

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**



**İNSAN KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE
FARKLI SARIMSAK (*ALLIUM SATIVUM L.*)
EKSTRAKTLARININ ANTİKARSİNOJENİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

OMAR KHALİD HAMİD ALSHAWİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ NURAY EMİN

ARALIK - 2020

KASTAMONU

TEZ ONAYI

Omar Khalid Hamid Alshawi tarafından hazırlanan “**İnsan Kolorektal Kanser Hücreleri Üzerine Farklı Sarımsak (*Allium Sativum L.*) Ekstraktlarının Antikarsinojenik Etkisinin Araştırılması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **25.12.2020** tarihinde yapılmış olup, aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Halit MUĞLU Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem DÖNMEZ GÜNGÜNEŞ Hitit Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitüsü Müdürü	Prof. Dr. İzzet ŞENER	
------------------	-----------------------	-------

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Omar Khalid Hamid ALSHAWI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNE FARKLI SARIMSAK (*ALLIUM SATIVUM L.*) EKSTRAKTLARININ ANTİKARSİNOJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

OMAR KHALİD HAMİD ALSHAWİ

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ NURAY EMİN

Kolorektal kanser, üçüncü en yaygın kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenini oluşturmaktadır. Ailesel ve kalıtsal faktörlerin yanı sıra fiziksel hareketsizlik, obezite, sigara ve alkol tüketimi gibi çevresel yaşam tarzı, kolorektal kanser ile ilişkili bilinen risk faktörlerini oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kolorektal kanserin görülme sıklığındaki yükseliş, sayılan bu nedenlerin yanı sıra, artan yaşlanan nüfusa, sağlıksız modern beslenme alışkanlıklarına ve sigara kullanımı gibi risk faktörlerindeki artışla ilişkilidir. Yürütülen bu tez çalışmasında, sarımsak (*Allium Sativum*) ve ısıt fermentasyonla elde edilmiş siyah sarımsak ekstraktlarının, kolorektal kanser hücrelerinin (HCT116) proliferasyonu üzerine inhibisyon etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, beyaz ve siyah sarımsak kullanımı ile farklı yöntemlerle hazırlanmış dört farklı sarımsak ekstraktı kullanılarak bunların, HCT116 hücre hatları üzerindeki etkileri araştırılarak IC50 değerleri tespit edildi. Ayrıca, bu ekstraktların sağlıklı hücreler üzerine olan etkileri sıçan femur kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılarak belirlenmeye çalışıldı. Beyaz sarımsak ve siyah sarımsak maserat yağı elde etmek için baz yağ olarak zeytinyağı kullandı. Tez kapsamında beyaz sarımsak maserat yağı, siyah sarımsak maserat yağı, beyaz sarımsak uçucu yağı ve beyaz sarımsak etanol ekstraktlarının antikarsinojenik etkinliği test edildi. Zeytin yağı ve cisplatin kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen bulgular zeytinyağında hazırlanmış beyaz sarımsak maserat yağının ve siyah sarımsak maserat yağının, insan kanser hücrelerinin proliferasyonunu farklı oranlarda artırdığı tespit edildi. Beyaz sarımsak etanol ekstraktının insan kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ederek hücrelerin ölmesini sağladığı, ancak en etkili sitotoksik etkinin beyaz sarımsak uçucu yağının kullanımı ile elde edildiği görüldü. Mezenkimal kök hücreler ile yapılan kontrol testlerinde ise tüm ekstraktların sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği tespit edildi. Sonuç olarak, siyah sarımsak maserasyonunun antikarsinojenik etkisi üzerine, farklı baz yağların kullanımının araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, beyaz sarımsak uçucu yağlarının antikarsinojenik ajan olarak farmakolojide, sulu ekstraktlarının ise geleneksel tedavide bitkisel ilaç olarak kullanımı önerilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Kolorektal kanser; Taşköprü; *Allium sativum L.*; Siyah sarımsak; anticarsinojenisite; sitotoksisite.

Aralık 2020, Sayfa, 95

ABSTRACT

MSC THESIS

INVESTIGATION OF THE ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF DIFFERENT GARLIC (*ALLIUM SATIVUM L.*) EXTRACTS ON HUMAN COLORECTAL CANCER CELLS

OMAR KHALİD HAMİD ALSHAWİ

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. NURAY EMİN

Colorectal cancer is the third most common type of cancer and the fourth most common cause of cancer-related death. The familial and hereditary factors, environmental lifestyle such as physical inactivity, obesity, smoking and alcohol consumption constitute known risk factors associated with colorectal cancer. In addition to these reasons, the rise of colorectal cancer in developed countries can be attributed to the increasing aging population, unhealthy modern dietary habits, and the increase in risk factors such as smoking. In this thesis study, it was aimed to determine the inhibition effect of garlic (*Allium Sativum*) and black garlic extracts obtained by thermal fermentation on the proliferation of colorectal cancer cells (HCT116). In this direction, IC50 values were determined by investigating the effects of four different garlic extracts prepared with different methods using white and black garlic, and their effects on HCT116 cell lines. In addition, the effects of these extracts on healthy cells were tried to be determined by using rat bone marrow mesenchymal stem cells. Olive oil was used as the base oil to make maserate oil from white garlic and black garlic. In the scope of the thesis, the anticarcinogenic activity of white garlic maserate oil, black garlic maserate oil, white garlic essential oil and white garlic ethanol extracts was tested. Olive oil and cisplatin were used as controls. According to the obtained findings, it was determined that white garlic maserate oil prepared in olive oil and black garlic maserate oil increased the proliferation of human cancer cells at different rates. It was observed that white garlic ethanol extract caused the cells to die by inhibiting the growth of human colon cancer cells, but the most effective cytotoxic effect was achieved with the use of white garlic essential oil. In the control performed with mesenchymal stem cells, it was determined that extracts cytotoxic effects on healthy cells. As a result, it is thought that the use of different base oils should be investigated on the anticarcinogenic effect of black garlic maseration. In addition, white garlic essential oils and its aqueous extracts can easily be prepared and it is suggested that they can be used as anticarcinogenic agents in pharmacology and traditional treatments consecutively.

KEYWORDS: Colorectal cancer; Taşköprü; *Allium sativum*; black garlic; anticarcinogenicity; cytotoxicity.

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum yüksek lisans tez konusunu veren, tezimin hazırlığında ve yürütülmesinde bilgileri ve deneyimi ile bana yol gösteren, laboratuvar ortamında yapılması gereken her deney ve aşamada gerekli imkânları sunarak yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN'e, tez çalışmamın proje kapsamında desteklenmesine yardımcı olan, bilgileri ve tecrübeleri ile araştırmacı kimliğimin gelişmesine destek olan Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Ülke ÇALIŞKAN'a, kullanılan ekstraksiyonların hazırlanması için deney düzeneklerinin temininde ve kullanımında desteğini aldığım Dr. Öğr. Üyesi Nesrin İÇLİ'ye, Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Salma A. Taher MOHAMED, Kıymet NURAL, Havva YAZAR, Hilal ZENGİN, İpek CEYLAN ve Elit ÖZELÇAĞLAYAN ile her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli dostlarıma, Doku Kültür Laboratuvarı imkanlarını kullanmamda destekleri esirgemeyen Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dekanlığı'na, Doku Mühendisliği, Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarı imkânlarını kullanmamda desteklerini esirgemeyen Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve burada görevli değerli Hoca'larıma ve son olarak bugünlere gelmemi sağlayan, her şartta maddi ve manevi destekleri ile bana güç veren sevgili Aileme,

Teşekkürlerimi Sunarım.

Yürütülen bu yüksek lisans tez çalışmasında siyah sarımsak üretimi, sarımsak uçucu yağlarının üretimi ve bunların karakterizasyon işlemleri TÜBİTAK ARDEB 119O558 numaralı araştırma projesi kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmalar sırasında kullanılan HCT116 kolorektal kanser hücre hatları ve Kemik iliği Mezankimal Kök Hücreleri (kiMKH) Doku Mühendisliği, Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarı envanterine kayıtlı sıvı azotta stoklu hücre hatlarından kullanılmış olup, kiMKH'lerin kullanımının Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 1. Bölüm 4. Madde u) Fıkrası'nda belirtilen 3R ilkesi tanımlaması ve 8.Madde k) fıkrası gereğince HADYЕК iznine tabi olmadığı KÜ-HADYЕК'in 14.12.2020 tarihli 6 sayılı toplantısının 38 numaralı kararı ile bildirilmiştir.

OMAR KHALID HAMID ALSHAWI

Kastamonu, 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser ve Kolon Kanseri	1
1.2 Kanser Epidemiyolojisi.....	2
1.3 Kanser Tedavi Yöntemleri	5
1.3.1 Kemoterapi.....	5
1.3.1.1 Cisplatin.....	6
1.3.2 Radyasyon Terapisi.....	7
1.3.3 Biyolojik Terapi	9
1.3.4 Gen Terapisi	9
1.3.5 Hormon Tedavisi.....	11
1.3.6 Hedefli Terapi	11
1.3.7 Kanser Aşıları	12
1.3.8 Kemik İliği ve Kök Hücre Tedavisi.....	13
1.3.8.1 Allojenik hücre nakli	13
1.3.8.2 Otolog hücre nakli	13
2. KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN DOĞAL ÜRÜNLER	15
2.1 Doğal Ürünlerin Sentetik Maddelere Göre Avantajları ve Dezavantajları	15
2.2 Doğadan İlaç Örnekleri	16
2.3 Deniz Canlılarının Terapötik Kullanımı	17
2.3.1 Scorpaenidae Balıklar	17
2.3.2 Zehir Toplama ve Ekstraksiyon	17
2.4 Kanser Tedavisinde Şifalı Bitkiler.....	18
2.5 Doğal Ürünlerin Kanser Kemoterapisine Etkisi	20
2.5.1 Biyolojik Aktiviteye Yatkınlık	20
2.6 Sarımsağın Tıbbi Değeri	21
2.6.1 Ateroskleroz ve Hiperlipidemi.....	23
2.6.2 Yüksek Tansiyonu Etkisi	23
2.6.3 Kardiyovasküler Hastalık Üzerindeki Etkisi.....	24
2.6.4 Sarımsağın Diyabet Üzerine Etkisi	24
2.6.5 Sarımsağın Hepatotoksisite Üzerine Etkisi.....	25
2.6.6 Antimikrobiyal Özellikler	26
2.6.7 Antiprotozoal Aktivite	27
2.6.8 Antifungal Aktivite	28
2.6.9 Antiviral Aktivite	29
2.6.10 Anti-Tümör Aktivite	30
2.7 Siyah Sarımsak.....	31

2.7.1	Siyah Sarımsağın Antikarsinojenik Etkisi	32
3.	HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN TEMEL İLKELERİ	34
3.1	Hücre Kültüründe Temel Gereksinimler	34
3.1.1	Ortam Koşulları	34
3.1.2	Serum	35
3.1.3	Serum İçermeyen Vasat	35
3.1.4	Substrat	36
3.1.5	Fiziki Çevre	36
3.2	Birincil Hücre Kültürü	37
3.3	Kanser Hücre Hatları	37
4.	MATERYAL VE METOD	39
4.1	Materyal	39
4.2	Metot	40
4.2.1	Serbest Yağ Asitliğinin Tayini	40
4.2.2	Siyah Sarımsağın Hazırlanması	41
4.2.3	Ekstraksiyon Çalışmaları	41
4.2.3.1	Beyaz sarımsak lipojenik maserasyon ekstraktının hazırlanması ..	42
4.2.3.2	Siyah sarımsak lipojenik maserasyon ekstraktının hazırlanması ..	42
4.2.3.3	Sıcak ekstraksiyon ile sarımsak ekstraktının eldesi	42
4.2.3.4	Beyaz sarımsağın soğuk ekstraksiyonu	42
4.2.3.5	Siyah sarımsağın soğuk ekstraksiyonu	43
4.2.3.6	Beyaz sarımsak uçucu yağlarının eldesi	43
4.2.4	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometre (FTIR Analizi)	44
4.2.5	Kromatografik Analizler	45
4.2.5.1	Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) Analizi ..	45
4.2.5.2	Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) analizi	45
4.2.6	Stok Çözeltilerin Hazırlanması	46
4.2.7	Hücre Kültürü Çalışmaları	47
4.2.7.1	HCT116 hücre hatlarının hazırlanması	47
4.2.7.2	Mezenkimal kök hücre hatlarının hazırlanması	47
4.2.7.3	Sarımsak reaktiflerinin hazırlanması ve uygulanması	48
4.2.7.4	Kontrol analizleri	48
4.2.7.5	MTT analizi	49
4.3	Mikroskopik İncelemeler	50
4.4	İstatistiksel Analiz	50
5.	ARAŞTIRMA BULGULARI	51
5.1	FTIR Analizi	51
5.2	Sarımsak Ekstraktlarının GC-MS ile Bileşen Analizi	53
5.3	LC-MS/MS Analizi ile Bileşen Analizi	53
5.4	Mikroskopik Analiz	56
5.5	MTT Analizi	58
5.5.1	Kalitatif MTT Analizi	58
5.5.2	MTT ve İstatistiksel Analizi	62
5.5.2.1	Cisplatin kontrol analizi	62
5.5.2.2	HCT116 hücrelerinin istatistiksel MTT analizi	63
5.5.2.2.1	Sarımsak uçucu yağ indüksiyonu	63
5.5.2.2.2	Sarımsak sıcak ekstrakt indüksiyonu	64
5.5.2.2.3	Maserat sarımsak yağları ve zeytinyağı kontrol indüksiyonu ...	65
5.5.2.2.4	Sarımsak soğuk ekstraktlarının indüksiyonu	68

5.5.2.2.5	Maserat yağlarının karşılaştırılması.....	69
5.5.2.2.6	Uçucu yağ ve beyaz sarımsak sıcak ekstraktının sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.....	71
5.5.2.3	Mezankimal kök hücrelerin istatistiksel MTT analizi.....	73
5.6	Ekstraktın İnsan Kolon Kanser Hücre Hattı Ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Üzerine Etkili Dozları Göstergesi	75
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	79
6.1	Öneriler	83
KAYNAKLAR.....		87
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	5



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Kolon kanseri	2
Şekil 1.2 2012'de kolorektal kanserin tahmini yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranı (standart: dünya nüfusu)	3
Şekil 1.3 Kemoterapi.....	6
Şekil 1.4 Sisplatinin kimyasal yapısı	7
Şekil 1.5 Kanserın Radyasyon Tedavisi	8
Şekil 1.6 Gen tedavisi	10
Şekil 1.7 Mide kanserinin moleküler hedefli tedavileri	12
Şekil 1.8 Doktorlar kök hücreleri toplar	14
Şekil 2.1 Alkaloid, Morfin	16
Şekil 2.2 Boldo yaprakları.....	18
Şekil 2.3 Vinca	19
Şekil 2.4 Sarımsak soğanı	21
Şekil 2.5 Ateroskleroz.....	23
Şekil 2.6 Allisin İçeren Sarımsak Ekstraktlarının <i>Burkholderia cepacia</i> Kompleksine Karşı Antimikrobiyal Aktivitesi	26
Şekil 2.7 Sarımsağın antifungal aktivitesi.....	29
Şekil 4.1 Siyah sarımsaklar, ham Taşköprü sarımsaklarının nem ayarlı etüvde 40 gün inkübasyonu ile hazırlandı. İnkübasyon sonucu oluşan siyah sarımsaklar elde edildi.....	41
Şekil 4.2 Siyah sarımsağın etanol içerisinde oda sıcaklığında gerçekleştirilen ekstraksiyonu	43
Şekil 4.3 Clevenger düzeneği ile sarımsak uçucu yağlarının elde edilmesi işlemi.	44
Şekil 4.4 Hazırlanan stok çözeltiler.	46
Şekil 4.5 HCT116 hücrelerinin indüksiyonu.	48
Şekil 4.6 MTT reaktifi ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonrası görünümü.	49
Şekil 5.1 Maserat yağları, baz yağ olarak zeytinyağı, uçucu yağ bileşeni ile soxhlet ekstraktının FTIR spektrumu.	52
Şekil 5.2 kiMKH'lere BSM (A: 1. gün, B:3. gün), SSM (C: 1. gün, D:3. gün), ZY/kontrol (E: 1. gün, F:3. gün), BS_SOX (G: 1. gün, I:3. gün), BSU (J: 1. gün, K:3. gün) indüksiyonu uygulanmış ve kontrol (L: 1. gün, M:3. gün) gruplarının invert faz kontrast mikroskobu görüntüleri. (10X büyütme ile çekilmiştir)	57
Şekil 5.3 Sarımsak reaktifleri HCT 116 hücrelerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu 5 ppt doz için: BSM (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSM (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün), ZY/kontrol (G: 1. gün, H:3. gün I:5.gün), BS_SOX (J: 1. gün, K:3. gün L:5.gün), BSU (M: 1. gün, N:3. gün O:5.gün) ve pozitif kontrol Cisplatin (P: 1. gün, R:3. gün S:5.gün).)Görüntüler Leica invert	

	faz-kontrast mikroskobu görünür alan ışık mikroskobisi kamera sistemi ile elde edildi.)	59
Şekil 5.4	Sarımsak reaktifleri HCT 116 hücrelerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, 60 ppt doz için indüksiyon öncesi: BSS (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSS (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün), ve MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu BSS (G: 1. gün, H:3. gün I:5.gün), SSS (J: 1. gün, K:3. gün L:5.gün). (Görüntüler Leica invert faz-kontrast mikroskobu floresans kamera sistemi ile elde edildi.)	60
Şekil 5.5	Sarımsak reaktifleri kiMKH'lerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu 5 ppt doz için: BSM (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSM (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün), ZY/kontrol (G: 1. gün, H:3. gün I:5.gün), BS_SOX (J: 1. gün, K:3. gün L:5.gün), BSU (M: 1. gün, N:3. gün O:5.gün) ve pozitif kontrol Cisplatin (P: 1. gün, R:3. gün S:5.gün)	61
Şekil 5.6	Soğuk ekstraksiyon ile hazırlanmış BSS ve SSS reaktifleri kiMKH'lerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu 5 ppt doz için: BSS (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSS (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün),	62
Şekil 5.7	Cisplatin uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.	63
Şekil 5.8	SU uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.	64
Şekil 5.9	BS_SOX uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.	65
Şekil 5.10	BSM, SSM ve ZY uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.	67
Şekil 5.11	BSS ve SSS uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.	69
Şekil 5.12	BSM, SSM ve ZY uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin günlere göre karşılaştırılması.	70
Şekil 5.13	BSU ve BS_SOX uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin günlere göre karşılaştırılması.	72
Şekil 5.14	Kontrol grubu olarak kullanılan kiMKH'lerine sarımsak reaktifleri uygulaması sonrası yapılan MTT analizi sonucu, hücrelerin sağ kalım ve/veya proliferasyon artışına olan etkisinin %canlılık olarak günlere göre dağılımı: A. Beyaz sarımsak masarat, B. siyah sarımsak masarat, C. kontrol zeytinyağı, D. Uçucu Beyaz sarımsak yağı, E. Beyaz sarımsak ekstraktı.	74

Şekil 5.15 Zeytinyağı, beyaz sarımsak maserat, siyah sarımsak maserat, sıcak ekstrakt , uçucu yağ ve soğuk ekstraktın insan kolon kanser hücre hattı ve mezenkimal kök hücrelerin üzerine etkili dozlarının karşılaştırmalı olarak göstergesi78



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1 Çalışılan reaktif doz konsantrasyonları. Öncelikle maserasyon denemeleri yapılmış olup, elde edilen verilere göre diğer deney gruplarının dozları belirlenmiştir.	46
Tablo 5.1 GC-MS analizi sonucu <i>Allium sativum</i> uçucu yağının kimyasal bileşimi.	53
Tablo 5.2 BS_SOX ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.	54
Tablo 5.3 BSM ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.	55
Tablo 5.4 BSS ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.	55
Tablo 5.5 SSS ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KRK	: Kolorektal Kanser
HCT116	: Kolorektal Kanser Hücre Hattı
kiMKH	: Kemik İliği Mezankimal Kök Hücre
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
IMRT	: Yoğunluk Ayarlı Radyasyon Terapisi
BRM	: Biyolojik Tepkiyi Modifiye Ediciler
PSA	: Prostatik Spesifik Antijendir
CEA	: Karsino-Embriyonik Antijen
TAA	: Tümörle İlişkili Antijenler
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
FBG	: Açlık Kan Şekeri
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
DATS	: Dialil Trisülfür
DADS	: Dialil Disülfürün
DAS	: Dialil Sülfid
OSB	: Organosülfür Bileşikleri
BME	: Eagle'ın bazal ortamı
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı
α-MEM	: Eagle'ın minimum esansiyel ortamı
ECM	: Hücre Dışı Matris
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FTIR	: Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
BS	: Beyaz Sarımsak
SS	: Siyah Sarımsak
BSA	: Beyaz Sarımsak Maseratı
SSM	: Siyah Sarımsak Maseratı
BSUY	: Beyaz Sarımsak Uçucu Yağları

1. GİRİŞ

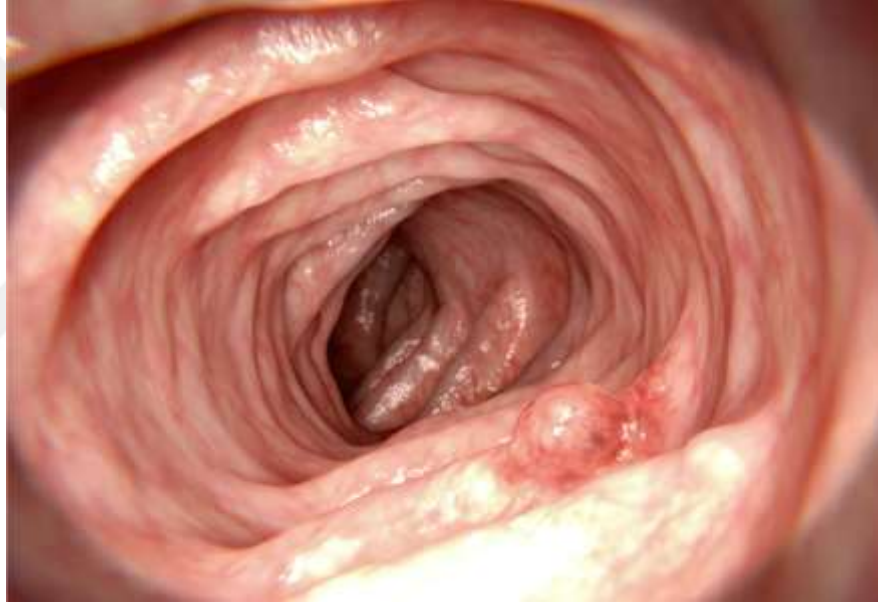
Kanser, bir grup anormal hücrenin normal hücre bölünmesi kurallarından farklı olarak kontrolsüz bir şekilde bölündüğü bir hastalık olarak tanımlanabilmektedir. Normal hücreler hücrenin bölünmesi, başka bir hücreye farklılaşması veya ölmesi gerektiğini belirleyen sinyallere tabidir. Kanser hücreleri, bu sinyallerden bir dereceye kadar bağımsızlık geliştirerek kontrolsüz büyüme ve çoğalmaya neden olmaktadır. Bu çoğalmanın devam etmesine ve yayılmasına izin verilirse ölümcül olabilmektedir. Aslında kansere bağlı ölümlerin neredeyse %90'ı tümörün yayılmasından kaynaklanmaktadır ve bu yayılma sürecine metastaz adı verilmektedir (Hejmadi, 2014).

Kanser genellikle katı bir tümör olarak oluşmaktadır. Ancak lösemi (kan kanseri) gibi bazı kanserler tümör oluşturmamaktadır. Bunun yerine, lösemi hücreleri kan ve kanın dolaştığı bütün doku ve organları kapsamaktadır. Bazı kanser türleri ise kolayca tedavi edilebilirken, diğerleri büyük ölçüde ilk farklılaşan hücrenin ortaya çıktığı vücut organına (akciğer, gırtlak, kalın bağırsak vb.) bağlı olarak, teşhis edildikleri zaman genellikle tamamen tedavi edilemez hale gelmektedirler. Ortaya çıkan semptomlar ve tedaviye yaklaşım da başlangıç yerine göre değişmektedir. Bu nedenle doktorların farklı organlardan kaynaklanan tümörleri farklı hastalıklar olarak görmeleri alışılmış bir durum haline gelmiştir (Doll ve Peto, 1981). Farklı kanser hücreleri, farklı davranışlar gösterebilmekle birlikte tüm tümörler kötü huylu olmayıp, bazı tümörler iyi huyludur. İyi huylu tümörler büyümmez ve yaşamı tehdit etmezler (Sudhakar, 2009).

1.1 Kanser ve Kolon Kanseri

Kolorektal kanser (KRK), her iki cinsiyet için de en yaygın üçüncü tanı ve en ölümcül ikinci malignitedir. KRK'nin hem güçlü çevresel ilişkileri hem de genetik risk faktörleri bulunmaktadır. Yeni vakaların görülme sıklığı ve ölüm oranı, muhtemelen kanser taramasındaki artış ve daha iyi tedavi yöntemleriyle ilişkili olarak, genç yetişkinler (50 yaş altı) dışında, son yıllarda azaldığı görülmektedir. Tüm KRK'lerin yaklaşık %5'i kalıtsal sendrom olan Ailevi Adenomatöz Polipoz ve Lynch sendromuna yol açmaktadır (Recio-Boiles vd., 2019).

Kolorektal kanserin etiyolojisinde hem genetik hem de çevresel faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Kolorektal kanserlerin çoğu sporadiktir; hastaların yaklaşık dörtte üçünün olumsuz aile öyküsü vardır. Çoğu Batı toplumunda, kolorektal kanser için ortalama yaşam boyu risk %3–5 aralığındadır. Ancak bu risk, kolorektal kanserli birinci derece aile üyesi olan ve 50-70 yaşlarında teşhis edilen bireylerde neredeyse iki katına; tanı anında birinci derece akraba 50 yaşın altında ise risk üç katına çıkmaktadır. İki veya daha fazla etkilenen aile üyesi olan bireylerde risk daha da artmaktadır. Sporadik kolorektal kanser için, ailevi yatkınlıkla artan risk, düşük penetranslı genetik faktörleri yansıtmaktadır. Bu nedenle pozitif aile öyküsü kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %5-20'sinde rol oynamaktadır (Kuipers vd., 2015).

