calculation of a proportional-integral controller, based on the energy of a capacitor DC-link voltage, in order to improve the quality of power to compensate for a electrical load liner and non-liner. Quantum Electronics Journal, 2015
3. Saeidi A. Determination of number and position of controllers in Software-Defined Networks. Computers and Electronics in Agriculture Journal, 2015

7.2. Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler:

1. Afsoon Saeidi, Mine Erguven. Prekonsepsiyonel gıda takviyesi (Fertilovit®Plus), kültürde lösemi hücre çoğalmasını apoptoz ile durdurdu. Uluslararası Biyokimya Kongresi-2017, 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, SS-011, Turkish Journal of Biochemistry, 19-23 Eylül 2017, Atatürk Üniversitesi Erzurum.

7.3. Yazılan Uluslar arası kitaplar veya kitaplarda bölümler:

7.4. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

7.5. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler:

7.6. Diğer Yayınlar:

8. Projeler

9. İdari Görevler: CEO Barmen Elektronik Şirketi

10. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikleri : Shiraz Azad Üniversitesi

11. Ödüller

- 1.** Patents 2 Silver medal, World Festival of Germany, 2015.
- 2.** Patents Gold medal, World Festival in South Korea, 2015.
- 3.** Patents Silver medal, World Festival in South Korea, 2015.
- 4.** Patents Bronze medal, World Festival in South Korea, 2015.
- 5.** Patents Gold medal, World Festival in poland, 2015.
- 6.** Patents Silver medal, World Festival in poland, 2015.
- 7.** Patents silver medal, World Festival of Kuwait, 2015.
- 8.** Patents silver medal, World Festival of Romania, 2016.
- 9.** Patents Gold medal, World Festival of Romania, 2017.
- 10.** Patents Silver medal, World Festival of Romania, 2017.