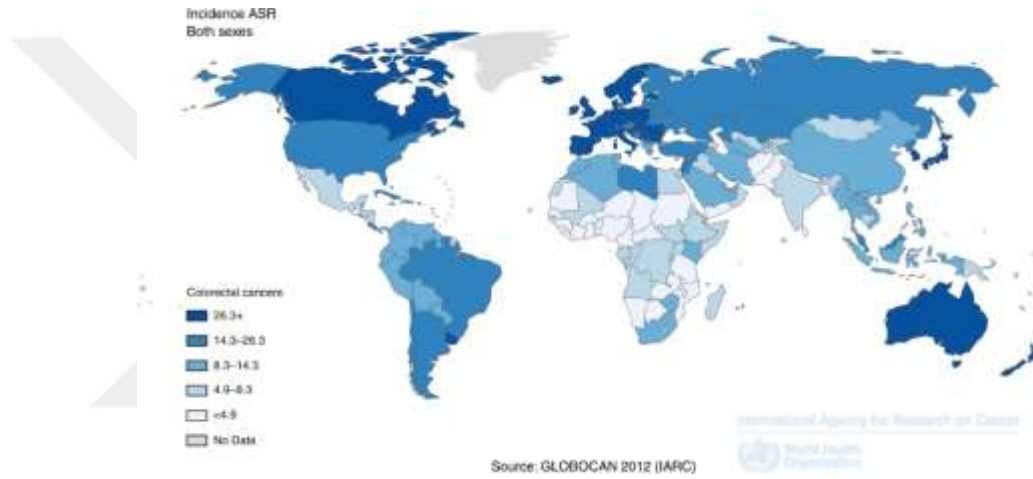


Şekil 1.1 Kolon kanseri (URL 2020)

1.2 Kanser Epidemiyolojisi

Küresel epidemiyolojik araştırmalar, çevresel ve mesleki çalışmalarda kullanılan kimyasalları *potansiyel karsinojen* olarak tanımlamıştır. Kanser hücrelerindeki genetik değişikliklerin geri döndürülemez olması ve malign değişikliklerin bir nesil hücreden diğerine aktarılması, esasen sigara dumanı ve çevresel kimyasallar tarafından DNA'nın modifiye edilmesi ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Kimyasal karsinojenlerin etkisiyle DNA sarmalında oluşan hasar rastgele meydana gelmekte ve ilişkili fenotipik değişikliklerin seçilmesiyle karsinojenite belirlenebilmektedir. Demografik kayma,

kentleşme, sanayileşme, yaşam tarzlarındaki değişiklikler, nüfus artışı ve yaşlanma, ülkede epidemiyolojik geçişe katkıda bulunmaktadır. Nüfus büyüklüğündeki artış ve bulaşıcı hastalıkların kontrolünü takiben yaşam şartlarındaki iyileşmeden kaynaklanan yaşlı nüfusun oranındaki artış nedeniyle yeni kanser vakalarının sayısı da hızla artmaktadır (Murth vd., 2004). Dünya çapında sekiz ölümden biri, AIDS, tüberküloz ve sıtmadan daha fazla ölüme neden olan kanserden kaynaklanmaktadır. Kanser, ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde kalp hastalıklarından sonra ikinci önde gelen ölüm nedeniyken gelişmekte olan ülkelere, kalp hastalıkları ile ishale neden olan ender sendromları takip eden önde gelen üçüncü ölüm nedenidir (Garcia vd., 2007).



Şekil 1.2 2012'de kolorektal kanserin tahmini yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranı (standart: dünya nüfusu) (Globocan, 2012)

Gelişmekte olan ülkelere, çocuk ölümleri ve bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin azalması ile daha fazla insanın ileri yaşlara kadar hayatta kalması kanser yükünü bir hayli artırmaktadır. Ayrıca, gelişmekte olan ülkelereki insanların sigara tüketimi, daha yüksek doymuş yağ, kalorili gıdaların kullanımı ve fiziksel aktivitenin azaltılması gibi batı yaşam tarzı davranışlarını benimsenmesiyle birlikte, önleyici tedbirlerin yaygın olarak uygulanmaması durumunda batı ülkelerindeki gibi kanser oranları diğer toplumlarda da hızla artma riski oluşturmaktadır (Garcia vd., 2007).

Başlıca risk faktörlerinin yaygınlığı, kanser taraması, tedavinin kullanılabilirliği ve kalitesi, raporlamanın eksiksizliği, yaş dağılımı gibi faktörlere bağlı olarak tıbbi uygulamaların bulunabilirliği ve kullanımı gibi bölgesel farklılıklar kanser tiplerinin bölgesel farklılıklarına neden olmaktadır. Örneğin, tütün kanserin en önemli risk

faktörüdür ve bunu diyet uygulamaları, yetersiz fiziksel aktivite, alkol tüketimi, virüslere ve cinsel davranışlara bağlı enfeksiyonlar takip etmektedir (Murth vd., 2004). Araştırmalar, meme kanseri ölümlerinin %19'unun ve kolorektal kanser mortalitesinin %26'sının artan kilo ve fiziksel hareketsizlik ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Diyet faktörlerini, yerleşim yerlerindeki kanser insidansı ve mortalite ile ilişkilendirmek için epidemiyolojik çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalarda genel olarak yağ, kolon, rektum, meme, yumurtalık ve prostat kanseri riski ile en fazla ilişkili olan diyet bileşeni araştırılmaktadır. Yıllar içerisinde yapılan bu araştırmalar neticesinde, önlenabilir kanser riskleri olarak olası faktörlerin listeleri oluşturulmuş ve yeni araştırmalarla da bu listeler sürekli güncellenmiştir. Kanser kaynaklı ölüme en fazla, diyetin neden olduğu tahmin edilmektedir. Araştırmalara göre diyet faktörlerinin kanser ölümlerinin %35'ine sebep olduğu, ancak güven sınırlarının %10-70 olduğu görülmektedir (Kritchevsky, 2003).

Epidemiyolojik bir çalışmada, 591,978 Avrupa'lı denekte diyet lifi alımı ve kolon kanseri insidansı arasındaki ilişki incelenmiş ve düşük lifli diyet tüketen deneklerin lif alımının artırılmasının kolorektal kanser riskinde %40'luk bir düşüşe sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Artan alkol tüketimi, başta oral ve farinks, larinks, özofagus, karaciğer veya kolorektal ve meme gibi çeşitli yerlerdeki kanserlere neden olduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Shetty vd., 2009). Yüksek miktarda veya düzenli alkol tüketimi, 351,000 kanser ölümüne, kronik hepatit B virüsü enfeksiyonuna ve dünyadaki karaciğer kanseri ölümlerinin yarısına neden olmaktadır.

Kanser vakalarının ve ölümlerinin sıklığı da coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Gelişmekte olan ülkelerdeki erkek (mide ve karaciğer) ve kadınlarda (serviks ve mide) önde gelen üç kanserden ikisi enfeksiyonla ilişkilendirilmektedir. Mide kanseri, dünya çapında enfeksiyonla ilişkili en yaygın kanser olmaya devam etmekte, bunu karaciğer ve serviks kanserleri izlemektedir. En sık teşhis edilen kanser Doğu ve Güney Afrika'da serviks uteri, Kuzey ve Batı Afrika'da meme kanseri ve Kaposi'nin Orta Afrika'daki sarkom kanseridir (Sitas vd., 2008).

İnsidans ve mortalite oranları, kanser oluşumunda en sık kullanılan iki parametredir. Bu istatistik faktörleri, belirli bir popülasyonda belirli bir zaman

diliminde sırasıyla yeni teşhis edilen kanser vakalarının veya ölümlerinin sayısını ölçmektedir. İnsidans ve ölüm oranları genellikle yılda 100,000 kişi başına ifade edilmektedir. Tüm kanserlerin %5-10'unun kalıtsal olduğu, yani genetik değişikliği aileden kalıtsal yolla alan bireylerin belirli bir kanser oluşumu için çok yüksek oranda risk taşıdığı tahmin edilmektedir. Birçok kanserin kalıtsal ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Garcia vd., 2007). birçok toplumda kanser kayıtları ve hayatta kalma bilgileri tutulmadığından dünyada kanseri yenerek iyileşenlerin toplam sayısı bilinmemektedir. Kanser öyküsü olan kişilerin sayısının, hayatta kalmadaki iyileşme, nüfusun beklenen büyümesi ve yaşlanması nedeniyle önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir (Parkin 2002).

1.3 Kanser Tedavi Yöntemleri

1.3.1 Kemoterapi

Kemoterapi ajanları, DNA sentezini veya fonksiyonunu etkileyerek kanser hücrelerini öldürmektedir. Cerrahi ve radyasyon tedavisi belirli bölgelerde yer alan kanserlerin tedavisi ile sınırlı iken, kemoterapinin en büyük avantajı yaygın veya metastatik kanseri tedavi edebilmesidir. Hızlı büyüyen hücrelerin yavaş büyüyen hücrelerden daha fazla etkilenmesiyle, birçok kemoterapi ajanının ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Bazı kemoterapi ajanları, bir hücreyi döngünün sadece bir fazında öldürebilir olduğu durumlarda hücre döngüsü spesifik iken, tüm fazlarda aktif olan hücrelerde hücre döngüsü spesifik değildir. Saç folikülleri, deri ve gastrointestinal sistemi oluşturan hücreler en hızlı büyüyen hücrelerden bir kısmıdır, bu nedenle kemoterapinin etkilerine en duyarlı olanlardır denilebilir. Çoğu kemoterapi ajanının kanser hücrelerini öldürme yolu DNA sentezini veya fonksiyonunu etkilemektir. En yaygın kemoterapi ajanları alkile edici ajanlar, antimetabolitler, antrasiklinler, bitki alkaloidleri, antitümör antibiyotikler, taksanlar ve platinlerdir (Mihlon vd., 2010).



Şekil 1.3 Kemoterapi (URL 2020)

1.3.1.1 Cisplatin

Cisplatin, cis-diamminedichloroplatinum (II) olarak da adlandırılan, kare düzlemsel geometriye sahip metalik (platin) bir koordinasyon bileşiğidir. Oda sıcaklığında beyaz, koyu sarı ve sarı-turuncu renklerde olan kristal bir tozdur. Suda az çözünür ve dimetilprimanid ve N, N-dimetilformamidde tamamen çözünür. Cisplatin normal sıcaklık da ve basınç altında sabit, ancak zamanla yavaş yavaş trans-izomere dönüşebilir (Dasari, 2014).

Cisplatin ilk olarak 1844'te M. Peyrone tarafından sentezlenmiş ve kimyasal yapısı ilk olarak 1893'te Alfred Werner tarafından açıklanmıştır. Bununla birlikte, bileşik yapısına dair açıklamalar 1960'larda Rosenberg'in ilk gözlemleri sonucunda elde edilmiştir. Michigan Eyalet Üniversitesi, platin ağ elektrotlarının bazı elektroliz ürünlerinin *Escherichia coli*'deki hücre bölünmesini engelleyebildiğine dikkat çekerek, bu ürünlerin kanser kemoterapisinde olası kullanımına büyük ilgi uyandırmıştır. Bu aktiviteden sorumlu ajan olarak cis-diklorodiamminplatin (II) (cisplatin, r) tanımlanmasından bu yana, kanser tedavisinde platin, paladyum ve diğer temel metallerin koordinasyon bileşiklerinin kullanımına dikkat çekilmiştir (Dasari, 2014).

Cisplatin özellikle yumurtalık kanseri, testisler, baş, boyun ve katı tümörler dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde antikarsinojenik aktivite göstermektedir. Cisplatinin

sitotoksik özelliklere sahip olduğu 1960'larda keşfedilmesiyle birlikte 1970'lerin sonunda, enfeksiyöz hücre kanserlerinin sistemik tedavisinde anahtar bileşen olarak yer almıştır. Kanser için yaygın olarak kullanılan birçok kemoterapi ilacı arasında cisplatin en çok kullanılan ilaçlardandır. Cisplatinin kanser tedavisi için FDA onayının 1978'de alınması, platin (II) ve diğer metal içeren bileşiklerin potansiyel antikanser ilaçları olarak değerlendirilmesine yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır (Dasari, 2014).



Cisplatinin sarkomalar, yumuşak doku, kemik, kas ve kan damarı kanseri gibi farklı kanser türleriyle mücadele ettiği klinik olarak kanıtlanmıştır. Bu tür kanserler son zamanlarda daha iyi anlaşılmış ve bu nedenle yaşamı daha az tehdit edici hale gelmiş olsa da, tedavileri konusunda birçok önemli zorluk hala devam etmektedir. Ayrıca, ilaç direnci ve önemli yan etkileri nedeniyle, cisplatinin diğer kanser ilaçlarıyla kombinasyonu yapılarak oluşturulan tedavilerde, birçok kanser tipi için yeni terapötik stratejiler uygulanmaktadır. Örneğin bir araştırmada, cisplatin ve ilgili platin bazlı ilaçların fizikokimyasal özelliklerinin kapsamlı incelenmesi, çeşitli kanserlerin tedavisi için (tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde) kullanımlarının tartışılması, molekülerlerinin incelenmesi, etki mekanizmaları ve potansiyel yan etkileri detaylı olarak ortaya konulmuştur (Dasari, 2014).

1.3.2 Radyasyon Terapisi

Radyasyon terapisinde, kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili X-ışınları kullanılmaktadır. Yüksek enerjili ışınlar kanser hücrelerinin DNA sarmalına zarar

vermekle birlikte normal hücrelerde de düşük oranda DNA hasarı oluşmaktadır (Sadeghi vd., 2010). Ancak normal hücreler kanser hücrelerinden daha yavaş çoğaldıkları için radyasyon hasarını kendi kendilerine onarabilmektedir.

Kemoterapi gibi sistemik tedavilerin aksine, radyasyon tedavisi lokal bir tedavi olup, vücudun belirli bir alanını tedavi eder. İki temel tedavi yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan ilki bir radyasyon ışınının vücudun dışından yönlendirildiği dış radyasyon tedavisi ile aynı zamanda vücudun içine cerrahi olarak bir radyoaktif kaynağının yerleştirildiği brakiterapi veya implant tedavisi olarak da adlandırılan iç radyasyon tedavisidir. Radyasyon X-ışını tedavisi, kobalt tedavisi, proton tedavisi veya yoğunluk ayarlı radyasyon tedavisi (IMRT) olarak da adlandırılır ve doğrusal bir hızlandırıcı kullanılarak uygulanmaktadır. Tümörün yakınında bulunan normal organlarda hasar oluşumunu önlemek için 3D konformal radyoterapi olarak bilinen bir işlem kullanmak mümkündür. Bilgisayar yazılımları, radyasyon ışınlarının tümöre uygulama dozunun daha hassas ayarlanmasına izin vermektedir (Viswanathan ve Erickson, 2009).



Şekil 1.5 Kanser Radyasyon Tedavisi (URL 2020)

Kullanılan diğer tedavi yöntemi ise dahili radyasyon tedavisidir. Bu tedavi radyoaktif maddenin küçük parçaları vasıtasıyla ve içine sıvı radyoaktif bir maddenin enjekte edilmesiyle implante edilmiş bir rezervuar kullanarak kanser hücrelerine mümkün olduğunca yakın olan yüksek enerjili ışınların kaynağını yerleştirmektedir (Balakin, 2011).

1.3.3 Biyolojik Terapi

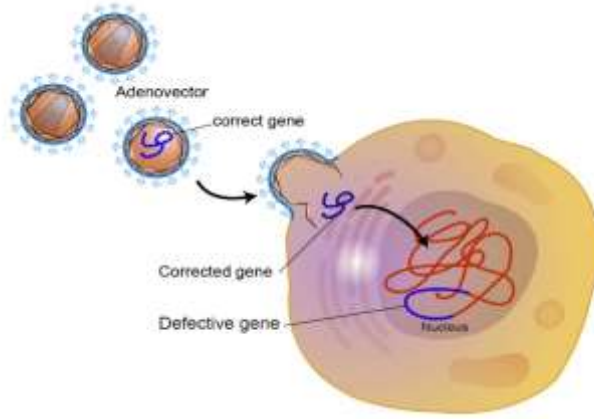
Biyolojik ajanlar, biyolojik tepkiyi modifiye ediciler (BRM'ler) ve immünoterapi olarak da adlandırılan biyolojik tedaviler, hastalığın önlenmesi için bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine yardımcı olmaktadır. Biyolojik terapinin amacı, kanserle savaşıma yeteneğini arttırmak ve diğer tedavilerin yan etkilerinin hafifletilmesini sağlamaktır. Bu, vücutta doğal olarak bulunan ya da hastadan alınan vücut hücrelerinin laboratuvar ortamında biyolojik maddelerle etkileştirilmesi sonucunda hasarlı hücrelerin tekrardan eski formuna dönmesini sağladıktan sonra hastaya geri nakledilmesi ile olmaktadır. Farklı biyolojik tedaviler olduğu gibi bağışıklık sistemini uyarmanın da birçok yolu vardır. Bu biyolojik maddelerden bazıları: interferon, interlökin, koloni uyarıcı faktörler, monoklonal antikorlar, aşılar ve gen terapisi. Biyolojik tedavilerin yan etkileri arasında ateş, titreme, vücut ağrıları, bulantı/kusma, iştah kaybı ve yorgunluk bulunmaktadır. Hasta kişiye verilen dozların konsantrasyonu ve tedavinin uygulanış şekline bağlı olarak, hastanın kan basıncında düşüş, ciltte döküntü veya kızarıklık gözlemlenebilir ve enjeksiyon bölgesinde şişmeler oluşabilir (Oldham vd., 2009).

Biyolojik terapiler ağızdan, damardan, deri altından (deri altı) ve kas içinden (kas içine) dahil olmak üzere farklı yollarla uygulanabilmektedir. Ayrıca belirli bir bölgenin tedavi edilmesi için biyolojik madde doğrudan da vücut boşluğuna yerleştirilebilmektedir. Örneğin mezotelyomaya (bir tür plevral kanser) karşı yönlendirilen gen tedavisi doğrudan torasik boşluğa enjekte edilebilmektedir (Oldham vd., 2009).

1.3.4 Gen Terapisi

Gen terapisi, vücutta eksik veya işlev görmeyen genlerin yerini almak için farklı yollarla uygulanabilir. Örneğin, tümör baskılayıcı p53' ü eksik olan ya da bir mutasyon nedeniyle işlev görmeyen bir kopyası olan hücreler, hücreye p53' ün işleyen kopyaları eklenerek oluşacak sorunun önüne geçilebilir (Vogelstein vd., 2004). Onkogenlerin işlevleri durdurularak, kanser hücrelerinin metastaz yapması önlenir. Genler, kanser hücrelerinin diğer hücrelerden ayrımının yapılabilmesi için kanser hücrelerini

yabancı istilacılara dönüştürerek bağışıklık sistemi oluşturmasıyla, sağlıklı hücreleri tedavinin yan etkilerinden korumaktadır. Gen terapisi yöntemi ile kanser hücrelerine genler eklenerek, kanserli hücreyi kemoterapiye (SM Wold vd, 2013), radyasyon terapisine veya hormon tedavilerine karşı daha savunmasız hale getirerek hasta kişinin iyileşmesi sağlanmaktadır. Bu genler, kanser hücrelerinin yeni damarlar oluşturarak kan yoluyla metastaz oluşturmasının da önüne geçmek için kullanılabilir. Gen terapisi spesifik vektör olarak kullanılan virüsler vasıtasıyla uygulanmaktadır (Burke vd., 2002). Bu virüsleri içeren hücreler *in vitro* ortamda olgunlaştırılır ve daha sonra intravenöz infüzyonla hastaya tekrardan vücut boşluğuna (yani akciğer) veya bir tümör dokusunun bulunduğu bölgeye enjekte edilir. Gen terapisi hala deneysel aşamalarda olduğu için, yapılan araştırma çalışmaları geliştirilmektedir.



Şekil 1.6 Gen tedavisi (URL 2020)

Hastanın bağışıklık sistemi, yabancı vektöre birtakım tepkiler oluşturmaktadır. Örneğin; ateş, şiddetli titreme (sertleşmeler), kan basıncında düşüş, bulantı, kusma ve baş ağrısı gibi semptomlar infüzyondan 24-48 saat içinde giderilmektedir. Bununla birlikte, uzun vadeli yan etkiler net olarak ortaya konulmamıştır. Bugüne kadar, gen terapisi genellikle kemoterapi gibi diğer terapilerle birlikte kullanılmaktadır (Jia vd, 2012).

1.3.5 Hormon Tedavisi

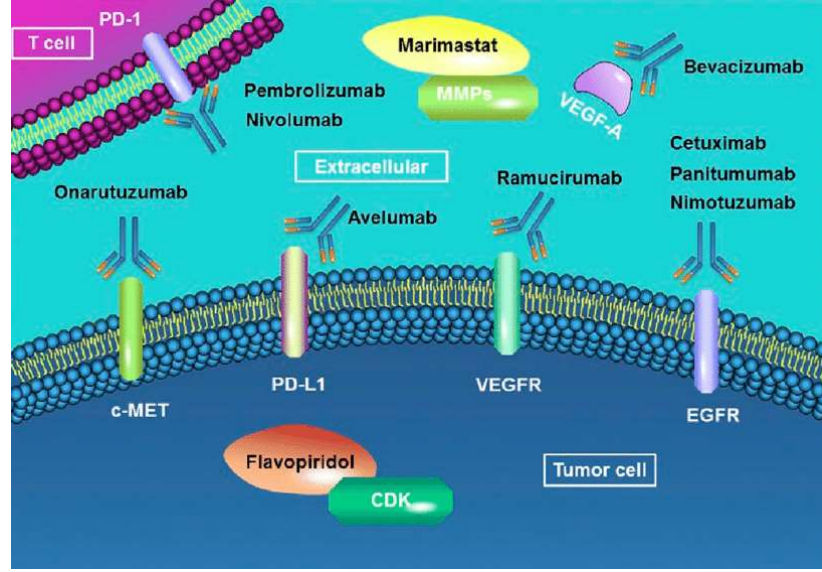
Hormonlar, pankreas, hipofiz, tiroid ve adrenal bezleri de içeren endokrin sistemi tarafından doğal olarak üretilen kimyasal maddelerdir. Bunlar arasında östrojen, testosteron, insülin, tiroid hormonu, kortizol ve epinefrin bulunmaktadır.

Hormon tedavisi çoğunlukla meme ve prostat kanserleri gibi hormon bağımlı kanserleri tedavi etmek için kullanılmakta ve çeşitli şekillerde uygulanabilmektedir. Oral ilaç tedavisi, deri altı ve kas içi enjeksiyon tedavisi, cerrahi müdahale, kadınlarda yumurtalıkların alınması veya erkeklerde prostat bezinin bazı hormonların üretimini azaltmak için alınması bu tedavi yöntemine örnek verilebilir. Hormon terapilerinden en çok kullanılanlara; anti-östrojenler, aromataz inhibitörleri, antiandrojenler ve hormon agonisti (LHRH Agonisti) salan lüteinizan hormonlar örnek olarak gösterilebilir (Dreicer ve Wilding, 1992; Reid vd., 1999; Derzko vd., 2007).

Hormon tedavisi ile kanserin durumunu tespit edebilmek için tümör belirteçlerinin takibini yapmak gerekmektedir. Bunlar, tümöre tepki olarak tümör tarafından ya da vücut tarafından üretilen maddelerdir. Bu belirteçlerin bazıları spesifik bir kanser türüne özgüdür, diğerleri ise çeşitli kanser türlerinde görülmektedir. Bir tümör belirtecinin en iyi örneği, erken prostat kanserini teşhis etmek için uygulanan prostatik spesifik antijen (PSA) iken, ameliyat öncesi ve sonrası serum karsino-embriyonik antijen (CEA) seviyelerinin anormal ($> 5,0\text{ng/ml}$) tanımlanması, kolon kanseri nüksleri olan hastaların yardımcı kanser prognozunda veya ameliyat sonrası gözetiminde yararlı olabilmektedir (Wang vd., 2007).

1.3.6 Hedefli Terapi

Hedefli terapi, kanser oluşumunda rol oynadığı bilinen ya da şüphelenilen hedeflere ve moleküllere saldırarak hücreleri kapsülleme ile bloke eden bir tümörün büyümesinde ve gelişiminin önlenmesinde önemli bir yol izlemektedir.



Şekil 1.7 Mide kanserinin moleküler hedefli tedavileri (Song vd., 2017)

1.3.7 Kanser Aşıları

Kanser aşıları, normal hücrelerin aksine, kanserli hücrelerin enfeksiyöz hücreler gibi algılanmadığından, bağışıklık sistemi tümör hücrelerini yabancı istilacılar olarak tanımlayacak şekilde tasarlanmıştır. Tümör hücreleri çoğunlukla tümörle ilişkili antijenler (TAA) olarak bilinen farklı antijenleri eksprese etmektedir. Ancak, TAA'ların çoğu normal hücrelerde de bulunmaktadır. Bağışıklık sistemi bu antijenleri kendi antijenleri olarak gördüğünden, herhangi bir etki oluşturmamaktadır (Pardoll, 1993).

Kanser üzerine bugüne kadar yapılan araştırma çalışmalarında, meme, prostat, karaciğer, böbrek, pankreas ve akciğer kanserlerini, melanomu, belirli lösemi ve lenfoma tiplerini hedef alan aşılar klinik aşamada kalmıştır (Disis, 2014). Bazı kanserler viral enfeksiyonlarla ilişkilidir, bu nedenle insan papilloma virüsünün serviks kanserine neden olduğu ya da belirli bir karaciğer kanseri tipinin hepatit B ve C virüsleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu virüslerden enfeksiyonu önleyen aşılar geliştirilmesi ve uygulanması, kanserli dokuların oluşmasını ve yayılmasını önlemeye yardımcı olacaktır, ancak bunlar kanser aşıları değildir. Güçlü bir bağışıklık sistemi olması için bağışıklık sisteminin tümünün birlikte uyarılması gerekir. Bununla birlikte, bir tümör, her biri farklı olan yüzey antijenlerine sahip veya farklı tipte hücreler içerebilir. Bu durum bağışıklık sisteminin, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt

etmesini zorlaştırmakta ve bağışıklık tepkisinin birlikte uyarılmasını engellemektedir. Bağışıklık tepkisi, tümör üzerinde herhangi bir önemli etkinin meydana gelmesi için genellikle çok zayıftır. Bu sorunu çözmek için, kanser aşıları genellikle bağışıklık tepkisini arttırmak amacıyla TAA'ya ek olarak birlikte stimülasyon sağlamak üzere tasarlanmıştır (Hollingsworth ve Jansen, 2019).

1.3.8 Kemik İliği ve Kök Hücre Tedavisi

1.3.8.1 Allojenik hücre nakli

Kemik iliği, beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve trombosit haline gelmek üzere olgunlaşan hematopoietik kök hücrelerden oluşur. Allojenik transplante hücreler bir vericiden veya göbek kordon kanından elde edilebilir (Barker ve Wagner, 2003; Forman ve Nakamura, 2015). Hücreler hastanın özdeş bir ikizinden geliyorsa nakil singeneiktir ve hücreler otolog nakil şeklindedir çünkü hücreler hastanın hücreleri ile aynıdır. Hücreler, insan lökosit antijeni (HLA) testi ile yapılan hasta ile eşleştirilmelidir. HLA tipi 6 antijenden oluşur, 3'ü anneden alınırken, 3'ü de babadan kalıtsal olarak alınabilir. Aynı ebeveynlerden gelen kardeşlerin birbirleriyle eşleşme şansı %25'tir ancak hiçbir kardeş eşleşmezse, hastanın ebeveynleri veya çocukları test edilebilir. Lösemi, lenfomalar, multipl miyelom, şiddetli aplastik anemi ve orak hücre hastalığı, diğerleri arasında bir allojenik nakil ile tedavi edilebilmektedir (Horowitz, 2009).

1.3.8.2 Otolog hücre nakli

Otolog nakilde hasta hücrelerini kendisine bağışlamaktadır. Bu nakil sınıfı lösemi, miyelodisplastik sendrom, multipl miyelom (Louw vd., 2009), Hodgkin hastalığı, Hodgkin dışı lenfoma, testis kanseri ve nöroblastomu tedavi etmek için kullanılmaktadır.



Şekil 1.8 Doktorlar kök hücreleri toplar (URL 2020)

2. KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN DOĞAL ÜRÜNLER

Birçok bitki tarafından üretilen doğal bileşikler, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. 1981 ve 2002 yılları arasında tanıtılan yeni küçük molekül kimyasal maddelerin tahminen yarısı (%49) doğal kökenli kimyasal maddeler, doğal ürünlere dayanan yarı sentetik ya da sentetik maddelerdir (Thomas ve Victor, 2014).

Doğal ürünlerden elde edilen ekstratlar, doğal olarak biyosentezlenen birçok bileşiğin karışımlarını ve bunların izole edilmiş kimyasal bileşenlerini içermektedir. Önemli doğal ürünlere, bitkiler, mantarlar, bakteriler, protozoolar, böcekler, diğer hayvanlar ve insanlar gibi karasal veya deniz yaşamı formlarından örnekler verilebilir (Rollinger vd., 2006). Doğal ürünler primer ve sekonder metabolitlere bölünebilir. Primer metabolitler, onları üreten organizmanın beslenmesi için vazgeçilmez ve doğada evrenseldir. Sekonder metabolitler ise parazitler, yırtıcılara karşı koruma, tozlayıcıları çekme gibi yararlı özelliklere sahip olmakla birlikte üreticinin büyümesi ve çoğalması için gerekli değildir. Genellikle, sekonder metabolitler daha fazla kimyasal çeşitlilik göstermektedir (Thomas ve Victor, 2014).

2.1 Doğal Ürünlerin Sentetik Maddelere Göre Avantajları ve Dezavantajları

Doğal kaynaklı kimyasal maddeler sentetiklerden farklıdır, çünkü daha fazla yapısal çeşitlilik gösterirler. Doğal ürünler tipik olarak sentezlenen kimyasallardan daha fazla sterik karmaşıklığa ve daha fazla kiral merkeze sahiptir. Çoğunlukla daha fazla sayıda oksijen atomu ve hidrojen bağı donörleri veya alıcıları taşır. Doğal ürünler moleküler sertliğe, daha geniş bir moleküler kütle dağılımına, daha yüksek bir oktanol-su dağılım katsayısına ve daha fazla halka sistemi çeşitliliğine sahiptir (Thomas ve Victor, 2014).

Doğal ürünlerin kimyasal çeşitliliği, her organizmaya etki eden evrimsel baskının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Bir organizmanın biyosentez sistemleri, değişen ortamlara uyum göstermesi devamlı olarak gerçekleştirdikleri mutasyona bağlanabilir. Evrim sürecinde çok çeşitli kimyasal maddeler gelişmiştir. Doğal ürünlerin sentetik maddelere kıyasla yapısal karmaşıklığı, doğal moleküllerin sonraki modifikasyonlarını zor ve pahalı hale getirmektedir (Thomas ve Victor, 2014).

Ayrıca, bu karmaşıklık toplam kimyasal sentez prosedürlerinde zorluklara sebep olmaktadır. Sonuç olarak, piyasada bulunan birçok doğal ürün canlı organizmada mümkünse hücre kültürlerinde biyosentezlenir. Örneğin, morfin ve kodein gibi alkaloidleri elde etmenin en ekonomik yolu Papaver türlerinden izole edilmesidir. Doğal ürünlerin bir diğer yararı da biyolojik çevrede artan uyumluluk ve stabildir (Thomas ve Victor, 2014).

Özetle, doğal kaynaklı kimyasal maddeler yeni ilaçların geliştirilmesi için tercih edilen moleküllerdir. Bitkiler bu konuda hala büyük bir potansiyele sahiptir çünkü dünyadaki bitkilerin sadece %10'u kimyasal bileşenler ve biyolojik aktivite için analiz edilmiştir. Ayrıca, biyolojik aktiviteye sahip olduğu keşfedilen yaklaşık 100,000 ikincil metabolitin sadece yarısı araştırılmıştır (Thomas ve Victor, 2014).

2.2 Doğadan İlaç Örnekleri

Morfin, narkotin, emetin, striknin, sinkonin, kafein, atropin, vb. gibi alkaloidler, doğadan türetilen oldukça güçlü bir ilaç sınıfını temsil etmektedir (Rollinger vd., 2006). Antimalaryal ilaçlar kinolin ve ilgili aril alkoller, *Cinchona* kabuğunun bir bileşeni olan kinine dayanmaktadır. *Artemisia annua* bitkisinin bir bileşeni olan Artemisin ateşe karşı etkilidir. Antimalaryaller olarak birkaç yarı sentetik artemisin türevi kullanılmaktadır. *Albizia adinocephala*'nın kök kabuğundan ve yapraklarından izole edilen makrosiklik spermin alkaloidleri, antimalaryal hedef plazmepsin II ile etkileşime girmektedir (Thomas ve Victor, 2014).



Şekil 2.1 Alkaloid, Morfin (URL 2020)

Catharanthus roseus'tan elde edilen vinblastin ve vincristin önemli antikanser ilaçlardır. Taxol, pasifik porsuk ağacının (*Taxus brevifolia*) kurutulmuş kabuğundan çıkarılan bir antikanser ilacıdır. Bu ağaç yavaş büyüyen ve dahası nesli tükenmekte olan benekli baykuşa ev sahipliği yaptığı için, bilim adamları daha yaygın olarak porsuk türlerinin iğnelerinden çıkarılan 10-deasetil bakatinden taksol üretiminin yarı sentetik yolunu tercih etmektedirler (Thomas ve Victor, 2014).

2.3 Deniz Canlılarının Terapötik Kullanımı

2.3.1 Scorpaenidae Balıklar

Scorpaenopsis venosa'nın zehir ve bezinin ham fraksiyonları bakteriyel enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Scorpaenopsis venosa*'nın bazı ırklarının salgıladığı zehir *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Proteus sp.* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerin yanı sıra *Rhizoctonia solani*, *Pythium proliferum* ve *Aspergillus niger* gibi mantar ırklarına karşı da antimikrobiyal etki göstermiştir. (Sasikala ve Ravindran, 2013). Akrep balığı zehri, genellikle yeni ilaçların geliştirilmesi hususunda kullanılmaktadır. Aslan balığı üzerinde yapılan önceki çalışmalarda ise zehrin biyoaktif maddeler, peptitler ve proteazları içerdiği tespit edilmiştir. Bu biyoaktif maddeler gelecekte ilaçların geliştirilmesinde daha faydalı olabilir. Bu nedenle araştırmalarda balık zehri kullanımı yeni gelişmeye başlamıştır (Brown, 2012).

2.3.2 Zehir Toplama ve Ekstraksiyon

Deniz canlılarından zehir salgılarının toplanması farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Genel olarak iki farklı zehir çıkarma yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemler;

Aspirasyon yöntemi: Her bir omurgayı kaplayan kılıf omurganın tabanına kadar sıyrılır ve zehir, bir vakum kaynağına bağlı mikropipet ile glandüler oluklardan 5°C 'de tutulan bir toplama şişesine aspire edilir. Ekstrakt daha sonra 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve süpernatant liyofilize edilir.

Toplu yöntem: Balığın sırt bölgesinden sıyrılan dikenler 5°C 'lık bir damıtılmış su kabına daldırıldı. 5 dakika süreyle hafifçe çalkalandı ve çözelti boşaltıldı. Bu prosedür üç kez tekrarlandı ve yıkamalar birleştirilerek liyofilize edildi.

2.4 Kanser Tedavisinde Şifalı Bitkiler

Antikanser potansiyeli olan bitkiler tüm dünyada bulunmakla birlikte özellikle şifalı bitkiler kanser tedavisinde ilgi çekmektedir. Örneğin, Şili'de Boldo (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) yaprakları hepatoprotektiftir. Çünkü, boldin gibi aporfin benzeri alkaloidler içermektedir. Ayrıca, antitümör özellikliği de göstermektedir. Güney Amerika bitkisi graviola olarak da bilinen *Minea muricata* L. (Annonaceae) ise kanser hücrelerinde ilaç direncini inhibe ettiği bulunan asetogenin içermektedir ve bu nedenle kemoterapide kullanılması önerilmektedir. Bu bitki, Amazon yağmur ormanlarında ve Güney Amerika'nın diğer bölgelerinde yetişmekle birlikte bileşiminde lapachol ve beta-lapachone I bulunmaktadır (Thomas ve Victor, 2014).



Şekil 2.2 Boldo yaprakları (URL 2020)

Alvaradoin E, *Alvaradoa haitiensis* Urb. yapraklarında bulunmaktadır Bu bileşik antilösemik aktivite göstermektedir. *Pancreaticum littorale* Jacq antikanser potansiyele sahip pankratistatin 3,4-O-siklik fosfat sodyum tuzu içermektedir. Rokaglat türevi silvestrol, Endonezya'da toplanan *Aglaia foveolata* Pannell'in meyvesinde ve dallarında tespit edilmiştir. Silvestrol, göğüs, prostat ve akciğer kanserlerine karşı sitotoksik etkiler ortaya koymaktadır (Thomas ve Victor, 2014).

Catharanthus roseus (L.) G. Don (Apocynaceae), *Vinca* alkaloidleri içerdiği bilinen bir bitkidir. *Vinca* alkaloidleri, her tubulin dimerinde iki yüksek afinite bölgesine bağlanır. Bu bağlanma, α -heterodimerin stabilizasyonuna ve sonuç olarak mikrotübelerin stabilitesine neden olmaktadır (Thomas ve Victor, 2014).



Şekil 2.3 Vinca (URL 2020)

Paklitaksel, *Taxus brevifolia* Nutt'tan izole edilir. (Taxaceae, korteks) ve mikrotübüllerin dengesizleşmesini teşvik eder. Mitotik döngünün işleyişini engelleyerek veya kromozom salınımlarını azaltarak mitotik tutuklamaya neden olur. Tub-tubulin amino terminalinde bir taksol bağlanma bölgesi de bulunmaktadır. Çin'de *Taxus chinensis* (Miq.) De Laub'da yüksek düzeyde paklitaksel bulunmaktadır (Taxaceae) (Thomas ve Victor, 2014).

TCM'de antikanser potansiyeli olan birçok bitki vardır. Camptothecin, *Camptotheca acuminata* Decne'den izole edilmiştir. Nyssaceae, Çin'de yetişir ve topoizomera I aracılı DNA iplikçiklerinin kırılmasından sonra DNA'nın ligasyonunu inhibe eder. Çin'de yetişen bir tıbbi bitki olan chinense (Berberidaceae), podophyllotoxin içermektedir (Thomas ve Victor, 2014).

Kanseri tedavi etmek için diğer hedefler arasında malign kanser hücrelerinde sinyal iletim yollarının proteinleri bulunmaktadır. Örneğin, emodin Çin *Rheum palmatum* L.'de (Polygonaceae) bulunmuştur ve kazeinkinaz-2'yi inhibe etmektedir. Verbascoside, *Garcinia hanburyi* Hook'tan izole edilmiştir ve F. Clusiaceae telomera I inhibe etmektedir (Thomas ve Victor, 2014).

Telomerazlar tümör hücresi ölümsüzleştirmesi için gereklidir. *Sinomenium acutum* (Thunb.) *Magnolia officinalis* (Menispermaceae) 'de bulunan çeşitli *Capsicum türleri* L. (Solanaceae) ve sinomeminde bulunan kapsaisin, doğal anjiyogenez inhibitörleridir (Thomas ve Victor, 2014).

2.5 Doğal Ürünlerin Kansere Kemoterapisine Etkisi

Tarihsel olarak, ham doğal üründe yer alan özler insanlar tarafından ilaçların hammadesi olarak kullanılmaktadır. 19. yüzyılda, bu tür ekstraktlardan aktif bileşenleri saflaştırmak mümkün hale gelmiştir. Örneğin, morfin, kinin, atropin ve kokain gibi alkaloidler bu dönemden günümüze kadar yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Bir ekstrakt ile karşılaştırıldığında, saflaştırılmış bir doğal ürün, dozun standartlaştırılması ve karışımda bulunan diğer bileşenler nedeniyle yan etkilerin önlenmesi açısından büyük öneme sahiptir (Koehn, 2012). Geleneksel ilaçları araştırmanın başlangıcından itibaren, biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin keşfi, 20. yüzyılda bileşenlere ve moleküler yapıya dayalı taramayı içeren büyük ölçekli yeniliklere doğru ilerlemiştir. Bu yöntemde, bitkiye ait hammadde özütünün kütüphanesi biyolojik bir tahlil ile test edilmekte ve aktif moleküler yapısı daha sonra aydınlatılan ayrı ayrı bileşikler tanımlamak üzere fraksiyonlara ayrılmaktadır (Koehn, 2012). Bununla birlikte, doğal ürünlerin tek başına yetersiz kalması sebebiyle sentetik maddelerin üretilmesine de başlanmıştır. Moleküler düzeyde hastalık hedeflerine yönelik artan öngörüler ile, tıbbi kimyagerler tarafından yapılan çok sayıda sentetik küçük moleküllü ilacın yanı sıra hücre kültürü ile yapılan büyük moleküler ağırlıklı biyolojik ürünler üretilmiştir. Bu nedenlerden dolayı doğal ürün taramasındaki asıl zorluklar, gelecekte önemli bir rol oynamaya devam edip etmeyeceği konusunda tartışmaya yol açmaktadır (Koehn, 2012).

2.5.1 Biyolojik Aktiviteye Yatkınlık

Doğal ürünler genellikle üretici organizmanın önemli kaynaklarını tüketen çok aşamalı biyosentetik yollarla yapılmaktadır. Bu yolların tutulmasının üretici organizmaya, kendi içinde veya doğal ortamındaki diğer türlerle etkileşimlerinde olumlu bir fayda sağladığı muhtemeldir. Ayrıca, biyolojik olarak ilgili protein, sınırlı sayıda protein

katlanması ile nispeten küçülmektedir. Bu nedenle, belirli bir protein ile etkileşime girecek şekilde tasarlanmış doğal bir ürün, terapötik bir hedef olarak ilgilenilen başka bir proteine yüksek afinite ile tesadüfen bağlanabilmektedir (Koehn, 2012).

2.6 Sarımsağın Tıbbi Değeri

Diyet faktörleri çeşitli insan hastalıklarının gelişiminde anahtar rol oynamaktadır. Kültürler arasında, insan sağlığını geliştirdiğine inanılan birçok farklı diyet modeli vardır. Kültürel farklılıklara rağmen, sağlıklı beslenme modellerinin bazı ortak özellikleri bulunmaktadır. Bitkisel gıdaları faydalı diyet olarak algılanması yüzyıllar boyunca birçok kültürün gelenekleri tarafından tavsiye edilmektedir.



Şekil 2.4 Sarımsak soğanı

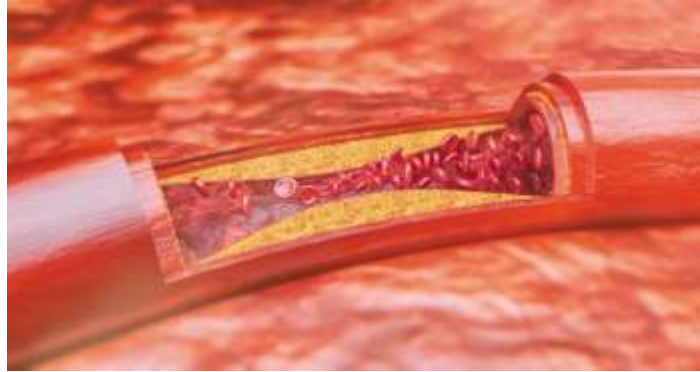
Sarımsak (*Allium sativum* L.), farklı geleneklerde profilaktik ve aynı zamanda terapötik tıbbi bitki olarak önem kazanmıştır. Botanik olarak *Allium sativum*, soğan, frenk soğanı ve arpacık soğanlarıyla birlikte Lillaceae ailesinin bir üyesidir. Sarımsak, tarih boyunca diyet ve tıbbi alanda önemli roller oynamıştır. Bu tıbbi bitkiye en eski referanslardan bazıları, muhtemelen MÖ 6. yüzyılda derlenen Zerdüşt kutsal yazılarının bir koleksiyonu olan Avesta'da rastlanmıştır (Banerjee ve Maulik, 2002; Petrovska ve Cekovska 2010). Sarımsak ayrıca Sümer ve eski Mısırlılar tarafından önemli bir ilaç olarak kullanılmıştır. Yunanistan'daki en eski Olimpiyatlar sırasında, dayanıklılığı arttırmak için sporculara sarımsak verildiğine dair bazı kanıtlar bulunmuştur. Eski Çin ve Hint tıbbında ise sarımsak solunum ve sindirime yardımcı olmak, cüzzam ve parazit istilasını tedavi etmek için kullanılmıştır. Ortaçağ

döneminde de sarımsak farklı hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynamıştır, Al Qanoon Fil Tıbbın ünlü kitabında (Tıp Kanunu), sarımsağı artrit, diş ağrısı, kronik öksürük, kabızlık, parazit istilası, yılan ve böcek ısırıkları, jinekolojik tedavide yararlı bir bileşik olarak önermiş ve bu hastalıkların yanı sıra bulaşıcı hastalıklarda da antibiyotik olarak etkili olduğunu ortaya koymuştur. Rönesans'ın başlamasıyla birlikte, Avrupa'da sarımsağın sağlık yararlarına özellikle dikkat çekilmiştir. Sarımsak; sağlığı korunmasındaki etkileri hakkındaki yaygın inanç nedeniyle modern tıbbın özel ilgi alanı olmuştur. Bazı Batı ülkelerinde, sarımsak özütlerinin satışı, önde gelen reçeteli ilaçların satışı ile yarışmaktadır. Sarımsak için terapötik ve önleyici rolleri gösteren kayda değer bir epidemiyolojik kanıt bulunmamaktadır. Ancak birkaç deneysel ve klinik araştırma, sarımsak ve özütlerinin birçok olumlu etkisini göstermektedir (Banerjee ve Maulik, 2002; Petrovska ve Cekovska 2010).

Sarımsak soğanlı bir bitkidir ve yüksekliği 1,2 m'ye kadar çıkabilir. Sarımsağın büyümesi kolaydır ve ılıman iklimlerde yetiştirilebilir. Farklı türleri arasında en önemlisi sert gövdeli ve yumuşak gövdeli sarımsak türleridir. Allisin (alil 2-propenetiösulfonat veya dialil tiyosulfonat), sarımsak veya çiğ sarımsak homojenatının sulu ekstraktında bulunan başlıca biyoaktif bileşiktir. Sarımsak kıyıldığında veya ezildiğinde, allinaz enzimi aktive edilir ve alinden alisin üretimi gerçekleşir (Banerjee ve Maulik, 2002; Petrovska ve Cekovska 2010). Sarımsak homojenatında bulunan diğer önemli bileşikler, 1 -propenil alil tiyosulfonat, alil metil tiyosulfonat, (E, Z) -4,5,9-trithiadodeca-1, 6,11-trien 9-oksit (ajoen), γ -glutamil ve -S-alkil-Likisteindir. Homejenat oda sıcaklığında birkaç saat inkübe edildiğinde adenosin konsantrasyonu birkaç kat artar. Yaygın olarak incelenen bir diğer sarımsak preparatı, sarımsak özütüdür. 1,5 yıldan fazla bir süre %15-20 etanol içinde bekletilen dilimlenmiş sarımsağın, sarımsak özüne göre daha etkili olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Banerjee ve Maulik, 2002; Petrovska ve Cekovska 2010). Tüm bu sürecin önemli ölçüde allisin kaybına ve S-alililsistein, sallylmercaptocysteine, allixin, N-0 - (Ideoxy-D-fructos-1 -il) -Larginin ve selenyum gibi bazı yeni bileşiklerin artan aktivitesine bağlı olduğu varsayılmaktadır. Tıbbi olarak kullanılan sarımsak yağı, çoğunlukla buharlı damıtma işlemi ile hazırlanmaktadır. Buharla damıtılmış sarımsak yağı, dialil, alilmetil ve dimetil mono ila hekza sülfürlerden oluşmaktadır.

2.6.1 Ateroskleroz ve Hiperlipidemi

Sarımsağın kolesterol seviyesini düşürme kabiliyetine sahip olduğu, bunun sonucunda lipid peroksidasyonunu azalttığını ve plak oluşumunu engellediğini iddia edilmektedir. *In vitro* çalışmalar, düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) baskılama yeteneğine ve LDL'nin oksidasyona karşı artan direncine sahip olduğunu açıkça göstermiştir. Kontrollü insan çalışmalarından elde edilen sonuçlar, 1990'ların başında yapılan çalışmalarla karıştırılarak etkili sonuçları gösterilmiştir. Sarımsak ekstresi için yeni süreçlerin geliştirilmesine yönelik yapılan son çalışmalardan, 15 hiperkolesterolemi hastasıyla yapılan bir çalışmada, *Monascus pilosus* küfö ile fermente edilmiş sarımsaktan üretilen bir ürün değerlendirilmiştir. Hazırlanan preparat, tedavi başladıktan 2 ve 4 hafta sonra kontrol edildiğinde serumdaki toplam kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerini önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir. Trigliserid seviyesi ise, hipertrigliseridemik hastalarda bir azalmaya eğilim gösterirken, yüksek yoğunluklu lipoprotein konsantasyonu değişmediği görülmüştür. 60 günlük takviyeden sonra, düşük yoğunluklu lipoprotein, serum trigliserit miktarı ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein konsantasyonlarının sırasıyla %21,37 ve 36,7 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Gebreyohannes vd., 2013).



Şekil 2.5 Ateroskleroz (URL 2020)

2.6.2 Yüksek Tansiyonu Etkisi

Sarımsak muhtemelen en çok tansiyon kontrolü için tamamlayıcı bir terapi olarak popüler hale gelmiştir. Son zamanlara yapılan bir *in vitro* çalışmada, sarımsak sülfür bileşiklerinin, kırmızı kan hücrelerinin sarımsak organik polisülfidleri, hidrojen sülfide dönüştürür ve hidrojen sülfide bilinen bir endojen kardiyoprotektif vasküler hücre

sinyal molekülüdür. 2400 mg sarımsak tabletinin 31,2 mg allisin içeren yüksek doz olarak kullanması, diyastolik basıncı 5 saatten sonra 16 mm-Hg düşürdü bir de 415 hastadan toplanan veriler üzerine yapılan bir meta-analiz de 7,7 mm-Hg diyastolik basıncın azaldığını göstermiştir (Gebreyohannes vd., 2013).

2.6.3 Kardiyovasküler Hastalık Üzerindeki Etkisi

Kalp ve dolaşım sistemi bozuklukları diğer hastalıklardan daha fazla yaşamsal faaliyetlere engel olmakla birlikte koroner arterlerin tıkanması diğer faktörlerden daha fazla ölüme neden olmaktadır. Kan ve oksijen sağlayan kalp ile, zamanla plak biriktikçe arterler giderek daha dar hale gelir. Ne zaman kan arz kısıtlanırsa, kalbin belirli bir kısmı oksijenden yoksun kalır ve kalp krizine yol açar. Kalp hastalıklarının sebeplerinden olan yüksek tansiyon ve yüksek kan serum kolesterol seviyeleri sarımsağın terapötik etkisinden doğrudan etkilenmektedir. Koroner kalp hastalığında sarımsağın rolüyle ilgili tavşanlarda deney yapıldı ve önceden var olan aterosklerotik birikintilerin ve lezyonların bile tersine çevrilebileceği bulundu. Sürekli olarak sarımsak tüketilen Hindistan'da yapılan bir araştırmada, 432 koroner arter hastası rastgele iki gruba ayrıldı ve yarısına süte sarımsak suyu verildi, diğer grup hastalara sarımsak suyu verilmedi. Bu çalışma süresinin üç yılı içinde, sarımsak suyu verilmeyen grupta neredeyse iki kat daha fazla hastanın öldüğünü gösterdi. Oksidanları temizlediği, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon seviyelerini artırdığı, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA'yı inhibe ederek kolesterol sentezini azalttığı iyi gösterilmiştir. Ayrıca, nöronları nörotoksisite ve apoptozdan koruyarak, böylece iskemi veya reperfüzyonla ilişkili nöronal ölümü önleyerek ve öğrenme ve hafıza tutulmasını geliştirerek bilişsel gerilemeyi önlemeye yardımcı olabilir. (Gebreyohannes vd., 2013).

2.6.4 Sarımsağın Diyabet Üzerine Etkisi

Deneyisel çalışmalar sarımsakta belirgin bir hipoglisemik etki gösterse de, sarımsağın insan kan şekeri üzerindeki etkisi hala tartışmalıdır. Birçok çalışma sarımsağın diyabetik hayvanlarda kan şekeri seviyesini düşürebildiğini göstermiştir. Sarımsak,

sıçanlarda ve farelerde streptozotosin- ve ayrıca alloksana bağıli diyabetes mellitusta kan glikozunun azaltılmasında etkili olmuştur. Diyabetik hastalarda sarımsağın dislipidemiye kısa süreli faydaları gösterilmiştir. Sarımsak, diyabetik hastalarda serum total kolesterol ve LDL kolesterolü önemli ölçüde azaltmıştır ve HDL kolesterolü plaseboya kıyasla orta derecede arttırmıştır (Gebreyohannes vd., 2013). Sarımsaktan türetilen biyoaktif bir bileşen olan Sallyl sistein, NADPH oksidaz alt birim ekspresyonunun modülasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyerek diyabetik sıçanlarda erektil işlevi restore etmiştir (Yang vd., 2013). Diyabetik hastalarda 12 hafta boyunca metformin ve sarımsak tedavisi, açlık kan şekerini (FBG) azaltmış, ancak FBG'deki değişim yüzdesi, yalnızca metformin kullanmak yerine sarımsak ile takviye edilmiş metformin kullanımı ile daha da önem kazanmıştır (Kumar vd., 2013). Sarımsak ekstraktları ile kronik beslenme sonucunda, kan şekeri seviyesinde önemli bir düşüş gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda ise uygulama sonrasında kan şekeri seviyesinde bir değişiklik olmamıştır. Bu nedenle, diyabetik hastalarda sarımsağın etki rolü daha fazla araştırılmalıdır. Sarımsağın diyabetes mellitus üzerindeki faydalı etkisi esas olarak alliin, allisin, dialil disülfür, dialil trisülfür, dialil sülfid, S-alil sistein, ajoen ve alil merkaptan gibi uçucu kükürt bileşiklerinin varlığına bağlanmaktadır. Sarımsak ekstraktlarının insülin direncini azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (Gebreyohannes vd., 2013).

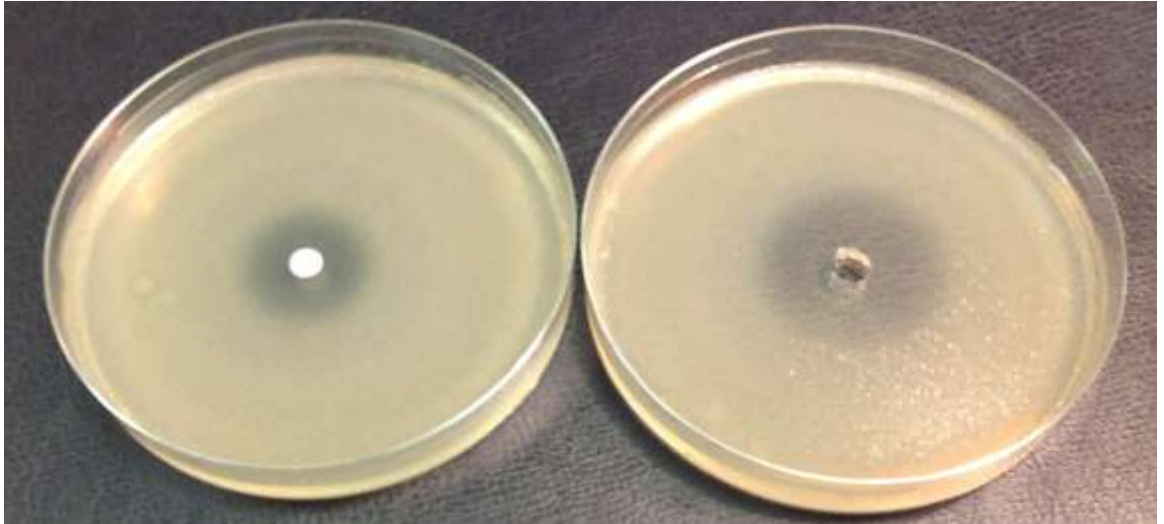
2.6.5 Sarımsağın Hepatotoksisite Üzerine Etkisi

Birkaç çalışma ile, sarımsağın karaciğer hücrelerini birtakım toksik ajanlardan koruyabildiği ortaya çıkmıştır. Asetaminofen, birçok ülkede kullanılan önde gelen bir analjezik ve antipiretik ilaçtır. Aşırı dozun insanlarda ve kemirgenlerde hepatotoksisiteye ve nefrotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Asetaminofenin %90'ından fazlası sülfat ve glukuronid konjugatlarına dönüştürülmesine ve idrarla atılmasına rağmen, küçük bir kısmı farklı karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilmektedir. Bu, hücre proteinlerini arttırabilir ve toksisiteye neden olabilir. Sarımsağın asetaminofen kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyuculuğu da gösterilmiştir. Gentamisin, ayrıca karaciğer hasarı markör enzimlerinin seviyesinin yükselmesi (aspartat transaminaz ve alanin aminotransferaz) ve plazma albümin seviyesinde azalma ile ortaya çıkan hepatik hasarı indüklemektedir. Sarımsak tozunun

diyete dahil edilmesi, sıçanları gentamisin kaynaklı hepatotoksisiteye karşı korur, antioksidan durumunu iyileştirir ve oksidatif stresi modüle eder. Ayrıca sarımsak, sıçanlarda nitratın hepatotoksisite etkisini azaltmıştır. Sarımsak özü, lipid peroksidasyonunu azaltabilir ve antioksidan savunma sistemini geliştirebilir (Wang vd., 1996).

2.6.6 Antimikrobiyal Özellikler

Sarımsak, çeşitli toplumlarda yüzyıllar boyunca bulaşıcı hastalıklarla mücadele etmek için kullanılmıştır. Tarihsel olarak, Louis Pasteur'un 1858'de sarımsağın antibakteriyel özelliğini ilk kez tanımladığına inanılmaktadır.



Şekil 2.6 Allisin İçeren Sarımsak Ekstraktlarının *Burkholderia cepacia* Kompleksine Karşı Antimikrobiyal Aktivitesi (Wallock vd., 2014)

Daha yakın zamanda, sarımsağın gram-pozitif, gram-negatif ve aside dirençli bakteri gruplarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında *Salmonell Candidanın*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Bacill subtilis*, *Clostridium*, *Mycobacterium* ve *Helicobacter* bulunmaktadır (Harris vd., 2001; Goncagul ve Ayaz, 2010). Sarımsağın faydalı bağırsak mikroflorası ile potansiyel olarak zararlı enterobakteriler arasında farklı bir inhibisyon uyguladığı ortaya konulmuştur. Sarımsakların antibakteriyel aktivitesi yaygın olarak allisine bağlanmaktadır. Allisinin sülfhidril değiştirme aktivitesine sahip olduğu ve sülfhidril enzimlerini inhibe edebildiği

bilinmektedir. Sistein ve glutatyon, allisin tiyolasyon aktivitesine karşı koyar. Sarımsak özü ve allisinin bazı vankomisine dirençli enterokoklar üzerinde bakteriyostatik etkiler gösterdiği bilinmektedir. Vankomisin ile kombinasyon halinde kullanıldığında inhibitör bir sinerjizm gözlenmiştir (Goncagul ve Ayaz, 2010; Gebreyohannes vd., 2013). Allisinin, vankomisin direncini kodlayan ve vankomisine duyarlılığı artıran TN1546 transpozon enzimleri üzerindeki sülfhidril gruplarını modifiye ettiği düşünülmektedir. Farklı diş sarımsak ekstraktlarının insan dental plak mikrobiyotasına karşı antibakteriyel etkisi *in vitro* çalışmada gösterilmiştir (Houshmand vd., 2013). Siprofloksasin ile sarımsak özütü arasındaki sinerjizm gösterilmiş ancak ampisilin ve sarımsak özleri arasında doğru bir orantı olduğu gösterilmemiştir (Zain al-abdeen vd., 2013). %95 etanol ile ekstrakte edilen sarımsak ve zencefil rizomlarının karanfilleri, çoklu ilaç klinik patojenlerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları bilindiği için ilaca dirençli mikrobiyal hastalıkların önlenmesinde kullanılabilir. *Pseudomonas aeruginosa*, karışıma en duyarlı mikroorganizmadır (Karupiah ve Rajaram, 2012). Sarımsak ayrıca çoklu ilaç uygulamasına dirençli tüberküloz içinde bir tedavi olarak önerilmiştir.

2.6.7 Antiprotozoal Aktivite

Çeşitli çalışmalar, parazite karşı sarımsak ekstraktlarının ve fitokimyasallarının anti-protozoal aktivitesini bildirmiştir. Örneğin; bir *in vitro* çalışmada, aközün, etanolik ve diklorometan *A. Sativum* özleri, *Haemonchus*'a karşı antihelmintik aktivite sergilemiştir. Sarımsağın etanolik özütü *Haemonchus contortus* için en etkili olan ekstrakt olmuştur. Sulu sarımsak özütü ise *Trichuris muris* ve *Angiostrongylus cantonensis*'e karşı güçlü aktivite göstermiştir (El-Saber Batiha vd., 2020).

Sarımsak ekstraktının *Blastocystis spp.* türlerinin büyümesini *in vivo* olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sarımsak özlerine atfedilen antimikrobiyal aktivitenin fitokimyasallar ile sağlandığı, örneğin tiyosülfınatların, birkaç mikroorganizmada bulunan tiyol enzimlerinin inhibisyonu ile ilgili olan, antibakteriyel aktiviteye sahip biyoaktif bileşiklerden biri olduğu bildirilmiştir. Allisin aynı zamanda, parazitin RNA'sının yanı sıra DNA ve protein sentezini önleyerek etki etmektedir. Bununla birlikte, allisin ve sarımsak özünden izole edilen fitokimyasallardan olan DATS,

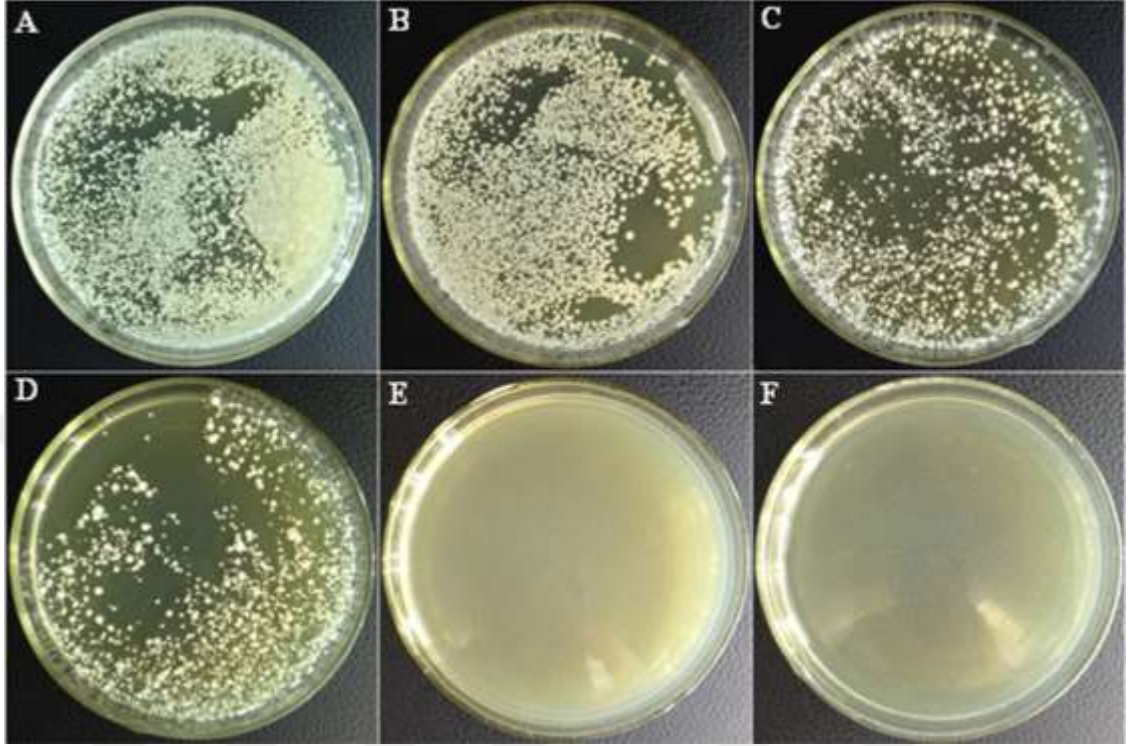
Entamoeba histolytica, *Plasmodium falciparum*, *Babesia*, *Theileria*, *Trypanosoma brucei* ve *Giardia lamblia*'ya karşı antiparazitik aktivite göstermiştir. Ajoen ise ayrıca insan glutatyon redüktazını ve *T. Cruzi*'nin tripanothione redüktaz enzimi inhibe ederek antiparazitik aktivite sergilemiştir. Sarımsak yağının ayrıca *Cochlospermum planchonii*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Leishmania* ve *Trypanosoma* gibi mikroorganizmalar üzerinde geniş spektruma yönelik aktivitesi bildirilmiştir (El-Saber Batiha vd., 2020).

2.6.8 Antifungal Aktivite

Antifungal aktivite ilk olarak 1936 yılında Schmidt ve Marquardt tarafından epidermofit kültürleriyle çalışırken bulunmuştur. *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon* ve *Rhodotorula* dahil olmak üzere birçok mantar sarımsağa karşı hassastır. Sarımsak ekstraktlarının oksijen alımını azalttığı, organizmanın büyümesini azalttığı, lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezini engellediği ve hücre membranlarına zarar verdiği bilinmektedir. Bir saf allisin örneğinin antifungal olduğu gösterilmiştir. Allisinin çözücü ekstraksiyonu ile reaksiyondan uzaklaştırılması antifungal aktiviteyi azaltmıştır. Sarımsak bileşenlerinden biri olan dialil trisülfid, kriptokokal menenjit, ajoene ve *Aspergillus*'a karşı etkinlik göstermiştir. Tiyolun aktiviteyi azalttığı ve tiyol oksidasyonunun allisin tarafından bloke edildiği düşünülmüştür (Marchese vd., 2016; Fufa, 2019).

Solunum aktivitesinin inhibisyonunun, süksinat dehidrojenazın inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Candidanın yapışması sarımsak özü varlığında büyük ölçüde azalmaktadır. Yine, bu etki tiyol bileşikler ile ilave edilerek azaltılır. *Aspergillus niger*, *C. Albicans* ve *Paracoccidioides* dahil olmak üzere bazı mantar büyüme karışımlarına ajoen eklenmesi, allisin ile deneyimlenenden daha düşük konsantrasyonlarda inhibisyon ile sonuçlanmıştır. Allisin veya allisin türevli bileşenler olmadan sarımsak özütü ile yapılan çalışmalarda *in vitro* antifungal aktivite görülmemiştir. Bununla birlikte, enfekte farelere verildiğinde, görülen organizma sayısı yaklaşık %80'lere düşmüştür. Ayrıca sarımsağın, havadaki patojen *Botrytis cinerea* ve *Trichoderma harzianum* olmak üzere iki tür üzerinde antifungal etkiler sergilediği

bildirilmiştir. Protez stomatitli hastalarda nistatin yerine sarımsak kullanımının daha fazla faydası olduğu bildirilmiştir (Marchese vd., 2016; Fufa, 2019).



Şekil 2.7 Sarımsağın antifungal aktivitesi (Li vd, 2016).

2.6.9 Antiviral Aktivite

Sarımsakların antibakteriyel etkisine kıyasla, antiviral özelliklerinin araştırılması üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Az sayıda çalışma, sarımsak özütünün influenza A ve b'ye, sitomegalovirüs, rinovirüs, HIV, herpes simpleksine karşı *in vitro* aktivite gösterdiğini bildirmiştir (Harris vd., 2001). Allisin, dialil trisülfid ve ajoen'in virüs 1 herpes simplex, virüs 2 viral pnömoni ve rotavirüse karşı aktif olduğu gösterilmiştir. HIV durumunda, ajoenin integrin bağımlı süreçleri inhibe ederek etki sağladığı düşünülmektedir. Alil alkol ve dialil disülfürün HIV ile enfekte olmuş hücrelere karşı etkili olduğu da kanıtlanmıştır (Harris vd., 2001). Allisin veya S-alil sistein ile herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Görünüşe göre sadece allisin ve allisin türevi maddeler aktiftir. Birlikte alındığında, sarımsak ekstraktının etkileri ilacı faydalı yapmaktadır. Sarımsağın soğuk algınlığının önlenmesi veya tedavisinde etkileri ile ilgili klinik çalışmalar yetersizdir. Bir çalışmada, sarımsağın soğuk algınlığının oluşumunu önleyebileceği, ancak bu bulguyu doğrulamak için daha fazla çalışmaya

ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, sarımsakların soğuk algınlığı üzerindeki etkililik iddialarının büyük ölçüde düşük kaliteli kanıtlara dayalı olduğu görülmektedir. Birçok ülkede klinik tedaviler için sarımsak özütü kullanılmıştır ancak uzun süreli uygulamayı takiben istenmeyen bulgulara da tam olarak dikkat edilmelidir. Sarımsak ve türevleri hakkında birçok çalışma yapılmış olsa da, sarımsak ekstraktının tam biyolojik mekanizmasının açıklığa kavuşturulması üzerine çalışmalar halen devam etmektedir (Harris vd., 2001).

2.6.10 Anti-Tümör Aktivite

Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma, sarımsak özütlerinin ve ilgili bileşenlerinin kanseri önleyici etkilerini ortaya koymuştur. Sarımsağın, antikanser özelliklere sahip çok sayıda güçlü biyoaktif bileşiği ve önemli olarak alilsülfid türevlerini büyük ölçüde içerdiği bulunmuştur (Thomson ve Ali, 2003; Khanum vd., 2004). Farklı sarımsak türevlerinin, karsinogenezde, DNA sentezi, mutajenez, serbest radikallerin atılması, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra anjiyogenez gibi artan sayıda moleküler mekanizmayı modüle ettiği bildirilmiştir. G2/M fazında meydana gelen hücre döngüsü blokajı ile kanser hücrelerinin büyüme hızı sarımsak ile azaltılabilmektedir. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü 1990 yılında, hangi gıdaların kanserin önlenmesinde önemli bir rol oynadığını belirlemek için Tasarımcı Gıda Programını başlatmış ve yapılan bu programda sarımsağın, kanser önleyici özelliklere sahip en güçlü yiyecek olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kemirgenlerde, sarımsak ve bileşenlerinin karaciğerde kimyasal olarak indüklenmiş tümörlerin gelişimini engellediği bildirilmiştir (Thomson ve Ali, 2003; Khanum vd., 2004). Kolon, prostat, mesane, meme bezi, özofagus, akciğer ve cilt tümörlerinin hem kemirgen hem de insan çalışmalarında hastalık üzerindeki ilerleyişi takip edilmiştir. Sarımsaktan izole edilmiş bir organosülfür bileşiği olan dialil trisülfür (DATS), hem *in vitro* hem de *in vivo* araştırmalarda antikanser aktivite göstermiştir. DATS'ın prostat epitel hücrelerine karşı sitotoksitesi, PC-3 kanser hücrelerinin aksine azalmıştır (Borkowska, 2013). Sarımsak ve bileşenlerinin olası antikarsinojen mekanizmaları, karsinojen aktivasyonun inhibisyonunu, detoksifikasyonun artırılmasını, atılımı ve DNA'nın korunmasını, aktive edilmiş

karsinojenlerden korunmayı sağlamıştır. Ayrıca, DATS tümör kütlelerini ve tümör içindeki mitotik hücre sayısını azaltmıştır. DATS tümörlerde mitozu ve histon deasetilaz aktivitesini azaltmıştır, H3 ve H4'ün artan asetilasyonu, hücre döngüsü ilerlemesini inhibe etmiştir ve tümör önleyici belirteçleri azaltmıştır (survivin, Bcl-2, c-Myc, mtor, EGFR, VEGF) (Wallace vd., 2013). Sarımsak bileşenlerinin, karsinojenlerin DNA'ya kovalent bağlanmasını engellediği, karsinojenlerin bozulmasını arttırdığı, anti-oksidatif ve serbest radikal süpürücü özelliklere sahip olduğu, hücre proliferasyonunu, apoptozunu ve bağışıklık yanıtlarını düzenlediği bulunmuştur. Yağda çözünür kükürt açısından zengin bileşik ve sarımsak türevi doğal bileşik olan ajoenin, lösemili hastaların diğer kan hücrelerine ek olarak lösemik hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Peroksit üretiminin uyarılması, kaspaz-3 benzeri aktivasyonu ve kaspaz-8 aktivitesi yoluyla insan lösemi hücrelerinde ajoene bağlı apoptoz gerçekleşmektedir. Sarımsak, bir meme kanseri baskılayıcısı olan eikosapentaenoik asidin etkisini sinerjize etmekle birlikte bir meme kanseri artırıcı olan linoleik asidin etkisini antagonize etmektedir (Tsubura vd., 2011). Ajoenin bir insan tümör hücresi soylarına karşı anti-proliferatif aktivitesi gösterilmiştir. Ayrıca allisin, insan meme endometriyal ve kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Büyüme inhibisyonuna, hücrelerin, hücre döngüsünün WIG1 ve g2lm fazında birikmesi eşlik eder. Bu nedenle allisin, sarımsak türevlerinin anti-proliferatif etkisinden de sorumludur. Dialil sülfid ve dialil disülfid, insan promiyelositik lösemi hücrelerinde arilamin Nasetiltransferaz aktivitesini ve 2- aminofloren-DNA'yı inhibe eder (Lin vd., 2002). Sarımsak gibi selenyumla zenginleştirilmiş bitkilerin tüketimi ile bazı malignite risklerinin azaltılması önerilmiştir (Thomson ve Ali, 2003; Khanum vd., 2004). DATS, hücre içi reaktif oksijen türleri, DNA hasarı seviyelerini artırarak endoplazmik retikulum stresini ve mitokondri aracılı apoptozu indükleyerek insan melanomu A375 hücrelerinin ve bazal hücreli karsinom hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir (Wang vd., 2010).

2.7 Siyah Sarımsak

Sarımsak işleme ürünleri arasında siyah sarımsak, piyasadaki en iyi bilinen fonksiyonel gıdalardan biri olarak ortaya çıkmaktadır. Çiğ sarımsakla karşılaştırıldığında, siyah sarımsak, tipik bir siyah renge, tatlı bir tada ve rahatsız edici

koku içermeyen çiğneme yapısına sahiptir. Ayrıca, siyah sarımsağın antikanser, anti-obezite, immünomodülatör, hipolipidemik, antioksidan, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyoaktiviteleri literatürde yer almaktadır. Fakat, siyah sarımsak ve onun terapötik etkilerinin temelden klinik araştırmalara kadar sistematik bir incelemesi hala eksiktir (Tran vd., 2019).

Lezzeti ve bol miktarda biyoaktif bileşiği nedeniyle, siyah sarımsak, son yıllarda tüketim talebinde ve karlılığında dikkat çekici bir büyüme ile nutrasötikler fonksiyonel gıda pazarında en çok bilinen ve öne çıkan ürünlerden biri haline gelmiştir. Ayrıca, siyah sarımsak sadece tüketicinin ilgisini değil, aynı zamanda üretim prosedürünün iyileştirilmesi ve siyah sarımsaktan yeni işleme ürünlerinin inovasyonu konusunda araştırmacı ve üreticilerinde dikkatini çekmiştir (Tran vd., 2019).

2.7.1 Siyah Sarımsağın Antikarsinojenik Etkisi

Son yıllarda siyah sarımsağın antikanser etkisi için literatüre eklenen kanıtların sayısının artmasıyla, bazı araştırmacılar siyah sarımsağın mide kanserinden lösemiye kadar kanseri önlemek ve tedavi etmek için bir diyet ürünü olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür.

Kanser hastalıklarının tedavisi sırasında hücre döngüsünü durdurması, apoptoz, tümör büyümesinin inhibisyonu ve istilası dahil olmak üzere farklı etkileri, siyah sarımsağın antikanser etki mekanizmaları arasında yer almaktadır. 2011 yılında Wang ve çalışma arkadaşları, siyah sarımsağın sulu özütünün hücre çoğalmasını önleyebileceğini ve insan mide kanseri hücre dizisi olan SGC-7901 hücrelerinin apoptozunu doza bağlı olarak tetikleyebileceğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar ayrıca, siyah sarımsağın tümör taşıyan farelerde tümör büyümesi üzerindeki inhibe edici etkisini gözlemlemişlerdir (Wang vd., 2012). Bununla birlikte, siyah sarımsak anti-invazif etkiye sahiptir ve bağlantı sıklığının artmasında rol oynayan matriks metaloproteinazlardan MMP-2 ve MMP-9'un aşağı regülasyonu yoluyla metastaz ve invazivliğin araçları olarak insan mide karsinomu AGS hücrelerinde tümör metastazını önlemektedir (Shin vd., 2010).

Siyah sarımsağın kolon kanseri hücre dizisi üzerindeki antikanserojen etkisi de gösterilmiştir. Ayrıca, siyah sarımsağın alkollü özütü ile tedavide PTEN'i ve fosfatidilinozitol 3-kinaz protein kinaz B (PI3K/Akt) sinyal iletim yolunun üyeleri olan Akt/pAkt ekspresyonunu azaltabilir. Bu da p70S6K1 proteininin modülasyonuna, apoptozun indüksiyonuna yol açar ve HT29 insan kolon kanseri hücre hattının hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar (Dong vd., 2014). Park ve arkadaşları, siyah sarımsak heksan özütünün, insan histiositik lenfoma olan U937 hücrelerinin hücre canlılığını azaltabileceğini bildirmiştir. Siyah sarımsağın heksan özütünün, apoptoz ile ilgili proteinlerin ifadesinin değiştirilmesi yoluyla hem içsel hem de dışsal yolların indüksiyonunu sergilediğini bulunmuştur. Siyah sarımsağın ölüm reseptörü (DR) -4 ve Fas ligandını yukarı düzenlediğini, Bax/Bcl-2 oranını artırdığını ve sadece endojen mitokondriyal yolu değil aynı zamanda ölüm reseptörü aracılı apoptotik yolu da içeren Bid proteininin kesilmesini indüklediğini bulmuşlardır (Park vd., 2014). Bazı araştırmacılar ayrıca, siyah sarımsağın hücre büyümesini inhibe edebileceğini ve akciğer kanseri hücre dizisi olan Lewis hücrelerinin iyonlaştırıcı radyasyona karşı duyarlılığını artırabileceğini kanıtlamışlardır (Yang vd., 2013).

3. HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN TEMEL İLKELERİ

Hücre kültürü günümüzde tüm dünyada yaygın olarak uygulanmaktadır. Hücrelerin vücut dışında büyümesini ve korunmasını sağlamak için gerekli teknikler 20. yüzyıl boyunca geliştirilmiştir. İlk insan kanseri hücre dizisi olan HeLa'nın yayınlanmasından bu yana geçen yaklaşık 75 yıl içinde, insan kanseri spektrumunun çoğunu temsil eden binlerce hücre dizisi türetilmiştir. Hücrelerin *in vitro* çalışılmasıyla elde edilen verilerin yorumlanmasında dikkatli olunması gerekmektedir. Birlikte, kanser gibi karmaşık bir hastalığın araştırılması sırasında olayın bileşen parçalarına basitleştirilmesi imkanı bulunmaktadır (Langdon, 2010).

3.1 Hücre Kültüründe Temel Gereksinimler

Hücrelerin kültürde gelişmesi için çeşitli koşulların yerine getirilmesi gerekir. *In vivo* ortamda, hücre sağlığı için beslenme ve çevre koşullarının uygun olması şarttır. Beslenme, serum ilavesi olan veya olmayan ortamlar tarafından sağlanmaktadır. Yapışkan hücreler için, bir yüzeye (genel olarak plastik) bağlanma önemlidir, ancak karbondioksit ve oksijen seviyelerinin belirli sınırlar içinde tutulması da gerekmektedir (Langdon, 2010).

3.1.1 Ortam Koşulları

Günümüzde hücre kültüründe kullanılmakta olan sentetik ortam 1950'lerde geliştirilmiştir. Bu bazal ortamlar amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler ve tuzlar içermektedir. Serum, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi diğer bileşenler, büyüme için gerekli tam karışımı sağlamak üzere bazal ortama eklenmektedir. Temel besi yerinin/sıvısının en temel bileşenleri, örneğin Eagle'ın bazal ortamını (BME) içerenlerden, ortam-199 gibi çok daha geniş bir bileşen aralığına sahip olanlara kadar değişir. Ortam ayrıca ideal bir şekilde sabit bir pH sağlamak için tamponlanmalıdır ve pH 7,4 civarında olmalıdır (Langdon, 2010).

Geliştirilen ilk besiyeri ortamından biri BME'dir. Bu, Harry Eagle'ın hem normal hem de habis hücre tiplerini destekleyecek bir ortamı tanımlama çalışmalarından ortaya

çıkıştır. Bu ortam daha sonra bir dizi uygun ortam üretecek şekilde modifiye edilmiştir. Tek tek amino asitlerin miktarlarının artırılması, Eagle'ın minimum temel ortamını (MEM) verirken, Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (DMEM), glikoz içeriğinin 4,5 kat, amino asit ve vitamin içeriğinin dört kat artırılmış konsantrasyonlarını içermektedir.

Vasat, ticari olarak çeşitli formatlarda üretilebilmektedir. Bunlar, normal bileşimde ve düşük raf ömründe ortamlar (raf ömrü, 9–12 ay), seyreltilmiş konsantreler (genellikle 10X) (raf ömrü, 12–24 ay) ve uzun raf ömrüne sahip toz ortam (2–3 yıl) şeklinde üretilebilmektedir. Konsantreler ve toz ortam, steril su ilavesini gerektirmekte olup, pH ayarlaması için sodyumbikarbonat tampon sistemi kullanılmaktadır (Langdon, 2010).

3.1.2 Serum

Ortam, hücre büyümesi için gerekli olan temel besin maddelerinin birçoğunu içermesine rağmen, serum tarafından temel olarak kullanılan anahtar elementler sağlanmaktadır. Serum, in vivo hücre ortamında bulunan in vivo hormonal, besinsel ve stromal elementlerin çoğunu değiştirebildiği ölçüde kültürdeki hücrelerin hayatta kalmasını ve büyümesini desteklemektedir (Langdon, 2010).

Serum proteinleri arasında hormonlar, büyüme faktörleri, lipitler, taşıma (bağlayıcı) proteinler, enzim kofaktörleri ve bağlanma faktörleri bulunmaktadır. Serumun bireysel bileşenlerinin konsantrasyonları, üretiminde kullanılan hayvanların yaşına ve sağlık durumuna göre değişmektedir ve bu nedenle, insan ve at serumları da kullanılmasına rağmen, çoğu kanser kültürü çalışması için fetal ve yenidoğan buzağı serumları yaygın olarak kullanılmaktadır (Langdon, 2010).

3.1.3 Serum İçermeyen Vasat

Serum kullanımı, kültürde birçok hücre tipinin büyümesini desteklemektedir, ancak bunun kullanımı ile ilişkili bir takım dezavantajlar da bulunmaktadır. İlk olarak, ortam bileşenleri açıkça tanımlanmış olmasına rağmen, karıştırılarak kullanımında uygulanan maddelerin bileşimine bağlı olarak yapısında değişiklikler

oluşacaktır. Bileşimdeki bu farklılıklar, büyüme hızı, bağlanma ve diğer fonksiyonel uç noktalar dahil olmak üzere bir dizi parametre üzerinde bazı değişiklikler meydana getirmektedir. Son olarak, serum ürünleri günümüzde rutin olarak kontrol edilmesine rağmen, geçmiş dönemlerde elde edilenlerde kirleticiler, özellikle virüsler sıklıkla bulunmaktaydı. Bu nedenlerden dolayı, maliyet ve daha fazla tekrarlanabilirlik hususlarıyla birlikte, tamamen tanımlanmış ortamın kullanımına geçiş sağlanmıştır (Langdon, 2010).

3.1.4 Substrat

Kültürde büyüme ve farklılaşma için hemen hemen tüm kanser hücreleri, bir substrat ile etkileşime ihtiyaç duyar. Çoğu kanser hücresi plastik veya cam üzerinde tek tabakalar halinde çoğalır. En önemli istisnalar sırasıyla tek hücreli ve hücre kümeleri olarak süspansiyonda büyümeyi tercih eden hematopoietik hücre dizileri ve en küçük hücreli akciğer kanser hücre dizileridir. Polistiren en yaygın kullanılan plastiktir, ancak polikarbonat, politetrafloroetilen ve polivinil gibi diğer substratlar da mevcuttur. Bu plastikler, yüklü bir yüzey üretmek için ışınlama veya kimyasallarla işlem gerektirir. Substrat hücre dışı matris (ECM) bileşenleri ile kaplanarak hücre yapışması büyük ölçüde arttırılabilir. Yaygın olarak kullanılan ECM proteinleri arasında kolajen, fibronektin ve laminin bulunmaktadır. Alternatif olarak, substratlar serum ile veya ECM molekülleri üreten hücreler tarafından şartlandırılmış ortam ile önceden kaplanabilir (Langdon, 2010).

3.1.5 Fiziki Çevre

Optimal hücre büyümesi için fiziksel ortam koşullarının belirli sınırlar içinde korunması gerekir. Çoğu memeli kültürü için, tercih edilen sıcaklık $36,5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'dir ve hücreler daha düşük sıcaklıklarda büyüyebilse de, 40°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla ölürlere. Kültür ortamları, genellikle bir CO_2 atmosferi gerektiren tamponlama sistemleri içerir ve sıklıkla %5 CO_2 tercih edilir. Çoğu kanser hücresi 7,2–7,4 civarında bir pH değeri gerektirir ve hücre büyümesi, ortamı asitleştiren solunum yan ürünleri ürettiğinden ortam düzenli olarak değiştirilmelidir. Ortama yaygın olarak eklenen pH göstergesi pH 6,5'te sarı, pH 7,0'da turuncu, pH 7,4'te kırmızı ve pH 7,8'de

mor olan fenol kırmızısıdır, ve kültürün pH durumunun basit bir görsel göstergesini oluşturmaktadır (Langdon, 2010).

Son olarak, ortamdan suyun buharlaşması, sonunda hücre lizisine neden olabilecek tuz seviyelerini konsantre edeceğinden, nem seviyeleri önemlidir. Optimal büyüme için, medyanın ozmolalitesi nispeten dar sınırlar içinde tutulmalıdır.

3.2 Birincil Hücre Kültürü

Birincil kültür, yani bir kişiden kurulan başlangıç kültürü, orijinal doku ile en yakından ilişkili durumu temsil eder. Kullanılan birincil malzeme, hücrelerin doğrudan fragmandan göç edebileceği ve büyüyebileceği substrata tutturulabilecek bir fragman, örneğin bir eksplantın mekanik veya enzimatik yollarla tek parçaya ayrılabilen tümör materyali olabilir.

Malzemenin kaynağı, bu işlemin etkinliği üzerinde kritik role sahip olabilir. Kültürler, süspansiyonda halihazırda hücreleri içeren primer asit veya plevral efüzyonlardan katı tümörlerden daha kolay oluşturulur. Ayırştırmak için rutin olarak kullanılan enzimler arasında tripsin ve kollajenaz bulunmaktadır (Langdon, 2010).

3.3 Kanser Hücre Hatları

Birincil kültürün ötesinde bir kültürün geliştirilmesi bir “hücre hattı” ile sonuçlanır. Bir hücre hattının önemi, tekrar çalışmaları için yenilenebilir bir hücre materyali kaynağı sağlama yeteneğinde olmasıdır. Hücre hattı modelleri, orijinal kanserin özelliklerini yansıtmalıdır, örneğin; bağışıklık yetersizliği olan farelere nakledildiğinde histopatolojinin korunması, genotipik ve fenotipik özellikler, gen ekspresyonu ve ilaç duyarlılığının olmasıdır. Bununla birlikte, genellikle *in vitro* büyüme için seçilen zayıf farklılaşmış tümörlerden sıklıkla hızlı büyüyen hücre dizileri olduğundan, yaygın kullanımdaki hücre dizileri her zaman klinik hastalığın çoğunda bulunanları yansıtmayabilir (Langdon, 2010).

Hemen hemen her tür kanser hücresi kültür ortamında yetiştirilebilir. 1960'ların başında Hayflick ve Moorhead'in klasik çalışmaları, diploid insan fibroblastlarının

“kriz” ve yaşlanmaya girmeden önce kültürde sınırlı sayıda bölünmeye (yaklaşık 50) maruz kalabileceğini göstermiştir. Çoğu kanser hücre dizisi belirsiz sayıda bölünmeye başlar ve ölümsüz hücre hatları binlerce bölünmeye kadar uzanabilir. Bir hücre dizisinin "sürekli" olabilmesi için, başlangıç kültüründe süresiz olarak bölünme kabiliyetine sahip hücrelerin düşük seviyelerde bulunması veya hücrelerin "transformasyon" geçirmesi gerekir. Bu dönüşüm kimyasal veya viral yollarla sağlanabilir. Yeni bir hücre hattı oluşturulduktan sonra, kontaminasyon içermediği karakterize edilmeli ve doğrulanmalıdır (Langdon, 2010).



4. MATERİYAL ve METOD

Yürütülen yüksek lisans tezinde, antikarsinojenik etkisi halk arasında bilinen yöreye özgü, coğrafi tescil işareti olan Taşköprü sarımsağının farklı yöntemler kullanılarak elde edilen özütleri ile kolon kanserinin tedavisine yönelik antikarsinojenik reaktif araştırmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında antikarsinojenisitesi araştırılan reaktif maddelerin, sağlıklı hücrelere olan etkileri kemik iliği mezankim kök hücreleri kullanılarak tespit edilmiştir. Kemik iliği mezankim kök hücreleri, yüksek plastisiteye sahip olması nedeniyle başta bağ dokusu hücreleri olmak üzere çok sayıda vücut hücresine farklılaşabilme kapasitesine sahip olması nedeniyle kontrol grubu analizleri için tercih edilmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan sarımsak ektratlarının Kolorektal kanser hücreleri ile kemik iliği mezankim kök hücreleri üzerine olan olası etkileri karşılaştırılmalı olarak test edilmiş ve bulguları birlikte değerlendirilmiştir.

4.1 Materyal

Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda yerine göre analitik saflıkta yerine göre daha yüksek saflıkta reaktifler kullanılmıştır. Sarımsak olarak Kastamonu İli Taşköprü ilçesinde yetişen ve coğrafi tescili almış olan Taşköprü Sarımsağı ve bu sarımsağın ısıtma fermentasyonu ile üretilmiş siyah sarımsak kullanılmıştır.

Maserasyon yağı elde etme çalışmalarında kullanılacak olan zeytin yağı piyasadan saf sızma zeytin yağı olarak satın alınarak, serbest yağ asidi miktarı ölçüldükten sonra kullanılmıştır. Çalışmaların temelini oluşturan sarımsak, coğrafi yer işareti almış olan Kastamonu-Taşköprü sarımsağı üreticiden satın alınarak kullanılmıştır. Siyah sarımsak, Kastamonu-Taşköprü sarımsağının ısıtma fermentasyonu ile laboratuvar ortamında elde edilerek kullanılmıştır.

Hücre kültürü işlemlerinde kullanılan α -MEM (Sigma, ABD), FBS (EC, İtalya), penisilin streptomisin (Sigma, ABD), MTT (Serva, Almanya) satın alınarak kullanılmıştır.

4.2 Metot

Tez çalışması kapsamında yapılacak işlemlerde belirli bir düzen takip edildi. Bu işlemler aşağıda listelendi. Söz konusu işlemlerin ardından elde edilen sonuçlar SPSS ve öğrenci t-testi ile değerlendirildi.

- Zeytin yağının yağ asitliğinin tayini
- Sarımsak ekstraktlarının hazırlanması
- Sarımsak yağlarının LC-MS-MS ve GC-MS analizleri
- Sarımsak yağlarının FTIR analizi
- Kolon kanseri (HCT116) ve kemik iliği Mezankimal Kök Hücre Hatlarının (kiMKH) hazırlanması
- HCT116 ve kiMKH 96-kuyucuklu petrilere ekimi
- Hazırlanan reaktiflerin ve kontrol olarak saf zeytinyağı ve cisplatin ile sistotoksik analizler ve MTT sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ile IC50 değerinin tespiti

4.2.1 Serbest Yağ Asitliğinin Tayini

Yağlarda, serbest yağ asitleri toplamı, oleik asit yüzdesi olarak belirtilmektedir. Yağlardaki asit sayısı ise 1 gram yağın nötrleştirilmesi için gerekli potasyum hidroksit veya sodyum hidroksidin mg olarak ağırlığı şeklinde tanımlanmaktadır ve buna asit yüzdesi de denilmektedir. Maserasyon işlemlerine başlamadan önce, zeytin yağı içerisindeki serbest yağ asiti miktarı tespit edildi. Serbest yağ asiti miktarı yağdan alınan numunenin, etanolde hazırlanmış 0,1 N KOH ile titre edilmesi ile tespit edildi. Analiz numunesinin serbest yağ asitliği kütlece yüzde değer olarak ve genellikle oleik asit üzerinden aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı.

Harcanan her ml 0,1 N KOH 0,028 g oleik aside eş değerdir. Buna göre;

$$\% \text{Serbest Yağ Asidi} = V/m \times 0,028 \times 100 \text{ (\%oleik asit cinsinden)}$$

Burada: V= Titrasyonda harcanan 0,1 N etil alkollü potasyum hidroksit çözeltisi hacmi (ml) m= Alınan numunenin kütlesi (g).

Titrasyon sonucunda serbest yağ asiti miktarı %1'in altında kaldığı (%0,8) için serbest yağ asitliğini düşürmek için ek bir işlem yapılmasına gerek görülmedi ve diğer işlemlerde doğrudan kullanıldı.

4.2.2 Siyah Sarımsağın Hazırlanması

Siyah sarımsak eldesi için orta boy diş büyüklüğüne sahip Taşköprü sarımsağı kullanıldı. Sarımsaklar kabuklarından ayrılmadan saplarından temizlendi. Sonra, hava ve nem giriş-çıkışına izin veren ventilasyon kapaklı plastik kaplara konuldu. Sonrasında, 60°C'ta ayarlı %90 nem ayarlı özel üretim nem kabininde (Elektromag, Türkiye) 40 gün süreyle inkübe edildi. Süre sonunda fermentasyonu tamamlanarak elde edilen siyah sarımsaklar daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere 4°C'ta muhafaza edildi.



Şekil 4.1 Siyah sarımsaklar, ham Taşköprü sarımsaklarının nem ayarlı etüvde 40 gün inkübasyonu ile hazırlandı. İnkübasyon sonucu oluşan siyah sarımsaklar elde edildi.

4.2.3 Ekstraksiyon Çalışmaları

Sarımsak ekstraktlarının eldesi için dört farklı yöntem kullanıldı. Sarımsak yağının elde edilmesinde maserasyon, soxhlet ekstraksiyonu ve soğuk ekstraksiyon yöntemi kullanılırken, uçucu yağlar clevenger düzeneği ile elde edildi.

4.2.3.1 Beyaz sarımsak lipojenik maserasyon ekstraktının hazırlanması

Orta büyüklükte 20 diş (120 g) sarımsak kabukları soyularak havan yardımı ile ezildi. Ezilen sarımsaklar 100 ml zeytinyağı ile ışık geçirmeyen cam şişeye konularak 30 gün boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücre kültüründe kullanmadan önce, sarımsak parçaları filtre kağıdı yardımı ile uzaklaştırıldı. Elde edilen maserat yağı laminar kabin içerisinde steril enjektör filtresi ile steril falkon tüp içerisine konularak, stokları çözeltielerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4.2.3.2 Siyah sarımsak lipojenik maserasyon ekstraktının hazırlanması

Orta büyüklükte 40 diş (120 g) siyah sarımsak kabukları soyularak bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan sarımsaklar 50'lik santrifüj tüp içerisine konularak üzerine 100 ml zeytinyağı eklendi. Santrifüj tüp alüminyum folyo ile sarılarak 30 gün boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Hücre kültüründe kullanmadan önce, şişe içerisindeki sarımsak parçaları filtre kağıdı yardımı ile uzaklaştırıldı. Elde edilen maserat laminar kabin içerisinde steril enjektör filtresi ile steril falkon tüp içerisine konularak, stok çözeltielerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4.2.3.3 Sıcak ekstraksiyon ile sarımsak ekstraktının eldesi

Sıcak ekstraksiyon yöntemi soxhlet düzeneği ile gerçekleştirildi. Bu işlem için, 100 g beyaz sarımsağın kabukları soyuldu ve bıçak yardımı ile küçük parçalara ayrıldı. 200 ml %50 etanol içerisinde 1 saat boyunca soxhlet sistemde kaynatıldı. Elde edilen ekstrakt soğuduktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Akabinde evaporasyon ile etanol uzaklaştırıldı ve konsantre sulu çözelti elde edildi. Hücre kültüründe kullanılmadan önce elde edilen ekstrakt steril enjektör filtresi ile steril falkon tüp içerisine konularak, stok çözeltielerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4.2.3.4 Beyaz sarımsağın soğuk ekstraksiyonu

Maserasyon yöntemi ile soğuk ekstraksiyon işlemi etanol içerisinde gerçekleştirildi. 20 g Taşköprü sarımsağı havan içerisinde dövüldükten sonra bir erlen içerisine alındı.

Üzerine 50 ml absolut etanol eklendi ve erlenin ağzı hava kaçırmayacak şekilde kapatıldı. Hazırlanan karışım ekstraksiyon işleminin tamamlanması için 3 gün süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Sürenin sonunda sarımsak parçaları adi süzgeç kağıdı kullanılarak ekstrakttan ayrıldı. Akabinde etil alkol evaporasyon ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan ekstrakt stok çözeltilerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4.2.3.5 Siyah sarımsağın soğuk ekstraksiyonu

Maserasyon yöntemi ile soğuk ekstraksiyon işlemi etanol içerisinde gerçekleştirildi. ham sarımsağın fermentasyonla hazırlanmış 20 g siyah Taşköprü sarımsağı havan içerisinde dövüldükten sonra bir erlen içerisinde alındı. Üzerine 50 ml absolut etanol eklendi ve erlenin ağzı hava kaçırmayacak şekilde kapatıldı. Hazırlanan karışım ekstraksiyon işleminin tamamlanması için 3 gün süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Sürenin sonunda sarımsak parçaları adi süzgeç kâğıdı kullanılarak ekstrakttan ayrıldı. Akabinde etil alkol evaporasyon ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan ekstrakt stok çözeltilerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.



Şekil 4.2 Siyah sarımsağın etanol içerisinde oda sıcaklığında gerçekleştirilen ekstraksiyonu

4.2.3.6 Beyaz sarımsak uçucu yağlarının eldesi

Su destilasyon yöntemi ile uçucu yağlar elde edilmeye çalışıldı. Bunun için 3 kg beyaz sarımsak kabukları soyularak parçalayıcı içerisinde konuldu. Blenderda küçük parçalar haline getirilen sarımsak balon içerisinde konularak üzerine saf su eklendi. Clevenger

düzenine yerleştirildikten sonra, 3 saat süreyle mantolu ısıtıcıda ısıtılarak su destilasyonu ile beyaz sarımsak uçucu yağı elde edildi. Uçucu yağ bileşiminin az olması nedeniyle 3 kilo sarımsak kullanılarak 3.5 ml uçucu yağ elde edildi.



Şekil 4.3 Clevenger düzeneği ile sarımsak uçucu yağlarının elde edilmesi işlemi.

Clevenger cihazında yağ toplama işlemi bittikten sonra az miktarda yağ elde edilmesi nedeniyle, steril enjektör filtresinden geçirilmeden önce bir ana stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan ana stok çözelti hücre kültüründe kullanılmadan önce steril enjektör filtresi ile steril falkon tüp içerisine konularak indüksiyon stoklarını hazırlamak için kullanıma hazır hale getirildi.

Siyah sarımsaktan uçucu yağ elde edilemediğinden, tez kapsamında yapılan işlemlerde sadece beyaz sarımsak uçucu yağları kullanılmıştır.

4.2.4 Fourier Dönüştümlü İnfrared Spektrofotometre (FTIR Analizi)

Hazırlanan ekstrakt ve maserasyon örneklerinin yapılarında bulunan moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçmek ve moleküldeki fonksiyonel grupları tespit etmek amacıyla elektromanyetik spektrumunda $4000-450\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu arasında FTIR analizi Bruker Marka alpha model ATR FTIR cihazı ile gerçekleştirildi. Analizler, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında yaptırıldı.

4.2.5 Kromatografik Analizler

4.2.5.1 Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) Analizi

Ekstrasyon ve maserasyon örneklerinin kromatografik analizleri Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında yaptırıldı. Analizler Shimadzu LCMS-8040 LC-MS/MS cihazı kullanılarak yapıldı. Analiz sırasında; Q3 Scan metodu, kolonsuz enjeksiyon, 1dk analiz süresi, 0,2 µl Enjeksiyon hacmi, %1 formik asit içeren ultra saf su (Mobil faz A) ve %1 formik asit içeren metanol (Mobil faz B) parametreleri kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi.

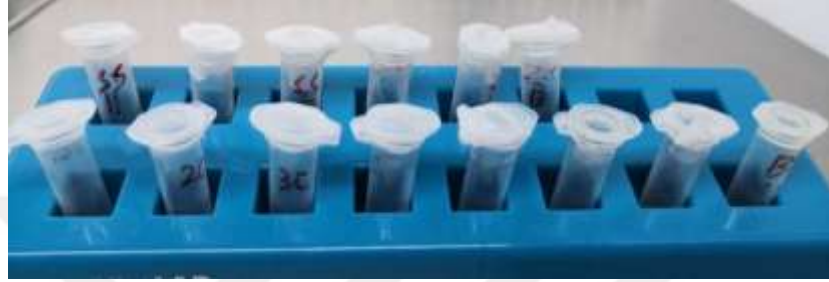
4.2.5.2 Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) analizi

Yağ örneklerinin gaz kromatografik analizleri Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında yaptırıldı. Analizler Shimadzu GCMS QP 2010 ULTRA cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar cihaz kütüphanesi ile karşılaştırıldı. Analizlerde aşağıdaki parametreler kullanıldı.

- Kolon: RTX-5MS Kapiler kolon (30m ; 0,25 mm; 0,25 µm).
- Taşıyıcı gaz: Helyum
- Kolon fırını sıcaklığı: 40°C
- Enjeksiyon sıcaklığı: 250°C
- Basınç: 100 kPa
- Enjeksiyon modu: split
- Split oranı: 10
- Enjeksiyon hacmi: 1µl
- Fırın sıcaklık programı: 40°C’de 3 dk, 40°C’den 240°C’ye 4°C/dk artışla, 240 °C’da 10dk, Toplam 63 dk.
- Interface sıcaklığı: 250°C
- İyon kaynağı sıcaklığı: 200°C
- Toplam akış: 0,3000 mL/dk
- B.Conc: 50,0%
- Nebulizasyon gaz akış: 3,0 L/dk
- Kurutma gazı akışı: 15,0 L/dk
- DL sıcaklığı: 250°C
- Heat block sıcaklığı: 400°C
- CID Gaz: 230 kPa

4.2.6 Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Hücre kültüründe kullanılacak olan ekstraktlar 0,22 µm gözenek boyutuna sahip steril filtreden geçirildikten sonra stok ekstraktlar hazırlandı. Soxhlet ve cisplatin DMEM, maserasyon ve clevenger ile elde edilen sarımsak yağlarının ise Fetal Sığır Serum (FBS) kullanılarak stok çözeltileri hazırlandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.4 Hazırlanan stok çözeltiler.

Hazırlanan çalışma çözeltileri IC50 değerini tespit etmek üzere Tablo 4.1'deki dozlarda kullanıldı. Öncelikle maserasyon örneklerinin sitotoksikite analizleri 1-80 ppt aralığında test edildi. Diğer reaktif numune grupların analizlerinde kullanılacak dozlarda, maserat yağlarının sonuçları baz alındı ve alınan sonuçlara göre gerekli görülen gruplarda ek doz denemeleri yapıldı.

Tablo 4.1 Çalışılan reaktif doz konsantrasyonları. Öncelikle maserasyon denemeleri yapılmış olup, elde edilen verilere göre diğer deney gruplarının dozları belirlenmiştir.

Çalışma Konsantrasyonu (ppt)	1	3	5	10	20	40	60	80	100	120	150	175	200
Ekstraksiyon tekniği													
BS Maseratı	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SS Maseratı	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Soxhlet Ekstraktı	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BS Soğuk Ekstrakt	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SS Soğuk Ekstrakt	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Uçucu Yağlar	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Cisplatin	X	X	X	X	X	X	X	X					
Zeytin Yağı	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

4.2.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

HCT 116 (insan kolon kanseri) hücre hatları İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana bilim Dalından temin edilerek çoğaltıldı ve kullanılacağı zamana kadar sıvı azot içerisinde saklandı. Mezenkimal kök hücreleri ise Kastamonu Üniversitesi Doku Mühendisliği, Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarı envanterinde bulunan Wistar albino sıçanlarından izole edilerek sıvı azotta dondurularak saklanmış 8. pasaj kemik iliği Mezenkimal Kök Hücrelerinden temin edilerek kullanıldı.

4.2.7.1 HCT116 hücre hatlarının hazırlanması

Sıvı azot tankı içerisinde saklanan HCT116 hücreleri oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlandı. Çözülen hücre hattı 15 mL'lik santrifüj tüp içerisine konularak üzerine 5 ml DMEM (yüksek glukoz) eklendi ve 10 dakika 4°C 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet %10 FBS, %1 penisilin streptomisin içeren DMEM (yüksek glukoz) besiyerinde çözüldü ve T-75 hücre kültürü kaplarına ekimi yapıldı. 37°C, %5 CO₂ ve %90 nem içeren inkübatörde kültür işlemi gerçekleştirildi.

Çoğalan HCT116 hücreleri, tripsin enzimi kullanılarak alt kültüre alındı. Hücreler istenilen sayıya ulaşana kadar 4 kez pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Tripan mavisi ile Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Ardından, sitotoksik analizler için 96-kuyucuklu petri içerisine 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi.

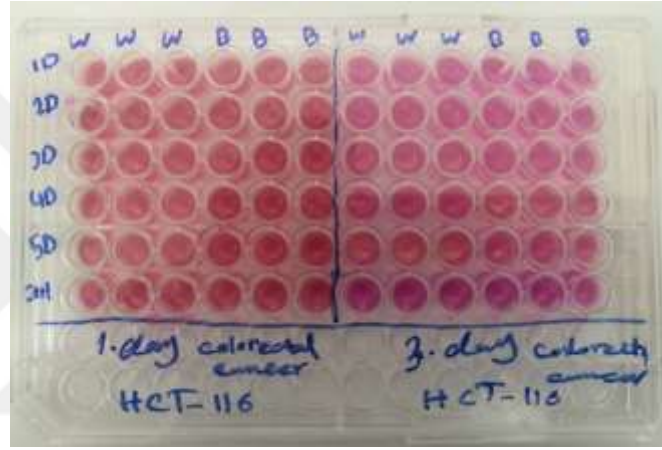
4.2.7.2 Mezenkimal kök hücre hatlarının hazırlanması

Kastamonu Üniversitesi Doku Mühendisliği, Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarı envanterindeki 8. Pasaj kiMKH'lerden temin edilen kiMKH'leri, sarımsak ekstraktlarının sağlıklı hücreler üzerindeki etkisini tespit etmek için kullanıldı. Kök hücreler %10 FBS ve %1 Streptomisin Penisilin içeren α -MEM içerisinde T-75 hücre kültür kaplarına konularak 37°C, %5 CO₂, %95 hava ve %90 nem içeren inkübatörde kültür işlemi gerçekleştirildi. Hücreler istenilen sayıya ulaşana kadar 4 kez pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Tripan mavisi ile Thoma lamı

kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Akabinde, 96-kuyucuklu petri içerisine 1000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi.

4.2.7.3 Sarımsak reaktiflerinin hazırlanması ve uygulanması

Hücre ekiminden sonra hücrelerin petri yüzeyine yapışmaları için 24 saat beklendi. Hazırlanan reaktif doz konsantrasyonları (Tablo 4.1) süre sonunda kültür ortamına eklenerek indüksiyon işlemine başlandı. Üçüncü ve beşinci günlerde vasat ortamı, taze vasat ve reaktifler ile değiştirildi.



Şekil 4.5 HCT116 hücrelerinin indüksiyonu.

4.2.7.4 Kontrol analizleri

Cisplatin, kanseri tedavi etmek için kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Deneylerimizde kanseri tedavi etme yeteneğinin karşılaştırılmasında HCT116 hücreleri için pozitif kontrol olarak cisplatinin 8 farklı dozu kullanıldı. Analizlerde, diğer sarımsak dozları için kullanılan protokollerin aynısı kullanıldı.

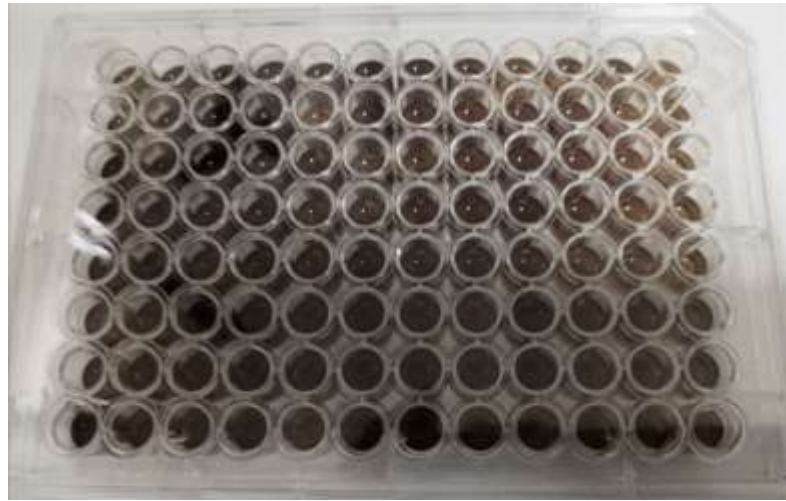
Maserat çalışmalarında baz yağı olarak kullanılan yüksek saflıktaki sızma zeytin yağı (ZY) kontroller için kullanıldı ve sarımsak maseratlarına olan etkisi araştırıldı. Çalışma kapasamında HCT116 ve kiMKH kültürlerinde tablo 4.1’de verilen dozlarda reaktif ZY eklenerek sitotoksik ve/veya indüktör etkisi MTT analizi ile test edildi. Bulunan sonuçlar, reaktif maddelerin sonuçları ile karşılaştırılarak etkisi değerlendirildi.

Kontrol olarak ayrıca hiçbir işlem uygulanmamış hücreler kullanıldı ve belirlenen zaman noktalarındaki MTT analizlerinde negatif kontrol olarak kullanıldı. Reaktiflerin etkisi negatif kontrol sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Yüzde canlılık değeri negatif kontrol için canlılık değeri %100 kabul edilerek hesaplandı.

4.2.7.5 MTT analizi

Elde edilen ekstraktların sitotoksik etkisini gözlemlemek için hücrenin mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı kolorimetrik MTT analizi ticari deney test kiti (Serva, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre canlılığını değerlendirmek için, hücreler reaktif doz uygulanmasından sonraki 1. 3. ve 5. günlerde tüm gruplar için MTT deneyi gerçekleştirildi. Analiz işlemi için kültür ortamı çıkarılarak her bir kuyucuk içerisine 225µl DMEM (%1 penisilin/streptomisin içeren), 25µl MTT reaktifi eklendi. Hücreler MTT ile 4 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi (Şekil 4.4).

Süre sonunda oluşan formazan kristalleri invert faz kontrast mikroskobu ile gözlemlendi. Akabinde formazan kristalleri 250 µl %1'lik HCL (isoprpanolde) çözeltisi ile muamele edilerek çözüldü ve 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucusu (Biotek, ABD) kullanılarak absorbans ölçümü yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol gruplarına karşı grafiğe geçirilerek istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm deney grupları için aynı işlemler uygulandı.



Şekil 4.6 MTT reaktifi ile hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonrası görünümü.

4.3 Mikroskopik İncelemeler

Hücre kültürü işlemleri günlük olarak invert faz kontrast mikroskobu (Leica DMIL Led, Almanya) kullanılarak takip edildi. Ayrıca, örneklerle uygulanan MTT testinden önce ve sonra, hücrelerin indüklenmesinden sonraki ilk gün ve stokların uygulanmasından sonraki ilk, üçüncü ve beşinci gün için mikroskop incelemeleri yapılarak, görüntüler kayıt altına alındı.

4.4 İstatistiksel Analiz

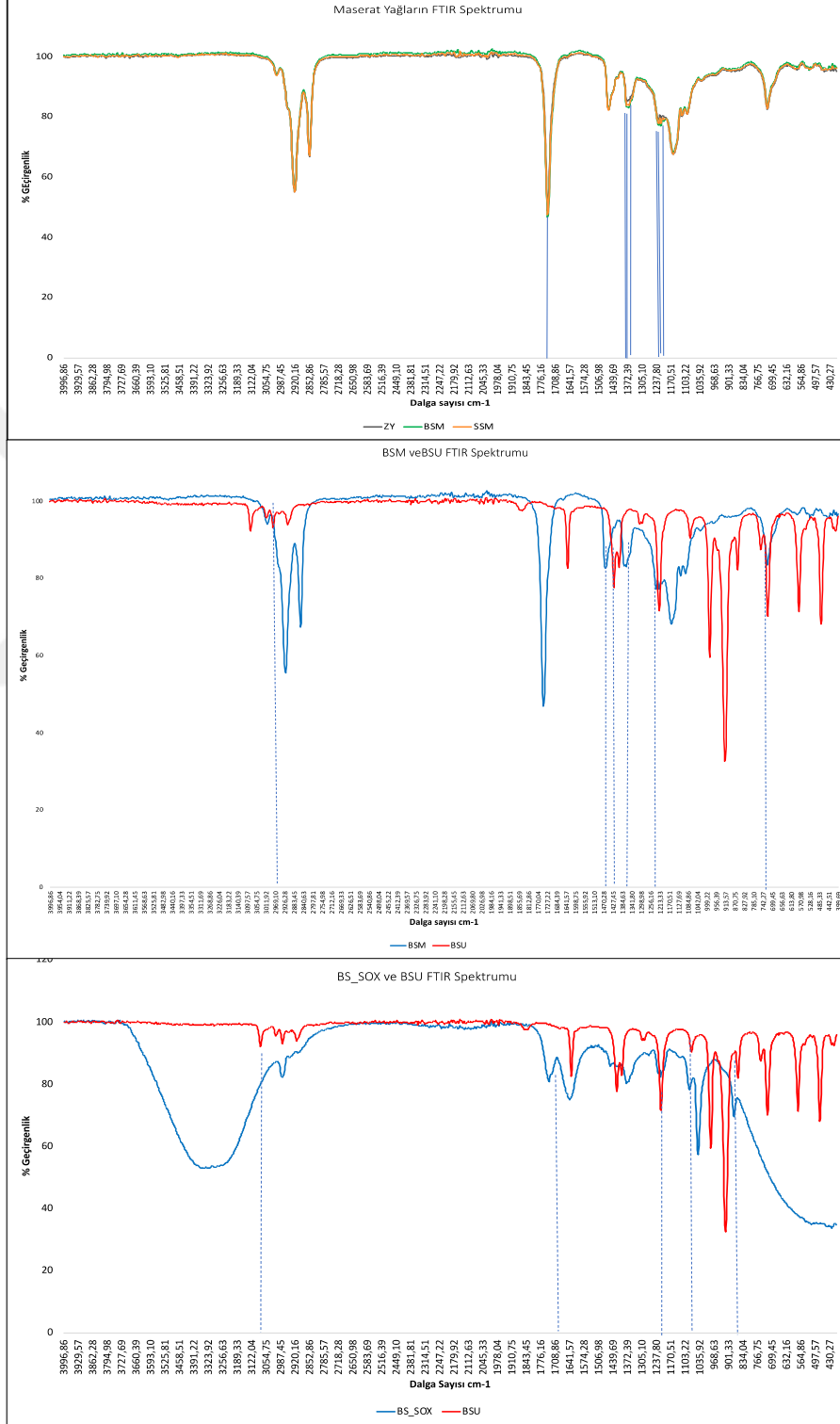
Kantitatif MTT testlerinden elde edilen sonuçlar, SPSS ve öğrenci t-testi kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler sırasında deney gruplarının karşılaştırmalı sonuçları gerçekleştirilerek, kullanılan reaktiflerin antikarsinojenik etkisi değerlendirildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 FTIR Analizi

Üretimlerinde kullanılan farklı yöntemler sonucu bileşimi ve içeriği değişen sarımsak ekstraktları elde edildi. Bu ekstraktların yapılarında bulunan kimyasal bileşenlerin bağ titreşim frekanslarını ölçmek ve moleküldeki fonksiyonel grupları tespit etmek amacıyla elektromanyetik spektrumundaki $4000-400\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında, 4 cm^{-1} rezolüsyonda 24 tarama parametresi kullanılarak Bruker Marka alpha model ATR FTIR spektroskopi cihazı ile numunelerin FTIR analizi yapıldı (Şekil 5.1). Farklı yöntemlerle hazırlanan sarımsak reaktiflerinin FTIR spektrumları hidroksil, karbonil, karboksilik ve organosülfür bileşikler gibi fonksiyonel grupların varlığını gösterdi. Soxhlet ektrasyonu ile hazırlanan BS_SOX örneğindeki $3660-3054\text{ cm}^{-1}$ 'deki arasındaki geniş bant geniş zirve, flavonoidler, flavonoid olmayanlar ve saponinler gibi polihidroksi bileşiklerin varlığını gösteren bir hidroksil grubunun O-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Tüm örneklerde $2920-2969\text{ cm}^{-1}$ civarındaki pik, aromatik bileşiklerin C-H gruplarının asimetrik gerilmesinden kaynaklanmaktadır. BS_SOX için 1738 cm^{-1} 'deki pik lipidlerdeki ester gruplarını işaret eden C-O gerilmelerine aittir. Uçucu yağ bileşenlerinde (BSU) 1634 ve BS_SOX 1640 cm^{-1} 'deki pikler karboksilat eğrisindeki farklı fonksiyonel grupların karbonil gruplarını, sırasıyla 1422 ve 1452 cm^{-1} 'deki pikler OH gruplarını gösterir. Fonksiyonel gruplar için 2969 ile 1422 cm^{-1} aralığındaki bu pikler büyük olasılıkla sarımsak içerisindeki lipid bileşenlerini göstermektedir. Uçucu yağ bileşenlerinde (BSU) 1398 cm^{-1} 'deki şiddetli pik ve BS_SOX örneğinde daha zayıflamış olarak 1376 cm^{-1} 'deki pik, karboksilik asitlerin O-H eğimini gösterir ve bu da flavonoidlerin, tanenlerin ve glikozitlerin varlığını ortaya çıkarır. BS_SOX örneğindeki $1084-1043\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ile BSU'da $1074-985\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, S=O grubu içeren alliin, allisin ve dialil disülfür dahil olmak üzere organosülfür bileşiklerinin ve primer aminlerin C-N gerilmelerinin varlığını ortaya çıkarır. BSU'da 914 cm^{-1} 'de görülen pik, $=\text{CH}_2$ 'nin C-H deformasyonuna atanabilirken, BSU spektrumundaki 857 ve BS_SOX spektrumundaki 877 cm^{-1} 'de görülen pik alinin amin grubu olan birincil amin eğrileri N-H titreşimini gösterir. Maserat yağlarında ise genel olarak zeytinyağına özgü pikler görüldü. Ancak, 1378

cm^{-1} civarında karboksilik asitlerin O-H eğimini gösteren zayıf piklerin şiddetinde, BSM, SSM sırasında kısmi bir artış görüldü. Benzer şekilde 1229 ve 1213 cm^{-1} 'de PO2 gerilmelerine ait piklerde BSM, SSM sırasında kısmi artış belirdi.



Şekil 5.1 Maserat yağları, baz yağ olarak zeytinyağı, uçucu yağ bileşeni ile soxhlet ekstraktının FTIR spektrumu.

5.2 Sarımsak Ekstraktlarının GC-MS ile Bileşen Analizi

Allium sativum uçucu yağının bileşimi literatür ile benzer olmakla birlikte total diallil sülfidlerin oranı % 87,32 ile literatürden oldukça yüksektir. Taşköprü sarımsağından elde ettiğimiz uçucu yağ bileşiklerinden total trisülfidlerin oranı % 54,83 olarak bulundu. İçerisindeki bileşiklerden diallil disülfür organik bir disülfür olup sarımsak ve *Allium* cinsinin diğer türlerinden izole edilir. Antineoplastik ajan, antihipertansif ajan, antifungal ajan ve bitki metaboliti olarak rol oynar. Diallil trisülfid ise sarımsak uçucu yağının en temel bir bileşenidir ve geleneksel tıp ürünü allitridium'un önemli bir içeriği olup antifungal, antitümör ve antioksidan aktivite gösterir. Ayrıca, apoptoz indükleyici, antineoplastik ajan, anti-enflamatuvar ajan, trombosit agregasyon inhibitörü ve antilipemik ilaç olarak bir role sahip çok önemli ve değerli bir bileşiktir.

Tablo 5.1 GC-MS analizi sonucu *Allium sativum* uçucu yağının kimyasal bileşimi.

NO	UÇUCU BİLEŞİK	PIK ALANI (%)
1	1,2-Dithiyolan	0,16
2	Diallil sülfid	0,67
3	3-methyl-piridin	<0,01
4	Allil n-propil sülfid	<0,01
5	Methyl 2-propenil disülfid	2,69
6	Trans-propenil methyl disülfid	0,02
7	Metil propil disülfid	0,01
8	Cis-propenil methyl disülfid	0,07
9	2-Hidroksi-3-metoksi-süksinik asit, dimetil ester	0,08
10	Dimetil trisülfid	0,14
11	Diallil disülfid	36,52
12	Tetrasülfid <diallil->	4,56
13	Allil metil trisülfid	9,09
14	Metil propil trisülfid	0,03
15	3-vinil-[4H]-1,2-dithiin	0,08
16	2-vinil-[4H]-1,3-dithiin	0,30
17	Diallil trisülfid	45,57
TOPLAM PIK ALANI		100

5.3 LC-MS/MS Analizi ile Bileşen Analizi

Beyaz sarımsak maserat yağı BSM ve soxhlet ekstraksiyonu ile hazırlanan BS_SOX numunelerinin bileşimleri LC-MS/MS ile belirlendi. Analiz sonucunda bileşenler kütlelerine göre ayrılarak kromatogram üzerinde tespit edildi. Cihazın kütüphanesi bulunmadığından, literatür kaynakları ve pubMed veri tabanı kullanılarak olası

bileşenler Tablo 5.2'de görüldüğü gibi sınıflandırıldı. Sarımsak bileşiminde olduğu bilinen bileşiklerden 17 tanesi BS-SOX için Tablo 5.2'de verildiği şekilde tanımlandı.

Tablo 5.2 BS_SOX ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.

Türü	Bileşik	Formül	m/z	Mutlak Yoğunluk	Göreceli Yoğunluk	Taranan iyon türü
Karboksilik asit	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	87	123807	5,27	Negatif
Diğer	Hexanethioic acid S-propyl ester	C ₉ H ₁₈ OS	176,1	159217	6,78	Negatif
Sakkarit türevi	Sarmentosin epoxide	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	191,05	330789	14,08	Negatif
Sakkarit türevi	Bis-D-fructose 2',1-2,1'-dianhydride	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	267,1	136789	5,82	Negatif
Sakkarit	Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,15	718494	30,59	Negatif
Sakkarit türevi	Glyceryl laminarabinoside	C ₁₅ H ₂₆ O ₁₄	429,15	2348940	100	Negatif
Sakkarit	Raffinose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	506,1	157782	6,72	Negatif
amino asitler	Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	104,1	8753675	100	Pozitif
Sfingolipitler	C16 Sphinganine	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	105,2	716246	8,18	Pozitif
Amino asitler	Isoleucine/Leucine*	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132,1	555667	6,35	Pozitif
Amino asitler	Tryptophan*	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	175,1	3649431	41,69	Pozitif
amino asit türevi	4-Hydroxyglutamate	C ₆ H ₁₃ NO ₂	176,1	452305	5,17	Pozitif
amino asit türevi	Citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	176,1	452305	5,17	Pozitif
L-sistein türevi	γ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteine	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	291,1	445310	5,09	Pozitif
Amonyum Tuzları	Stearoylcarnitine	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	366,1	732683	8,37	Pozitif
Amino asit türevi	N2-Fructopyranosylarginine	C ₁₂ H ₂₄ N ₄ O ₇	381,05	3871200	44,22	Pozitif
Amino asit türevi	S-(N-Hydroxy-N-methylcarbamoyl) glutathione	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₈ S	381,05	3871200	44,22	Pozitif

BSM için yapılan LC-MS/MS analizinde daha çok baz yağı olarak kullanılan zeytinyağı için bileşenlerin varlığı kromatogramda görüldü. Yapılan taramada pozitif iyon taramasında sarımsağa spesifik bileşenler tespit edilmedi. Sadece negatif iyon taramasında sarımsağa özgü olduğu belirlenen bileşenler tespit edildi ve Tablo 5.3'de verilmiştir.

Tablo 5.3 BSM ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.

Türü	Bileşik	Formülü	m/z	Mutlak Yoğunluk	Göreceli Yoğunluk	Tarama İyon Türü
Sülfoksit	Methyl-L-cysteine sulfoxide (Methiin)	C ₄ H ₉ NO ₃ S	61,95	219471	9,63	Negatif
Sülfoksit	Dulcitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	88,95	137992	6,06	Negatif
Furoik asit ve türevi	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	C ₆ H ₆ O ₄	113	133044	5,84	Negatif
Peptit	Glutamylphenylalanine	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₅	129,95	363297	15,94	Negatif
Aminoasit türevi	Glutamylphenylalanine		146,95	252326	11,07	Negatif
Karbonhidrat türevi	disakkarit fosfat		255,3	334954	14,7	Negatif

Soğuk ekstraksiyon yönteminde etanol içerisinde maserasyon ile hazırlan ham/beyaz sarımsak ekstraksiyonunun (BSS) LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen bileşenler tablo 5.4'te verildiği şekilde bulundu. Pozitif ve negatif iyon taramaları sonucunda önemli olarak sarımsağa özgü alliin bileşeni ile diğer sülfürlü bileşenler belirlendi.

Tablo 5.4 BSS ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.

Türü	Bileşik	Formülü	m/z	Mutlak Yoğunluk	Göreceli Yoğunluk	Tarama İyon Türü
Amonyum tuzları	Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104,1	7072467	100	Pozitif
Sülfoksitler	Allyl-L-cysteine sulfoxide (Alliin)	C ₆ H ₁₁ NO ₃ S	178,05	2690050	38,04	Pozitif
L-cysteine derivatives	γ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteine	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	291,1	5959498	84,26	Pozitif
Amonyum Tuzları	Stearoylcarnitine	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	365,05	3137056	44,36	Pozitif
Aminoasit türevi	S-(N-Hydroxy-N Methyl Carbamoyl) glutathione	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₈ S	381,1	1145525	16,2	Pozitif
L-sistein türevi	γ -Glutamyl-S-allyl-L-cysteine	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	289,15	329922	11,45	Negatif
Sakkaritler	Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,2	745309	25,87	Negatif
Sakkarit türevler	Glyceryl laminarabioside	C ₁₅ H ₂₆ O ₁₄	429,1	1347679	46,78	Negatif

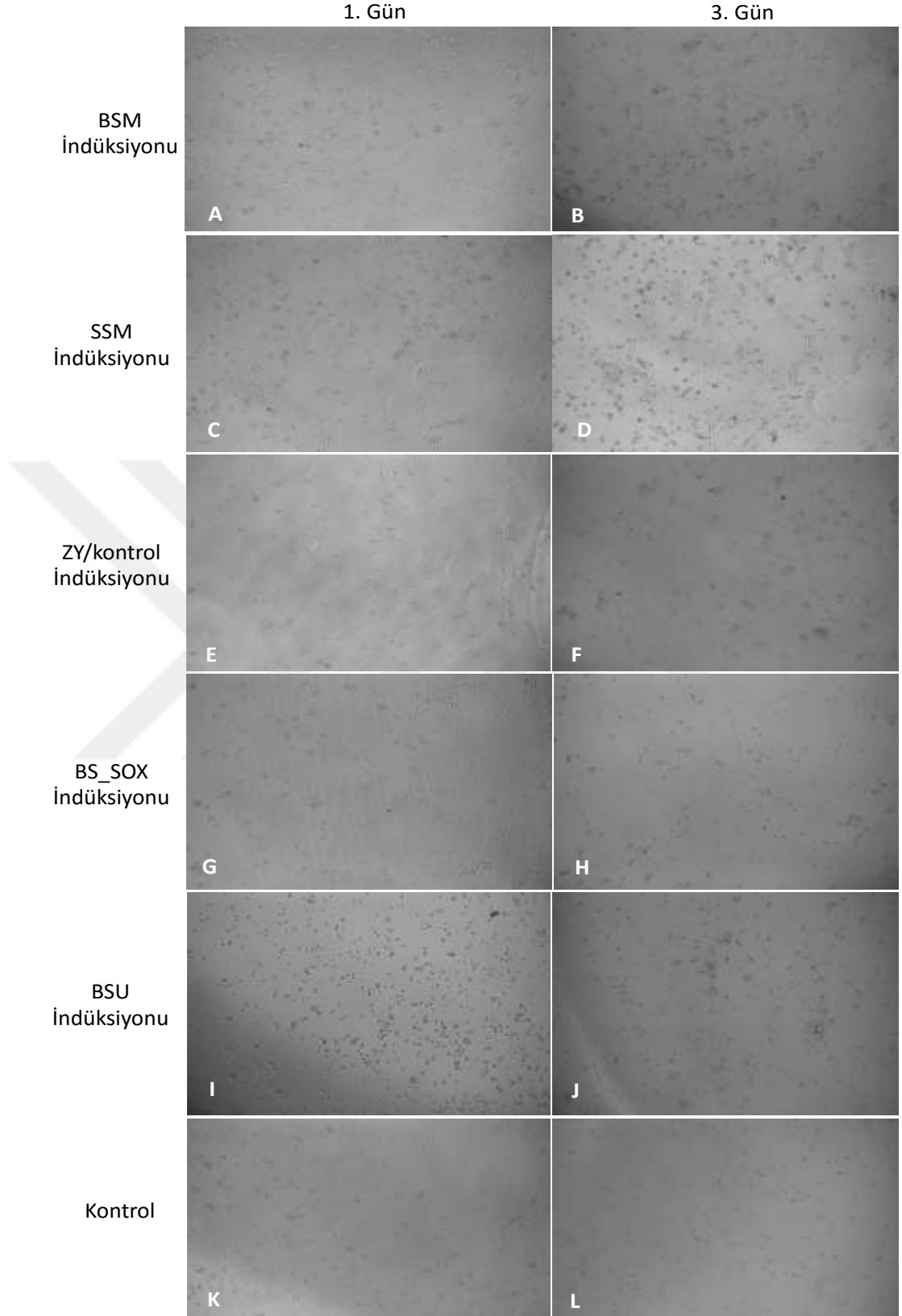
Soğuk ekstraksiyon yönteminde etanol içerisinde maserasyon ile hazırlan siyah sarımsak ekstraksiyonunun (SSS) LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen bileşenler tablo 5.5’te verildiği şekilde bulundu. Pozitif ve negatif iyon taramaları sonucunda önemli olarak sarımsağa özgü özellikle pozitif iyon türleri ağırlıklı olarak belirlendi.

Tablo 5.5 SSS ekstraktında tanımlanan bileşikler ve tanımlamayı destekleyen ana parametreler.

Türü	Bileşik	Formülü	m/z	Mutlak Yoğunluk	Göreceli Yoğunluk	Tarama İyon Türü
Amonyum tuzları	Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104,1	6099757	52,92	Pozitif
Amino asitler	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	175,1	1933046	16,77	Pozitif
Peptides	Ala Pro Ser	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₅	203	11526633	100	Pozitif
Laktonlar ve türevleri	Dehydro-D-arabinono-1,4-lactone	C ₅ H ₆ O ₅	290,1	8836214	76,66	Pozitif
Saccharide derivatives	Threonic acid	C ₄ H ₈ O ₅	135,05	914078	11,65	Negatif
Amonyum tuzları	Trimethyllysine	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	179,1	7845760	100	Negatif

5.4 Mikroskopik Analiz

Sarımsak reaktifleri uygulandıktan sonra hücrelerin, morfolojik görüntüleri ve miktarları faz kontrast mikroskobu ile görüntülendi. Şekil 5.2’de 5 ppt doz uygulanan kiMKH’lerin 1. ve 3. günlere ait fotoğrafları verildi. Tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 5.2 kiMKH'lere BSM (A: 1. gün, B:3. gün), SSM (C: 1. gün, D:3. gün), ZY/kontrol (E: 1. gün, F:3. gün), BS_SOX (G: 1. gün, I:3. gün), BSU (J: 1. gün, K:3. gün) indüksiyonu uygulanmış ve kontrol (L: 1. gün, M:3. gün) gruplarının invert faz kontrast mikroskobu görüntüleri. (10X büyütme ile çekilmiştir)

5.5 MTT Analizi

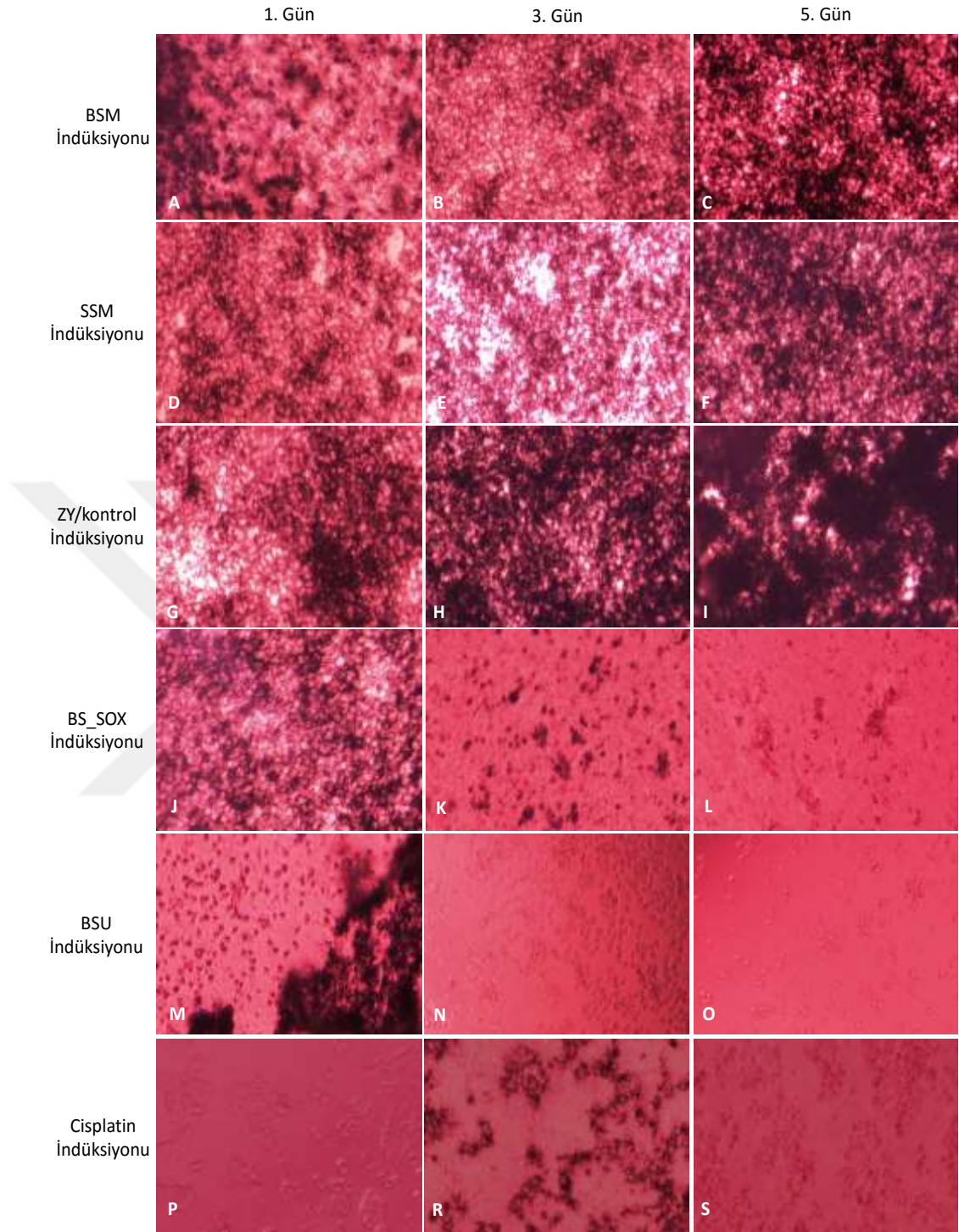
5.5.1 Kalitatif MTT Analizi

HCT116 hücre hatları üzerine farklı yöntemlerle hazırlanmış olan sarımsak reaktifleri eklenerek 5 gün süreyle inkübe edildi. 1, 3 ve 5'inci günlerde yapılan MTT analizleri sonucunda formazan kristallerinin oluşma yoğunluğu hücre canlılığı ile korele edildi. Sarımsak reaktiflerinden en az sitotoksik etkiyi zeytin yağında lipojenik maserasyonla hazırlanan sarımsak ekstratlarının gösterdiği, en yüksek sitotoksik etkiyi ise beyaz sarımsak uçucu yağları ile soxhlet ekstratlarının gösterdiği belirlendi.

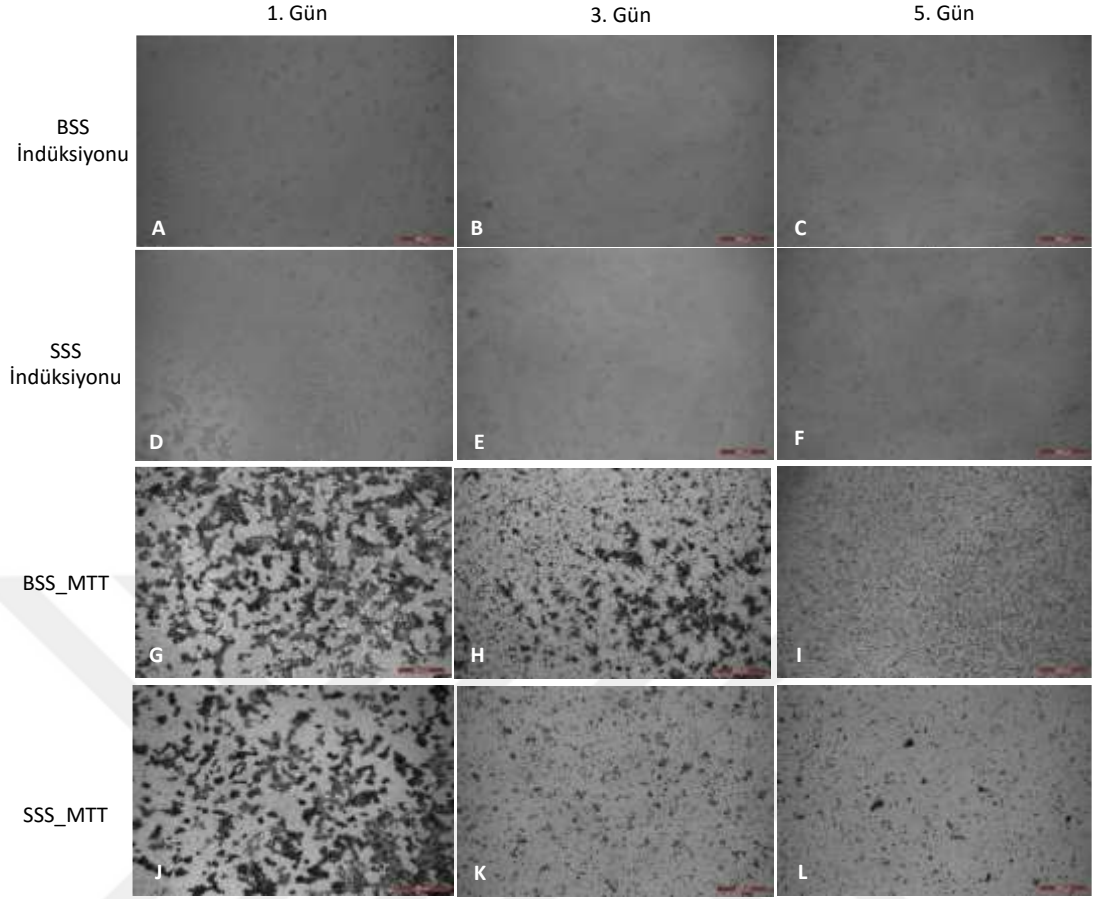
Lipojenik sarımsak ekstratlarının artan doz konsantrasyonlarına ve günlere daha fazla proliferatif etki gösterdiği belirlendi. Antikarsinojenik etkisi tespit edilmemesinin yanı sıra, baz yağı olarak kullanılan zeytin yapından daha fazla proliferatif etki gösterdiği belirlendi. Bu bakımdan zeytinyağındaki sarımsak ekstratlarının antikarsinojenik etkiden ziyade anti-yaşlanma etkisi ile yara iyileşimi teşvik edici ajan kullanılabileceği görüldü.

Etanol içinde maserasyon ile soğuk ekstraksiyon yöntemi sonucu elde edilen ekstratların sıcak ekstraksiyona benzer sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Artan indüksiyon günleri ve konsantrasyonlarına göre antiproliferatif yani antikarsinojenik etkilerinin arttığı belirlendi.

Uçucu yağ ekstraktından elde edilen sitotoksik etkinin ise kontrol olarak antikarsinojenik etkinliği bilinen cisplatından daha iyi olduğu görüldü. 5 ppt doz için MTT sonucu formazanların oluşumu Şekil 5.3 ve Şekil 5.4'te verildi.

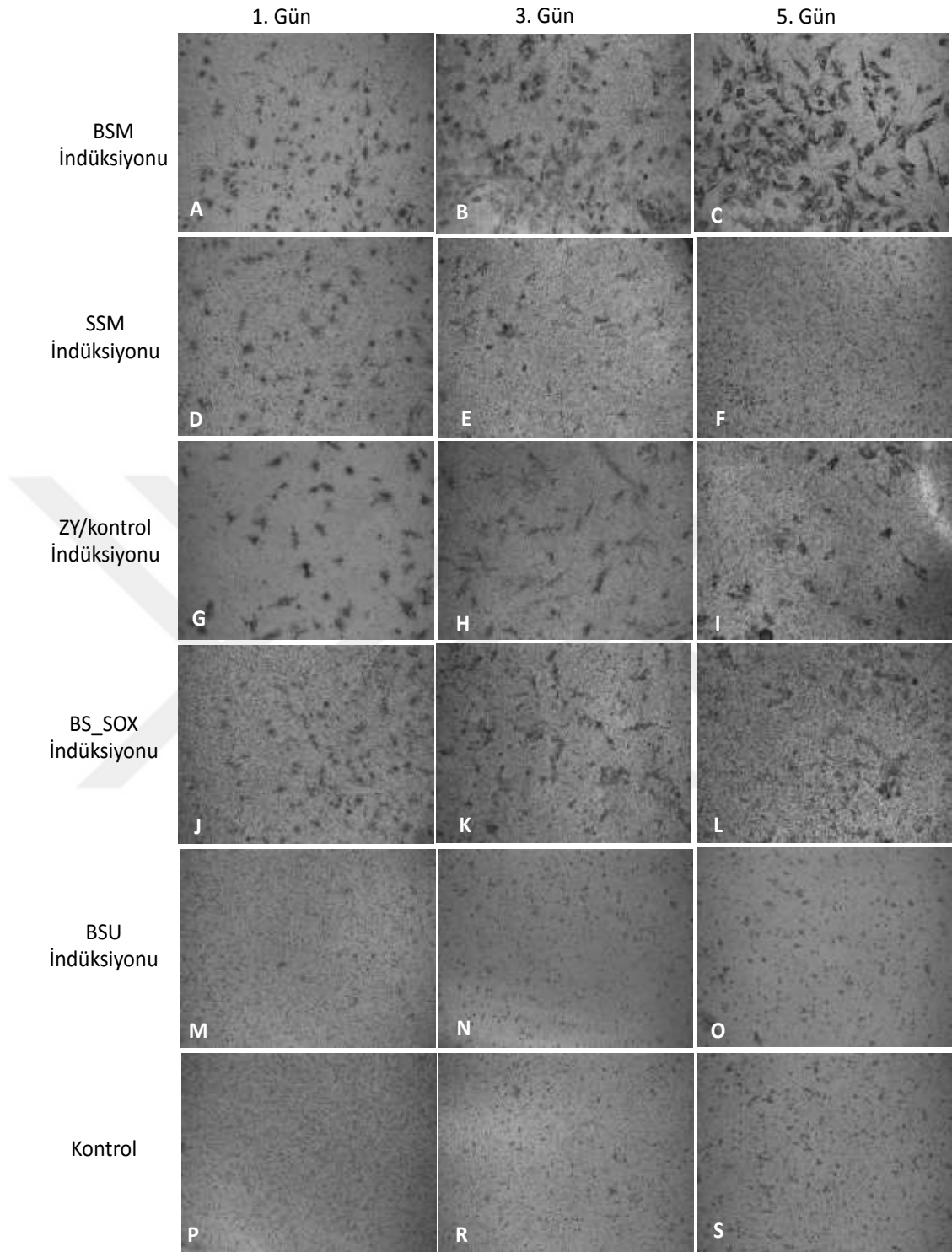


Şekil 5.3 Sarımsak reaktifleri HCT 116 hücrelerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu 5 ppt doz için: BSM (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSM (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün), ZY/kontrol (G: 1. gün, H:3. gün I:5.gün), BS_SOX (J: 1. gün, K:3. gün L:5.gün), BSU (M: 1. gün, N:3. gün O:5.gün) ve pozitif kontrol Cisplatin (P: 1. gün, R:3. gün S:5.gün).)Görüntüler Leica invert faz-kontrast mikroskobu görünür alan ışık mikroskobisi kamera sistemi ile elde edildi.)

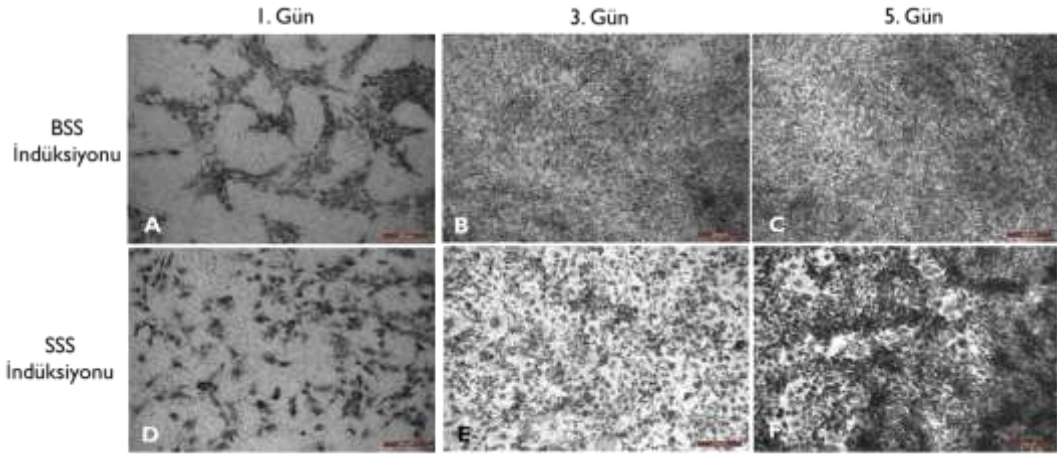


Şekil 5.4 Sarımsak reaktifleri HCT 116 hücrelerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, 60 ppt doz için indüksiyon öncesi: BSS (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSS (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün), ve MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu BSS (G: 1. gün, H:3. gün I:5.gün), SSS (J: 1. gün, K:3. gün L:5.gün). (Görüntüler Leica invert faz-kontrast mikroskobu floresans kamera sistemi ile elde edildi.)

kiMKH'leri üzerine farklı yöntemlerle hazırlanmış olan sarımsak reaktifleri eklenerek 5 gün süreyle inkübe edildi. 1, 3 ve 5inci günlerde yapılan MTT analizleri sonucunda formazan kristallerinin oluşma yoğunluğu hücre canlılığı ile korale edildi. Sarımsak reaktiflerinin ve zeytinyağının genel olarak hücre canlılığını ve dolayısıyla proliferasyonunu aktive ettiği görüldü. 5 ppt doz için MTT sonucu formazanların oluşumu Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'da verildi.



Şekil 5.5 Sarımsak reaktifleri kiMKH'lerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu 5 ppt doz için: BSM (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSM (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün), ZY/kontrol (G: 1. gün, H:3. gün I:5.gün), BS_SOX (J: 1. gün, K:3. gün L:5.gün), BSU (M: 1. gün, N:3. gün O:5.gün) ve pozitif kontrol Cisplatin (P: 1. gün, R:3. gün S:5.gün)



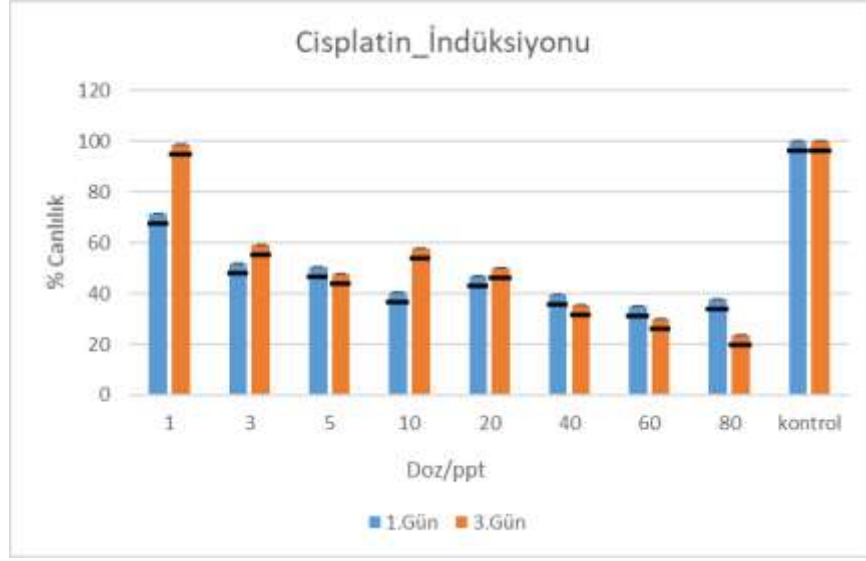
Şekil 5.6 Soğuk ekstraksiyon ile hazırlanmış BSS ve SSS reaktifleri kiMKH'lerine 5 gün süreyle uygulanmış olup, MTT zaman noktalarındaki formazan kristallerinin oluşumu 5 ppt doz için: BSS (A: 1. gün, B:3. gün C:5.gün), SSS (D: 1. gün, E:3. gün F:5.gün),

5.5.2 MTT ve İstatistiksel Analizi

Hücre kültüründe sarımsak reaktifleri ile indüksiyon altında bulunan HCT116 ve kiMKH hücre dizilerinin MTT reaktifi ile etkileştirilmesi sonucu oluşan formazan kristalleri MTT-çözücüsü ile çözüldü. Akabinde, mikro plaka okuyucu ile spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Kontrol olarak herhangi bir indüksiyon uygulanmamış örneklerin absorbans değerlerine karşılık, canlılık değeri 100 kabul edilerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.5.2.1 Cisplatin kontrol analizi

Şekil 5.7'ye göre, Cisplatinin bilindiği üzere kanser hücrelerinin proliferasyon oranını düşürdüğü net bir şekilde gözlemlenmiştir. Bu proliferasyon oranındaki azalma kemoterapi ile ilgili daha önceki birçok çalışma ile tutarlıdır. IC50 değerine 24 saatin sonunda 10 ppt doz ile ulaşılmasına karşın devam eden 3. günde 5 ppt doz uygulaması ile de IC50 değerine ve daha alt değerlere ulaşıldı. 5. gün ölçümlerinde sonuçlar sıfır civarında olduğundan data verilmedi. Ayrıca, 1 ppt, 3 ppt, 10 ppt ve 20 ppt dozlarında üçüncü günde hücre proliferasyonunun kontrol grubundan düşük kalmakla birlikte, birinci güne oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Buna karşın, 5ppt ile 40-80 ppt doz aralığında IC50 değerine ulaşıldı ve istikrarlı olarak ilk güne göre daha etkili sonuç verdiği tespit edildi.



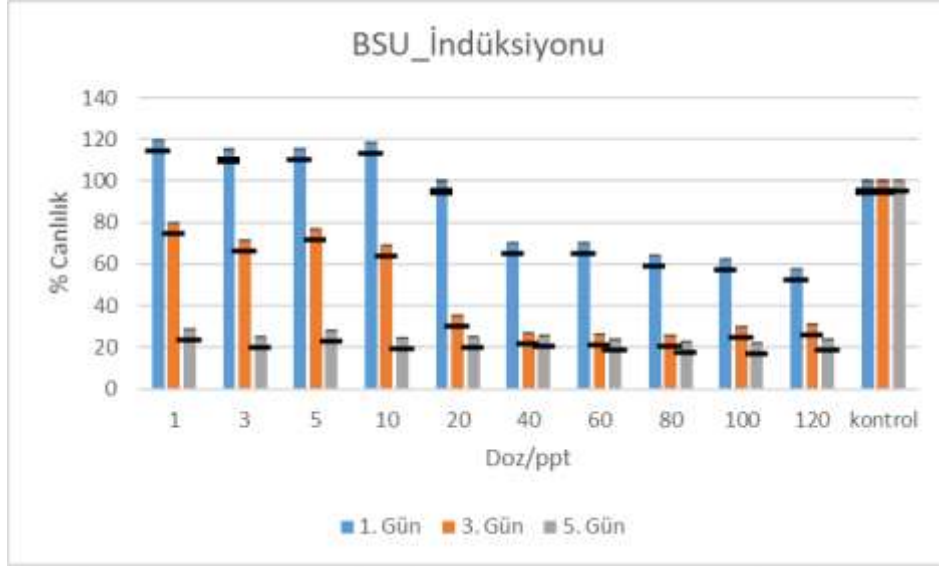
Şekil 5.7 Cisplatin uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.

5.5.2.2 HCT116 hücrelerinin istatistiksel MTT analizi

5.5.2.2.1 Sarımsak uçucu yağ indüksiyonu

Şekil 5.8, ham sarımsaktan elde edilen uçucu yağın (BSU), HCT116 hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi. İlk günün sonunda 1-20 ppt doz aralığında proliferasyon hızının kontrol gruplarından yüksek olduğu, 20 ppt doz uygulamasında kontrol grubuna eşdeğer hücre canlılığı sağladığı, 40-120 ppt'lik doz aralığında ise hücre canlılığının artan doz konsantrasyonu ile korale olarak azaldığı görüldü. Üçüncü gün MTT analizinde, kullanılan tüm dozlarda BSU'nun kanser hücrelerinin sağkalımını azalttığı, özellikle 20 ppt'den 120 ppt'lik doz aralığında sitotoksik etkisinin büyük ölçüde arttığı tespit edildi. Beşinci gün MTT sonuçlarında ise tüm doz konsantrasyonlarının yaklaşık aynı sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi.

Yapılan değerlendirmede, kısa sürede etkili bir çözüm için BSU için IC50 değeri 15-20 ppt olarak bulundu. Ancak, antikarsinojenik ilaçlar için daha küçük dozlarda etki göstermesi olası yan etkileri için tercih edilmektedir. Bu bakımdan 5 günlük sonuçlar dikkate alındığından BSU için IC50 değeri olarak 1 ppt konsantrasyonun uygun olacağı önerilmektedir.



Şekil 5.8 SU uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.

5.5.2.2 Sarımsak sıcak ekstrakt indüksiyonu

Şekil 5.9'de sıcak yöntemle hazırlanana sulu sarımsak ekstraktı BS_SOX için öncelikle ilk on doz çalışıldı. Analiz sonuçlarına göre BS_SOX'un 10-120 ppt doz aralığında kullanıldığında sitotoksik etki göstererek hücre canlılığını azalttığı görüldü. Ancak, her ne kadar 60 ppt konsantrasyonda IC50 değerine yaklaşılmış olsa da doz stabilitesinin etkinliğinin gösterilmesi için ek konsantrasyonlar çalışıldı.

Bu nedenle 150, 175 ve 200 ppt olmak üzere deney planına eklenen 3 konsantrasyonun daha sitotoksik etkisi test edildi. 40 ppt dozdan başlayarak birinci günden itibaren hücre sağ kalımının kontrol grubunun altında kaldığı, 175 ppt konsantrasyonun ilk günde IC50 değerine ulaştığı, 200 ppt en yüksek konsantrasyonun ise en sitotoksik etkiyi gösterdiği bulundu. Ancak ilerleyen deney günleri de dikkate alındığında BS_SOX için IC50 değeri 60 ppt olarak belirlendi ve bu etkinin artan doz konsantrasyonları ile fazlaca değişmediği bulundu.



Şekil 5.9 BS_SOX uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.

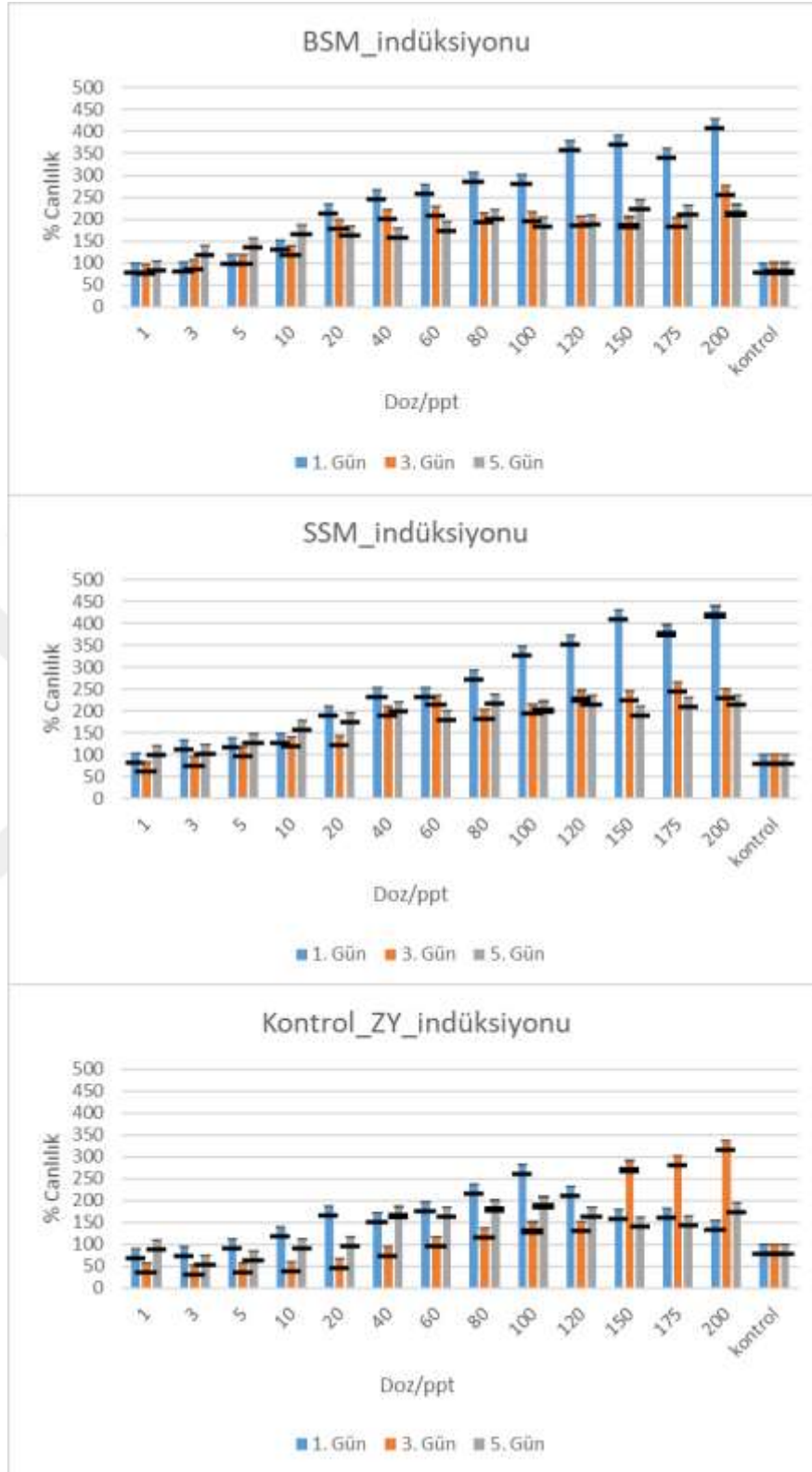
5.5.2.2.3 Maserat sarımsak yağları ve zeytinyağı kontrol indüksiyonu

Şekil 5.10'da zeytinyağının kanser hücreleri üzerindeki etkisini göstermektedir. Grafikte belirtilen değerler, zeytinyağının sitotoksik etkiden ziyade proliferatif etkisi olduğu ve konsantrasyonu arttıkça hücrelerin proliferasyonunu artırmada etkili olduğu görüldü. Ancak bu etkinin doğrusal olmadığı ve gün ile uygulanma doz konsantrasyonuna göre değiştiği belirlendi. Birinci günün sonunda 100 ppt konsantrasyonda, hücre canlılığında pik yaptığı sonra artan konsantrasyona nazaran canlılıkta azalma olduğu görüldü. Benzer şekilde farklılıklar farklı deney günlerinde tespit edilmekle birlikte birinci ve beşinci günlerde grafiğin benzer şekilde değişim gösterdiği bulundu.

Şekil 5.10'da, beyaz sarımsak maserat yağının (BSM), kanser hücreleri üzerindeki etkisini açıklamaktadır. BSM'nin kanser hücrelerine karşı özellikle birinci günde proliferatif etki gösterdiği belirlendi. Bu etki artan doz konsantrasyonu ile de genel olarak artış gösterdi. Ancak, bu proliferatif etkinin üçüncü ve beşinci günlerde azaldığı görülmekle birlikte, yine de hücre canlılığını kontrol grubuna göre daha fazla aktive ettiği tespit edildi. IC50 değeri BSM için tespit edilememiş olup, üçüncü günde en düşük proliferatif etki ile beşinci günde en düşük proliferatif etkinin 1 ppt konsantrasyonla elde edildi.

Siyah sarımsak maserat yağı SSM'nin, BSM ile benzer sonuçlar verdiği görüldü (Şekil 5.10). Ancak, ilk ilk on dozdan sonra ilave olarak yapılan 150-200 ppt konsantrasyonlarda SSM'nin BSM'ye kıyasla beşinci günde daha fazla sitotoksik etki gösterdiği fakat IC50 değerine ulaşılmadığı belirlendi.

Maserasyon ile zeytinyağı kullanılarak hazırlanan sarımsak ekstraktlarının özellikle yüksek dozlarda kullanımın beklenen sitotoksik etkiyi göstermediği, aksine hücre canlılığına pozitif yönde etkidiği tespit edildi. Bu bakımdan sarımsak maserat yağlarının, her ne kadar düşük dozları kısmen sitotoksik etki göstermiş olsa da antikarsinojenik ajan olarak kullanılamayacağı belirlendi.



Şekil 5.10 BSM, SSM ve ZY uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.

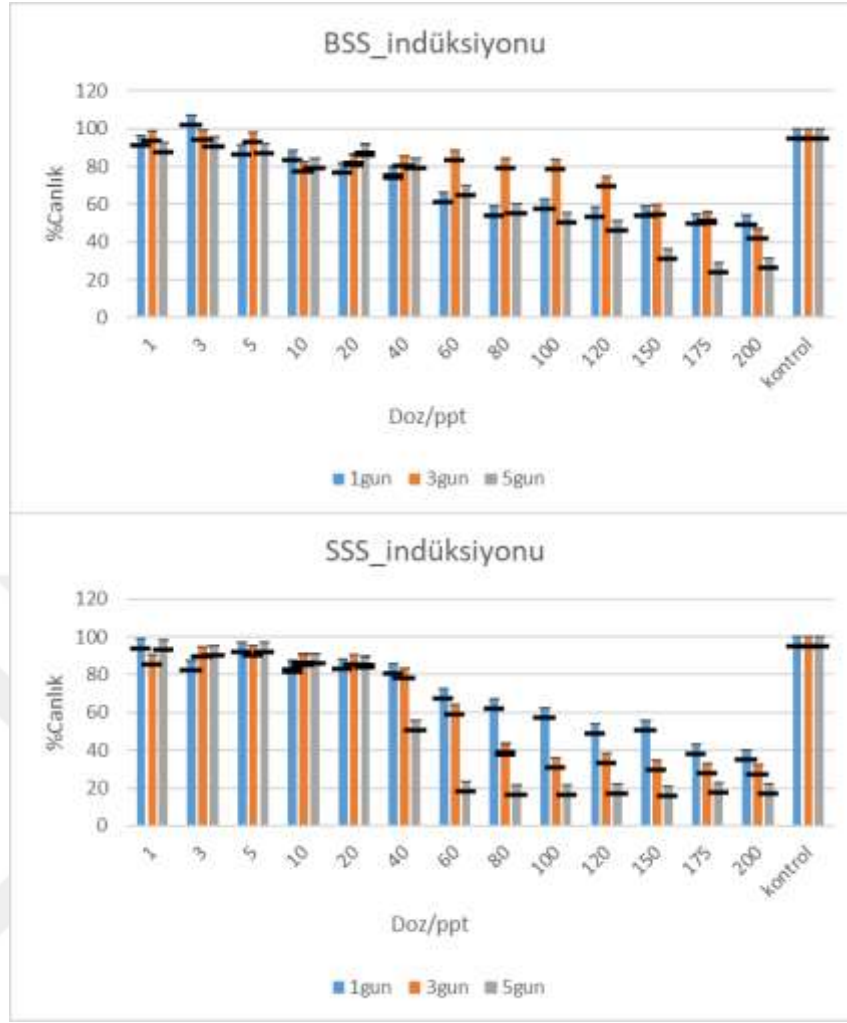
5.5.2.2.4 Sarımsak soğuk ekstraktlarının indüksiyonu

Şekil 5.11'te, oda sıcaklığında beyaz ve siyah sarımsak için gerçekleştirilen 1/1 etanol/su çözücü sistemi ile yapılan ve en son sulu olarak elde edilen sarımsak ekstraktı Beyaz sarımsak soğuk ekstraktı (BSS) ve Siyah sarımsak soğuk ekstraktı (SSS) için MTT analiz sonuçlarının hücre sağ kalımını gösteren canlılık grafiği verildi (Şekil 5.11).

Analiz sonuçlarına göre BSS ve SSS'nin düşük doz konsantrasyonunda benzer etkiyi gösterdiği belirlendi. Genel olarak, uygulanan tüm dozlarda hücre sağ kalımının kontrol gruplarından daha az olduğu görüldü. BSS indüksiyonunda artan doz konsantrasyonları ile korale sitotoksik etki tespit edilmekle birlikte, günlere göre incelendiğinde 3. Günde hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinde azalma olduğu görüldü. Ancak, beşinci günde sitotoksik etkinin arttığı ve hücre sağ kalımında belirgin bir azalma olduğu tespit edildi. BSS için IC50 değeri için en uygun doz konsantrasyonu 120 ppt olarak belirlendi.

SSS indüksiyonunda da benzer şekilde artan doz konsantrasyonları ile korale olarak sitotoksik etkide artış tespit edildi. Ancak, BSS indüksiyonun üçüncü günde gözlemlenen sapma SSS için gözlemlenmedi. Aksine, sitotoksik etkinin hem gün hem artan konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği ve hücre sağ kalımını önemli oranda azalttığı görüldü. Beşinci günde 40 ppt konsantrasyonda IC50 değerine ulaşıldı. Bununla birlikte, üçüncü günde 70 ppt civarında IC50 değerine ulaşıldığı belirlendi. Beşinci gün analizlerinde 60 ppt'den itibaren hücre canlılığının %20'nin altına düştüğü belirlendi.

Yapılan MTT analizi sonuçlarına göre, soğuk ekstraksiyon yöntemine göre hazırlanan sarımsak reaktiflerin sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında HCT116 hücreleri için en uygun antikarsinogenik etkinin siyah sarımsak reaktifi ile elde edildiği bulundu.



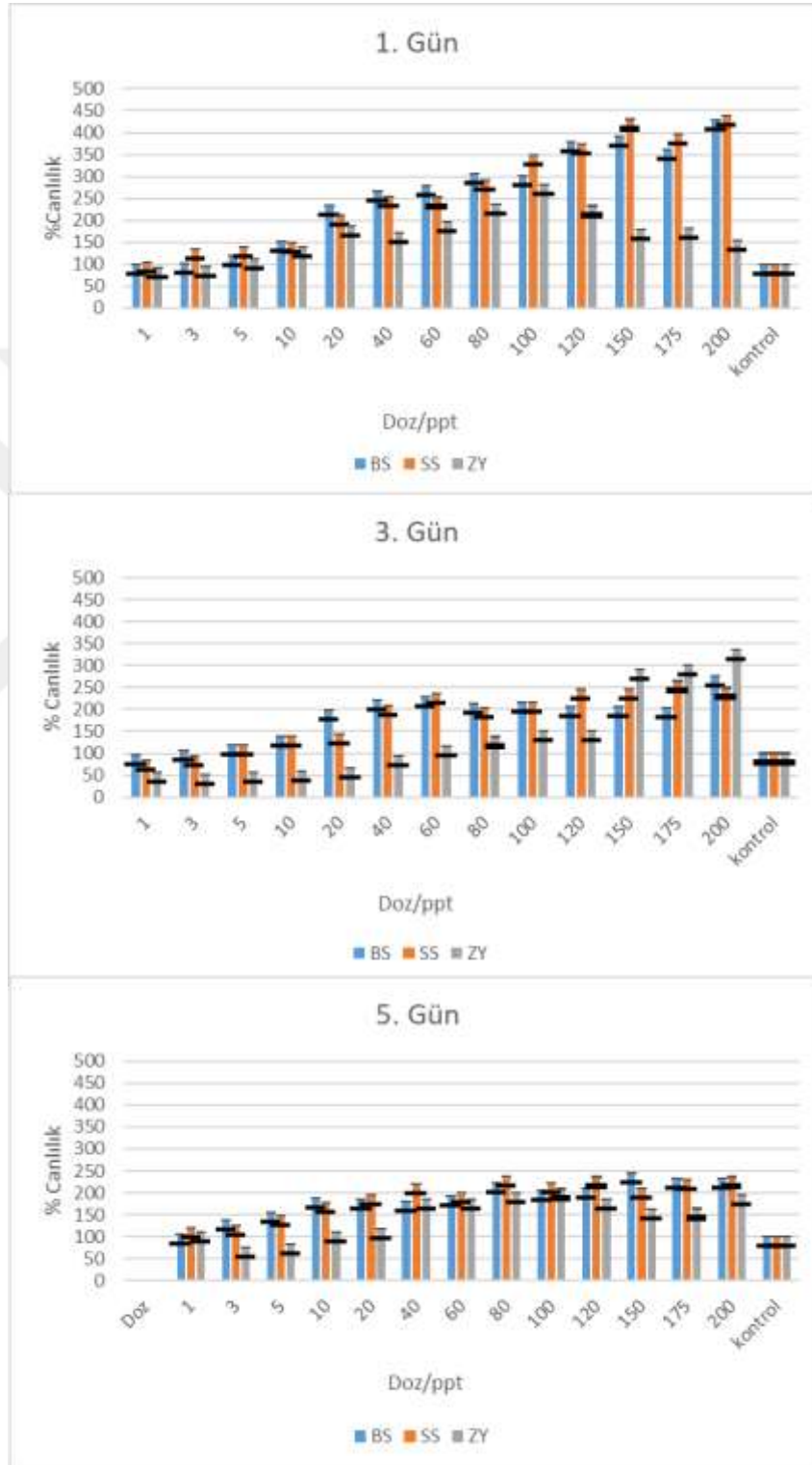
Şekil 5.11 BSS ve SSS uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin doz konsantrasyonlarına karşı grafiği.

5.5.2.2.5 Maserat yağlarının karşılaştırılması

BSM, SSM ve ZY indüksiyonu uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analiz sonuçları karşılaştırıldığında, birinci gün sonunda BSM ve SSM dozlarındaki etkinin benzer olduğunu görüldü. Ancak, zeytinyağında artan doz konsantrasyonu ile hücrelerin canlılığı üzerine etkisinin düştüğü gözlemlendi.

Üçüncü günde ise, şekil 5.12'de verildiği üzere BSM ve SSM arasındaki etki neredeyse aynıdır. Ancak, zeytinyağın da artan dozlar ve beklenen süre hücre canlılığında artırıcı etki oluşturduğu görüldü. Üç numunenin beşinci gün üzerindeki etkisine bakıldığında, BSM ve SSM uygulamasında yer alan düşük konsantrasyondaki dozlarında etkili olduğu görülürken ancak zeytinyağında bulunan düşük

konsantrasyonlu reaktifler diğerlerine göre daha az etkilidir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda üç numune için de kanser hücreleri üzerindeki etkinin birbirine benzer olduğu görülmektedir.



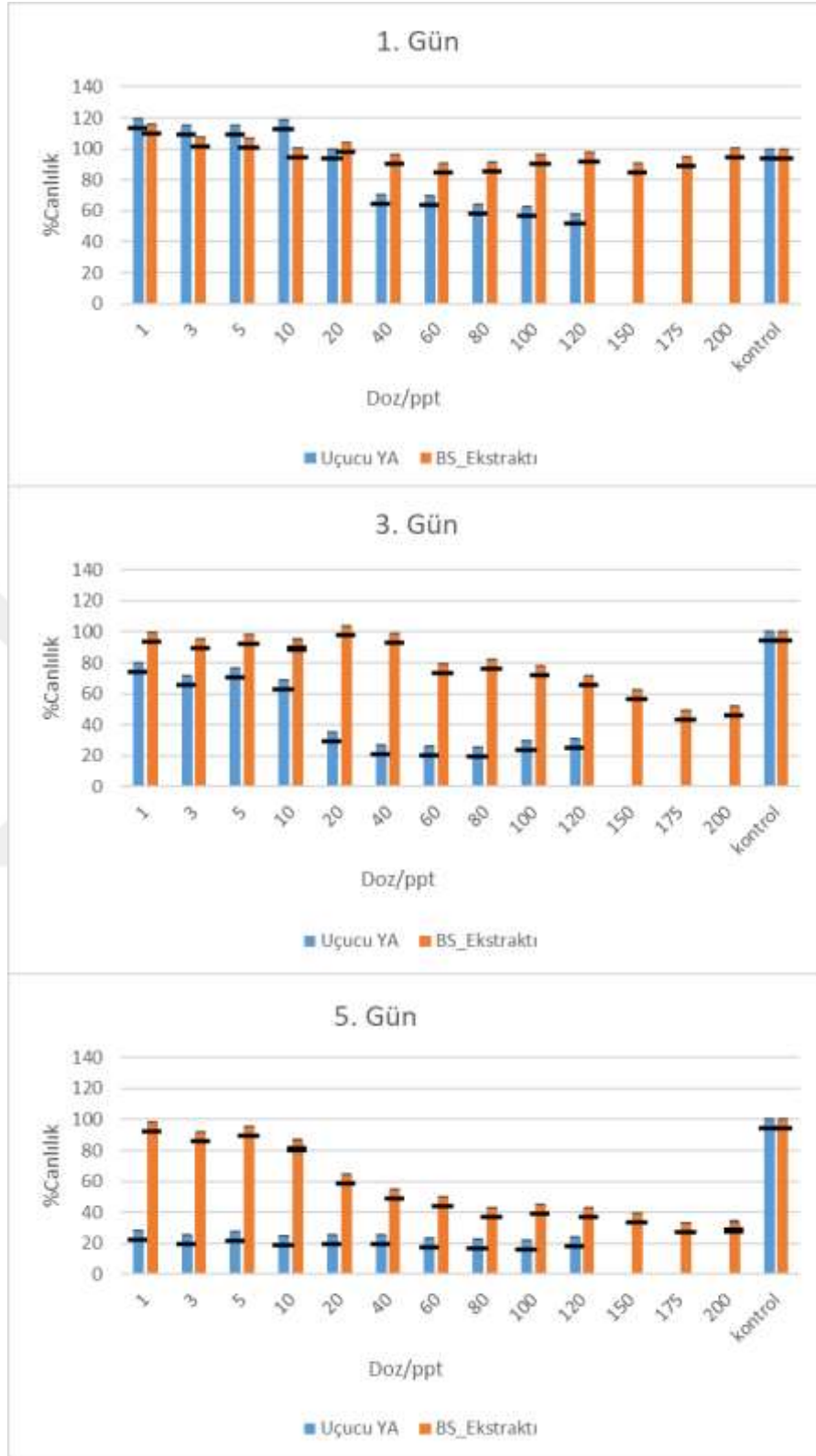
Şekil 5.12 BSM, SSM ve ZY uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin günlere göre karşılaştırılması.

5.5.2.2.6 Uçucu yağ ve beyaz sarımsak sıcak ekstraktının sitotoksik etkisinin karşılaştırılması

Şekil 5.13'de, BSU ve BS_SOX reaktiflerinin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi günlere göre karşılaştırmalı olarak incelendi. Yapılan denemelerde, sarımsağın uçucu yağ bileşenleri ile ısıtılıp hazırlanan beyaz sarımsak özütünün sitotoksik etkisinin en fazla olduğu tespit edildi. Uygulanan onüç doz arasında, BS_SOX ve BSU kullanımı kıyaslandığında, uçucu yağın etkisinin, özellikle 5 ppt dozundan sonra, hücrelerin büyümesini inhibe etmede çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Üçüncü günde, BSU ve BS_SOX arasındaki etki farkı için uçucu yağ için artan zamana ve artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Hücre büyümesini inhibe etmedeki en etkili konsantrasyonlar, uçucu yağın son dozuna kadar 20 ppt konsantrasyonlarıdır. Özütlerdeki en iyiler ise son üç konsantrasyon olduğu gösterilmiştir.

Şekil 5.13'deki grafik doğrultusunda beşinci ve son gün değerlendirildiğinde, BSU için kullanılan on dozun hepsinde de kanser hücrelerinin proliferasyonunu neredeyse tamamen inhibe ederek hücreleri apoptozise yönlendirdiği belirlendi. Buna karşılık, BS_SOX uygulanan hücrelerin proliferasyonundaki nispi düşüşün de dozlar arasında benzer olduğu gözlemlendi. Ayrıca son üç dozun hücre sağ kalımını azaltmada, gün farkı gözetmeden etkili olduğu tespit edildi.



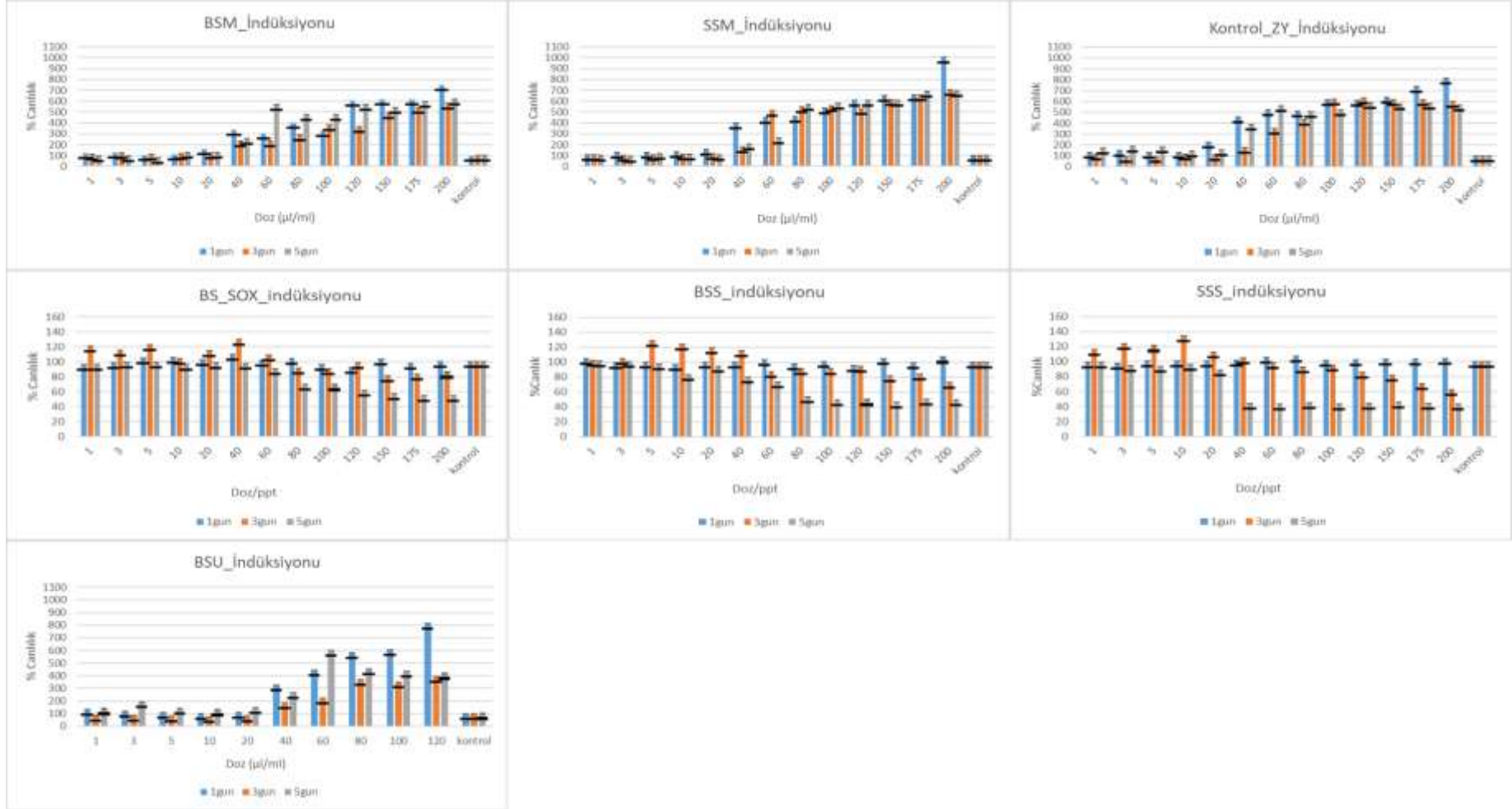
Şekil 5.13 BSU ve BS_SOX uygulanan HCT116 hücrelerinin MTT analizi sonucunda hücre sağ kalımını veren %canlılık değerinin günlere göre karşılaştırılması.

5.5.2.3 Mezankimal kök hücrelerin istatistiksel MTT analizi

Kök hücrelere zeytinyağı ve sarımsak ekstraktı ekledikten sonra, bu çözeltilerin sağlıklı hücreler üzerindeki sonuçları Şekil 5.14'teki gibi ortaya çıkmaktadır. Bu ekstraktların sağlıklı hücreler üzerinde olumsuz bir etkisi olmamakla birlikte bu ekstraktların yüksek dozları hücrelerin çoğalmasını arttırdığı tespit edildi.

A, B ve C grafiklerinde zeytinyağı, beyaz ve siyah sarımsak yağının yüksek dozlarının bu hücrelerin çoğalma oranında büyük artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle zeytinyağı, beyaz ve siyah sarımsak yağının yüksek dozlarının hücre çoğalmasını artırmada önemli etkileri olduğu söylenebilir.

D ve E grafiklerine bakılacak olursa, beyaz sarımsak ekstraktının bazı dozlar dışında etkisinin önceki üç grafiğe göre biraz daha az olduğunu gözlemlenmektedir. Uçucu Beyaz sarımsak yağının ise, 40 ppt'dan başlayan son dozlarının mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon oranını arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 5.14 Kontrol grubu olarak kullanılan kiMKH'lerine sarımsak reaktifleri uygulaması sonrası yapılan MTT analizi sonucu, hücrelerin sağ kalım ve/veya proliferasyon artışına olan etkisinin %canlılık olarak günlere göre dağılımı: A. Beyaz sarımsak masarat, B. siyah sarımsak masarat, C. kontrol zeytinyağı, D. Uçucu Beyaz sarımsak yağı, E. Beyaz sarımsak ekstraktı.

5.6 Ekstraktın İnsan Kolon Kanser Hücre Hattı Ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Üzerine Etkili Dozları Göstergesi

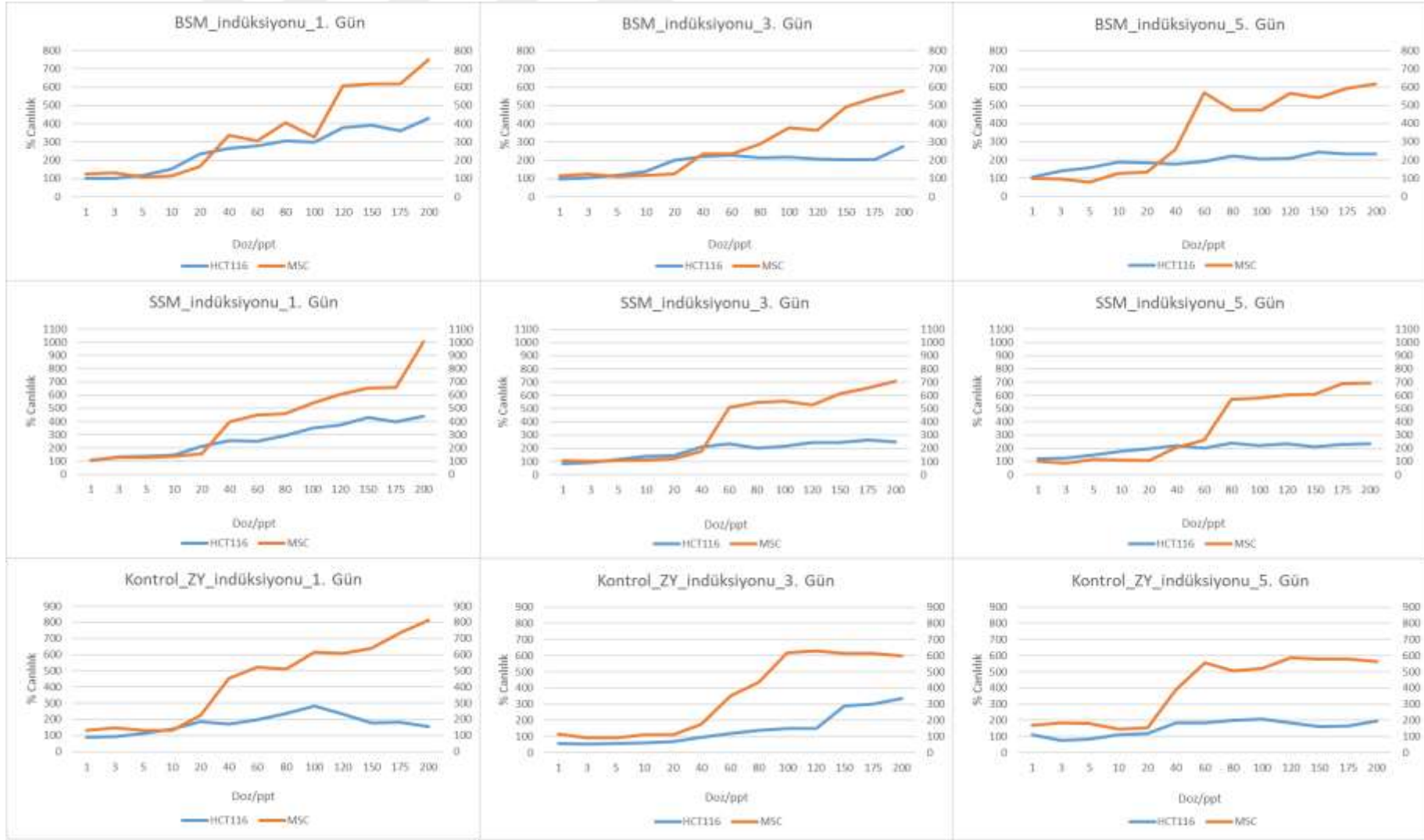
Beyaz sarımsak maserat ekstraktı insan kolon kanser hücre hattı ve mezenkimal kök hücre uygulandığında genellikle iki hücre grubunda da proliferasyonu arttırdığı gözlemlendi. Birinci gün, 120-150 ppt ortak etkili dozlardı. Ancak, beyaz sarımsak maserat ekstraktı üçüncü gün uygulamasında başka ortak etkili dozlar daha görüldü (Şekil 5.15). Beşinci gün, beyaz sarımsak maserat ekstraktı uygulandığında 5.15'te gösterdiği gibi ortak etkili dozlar belirlendi.

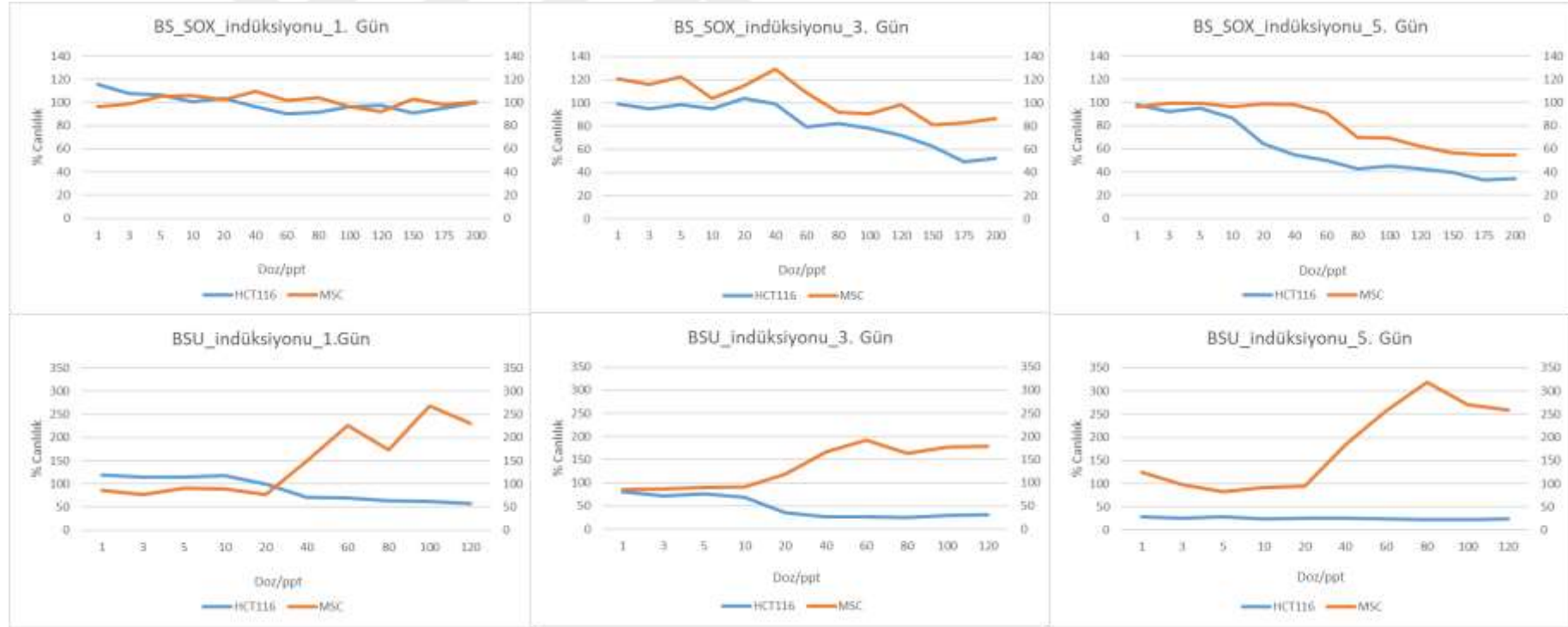
Siyah sarımsak maserat ekstraktı da aynı şekilde uygulandı ve şekil 5.15 gösterildiği gibi birinci gün uygulamada herhangi bir ortak etkili doz görünmedi. Bunun, insan kolon kanser hücreleri ve mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu sadece iki hücre grubunda armasından kaynaklı olabileceği düşünüldü. Ancak üçüncü gün 80-100 ppt ortak etkili dozlardı. Beşinci gün ise, birinci gün gibi herhangi bir ortak etkili doz gözlemlenmedi.

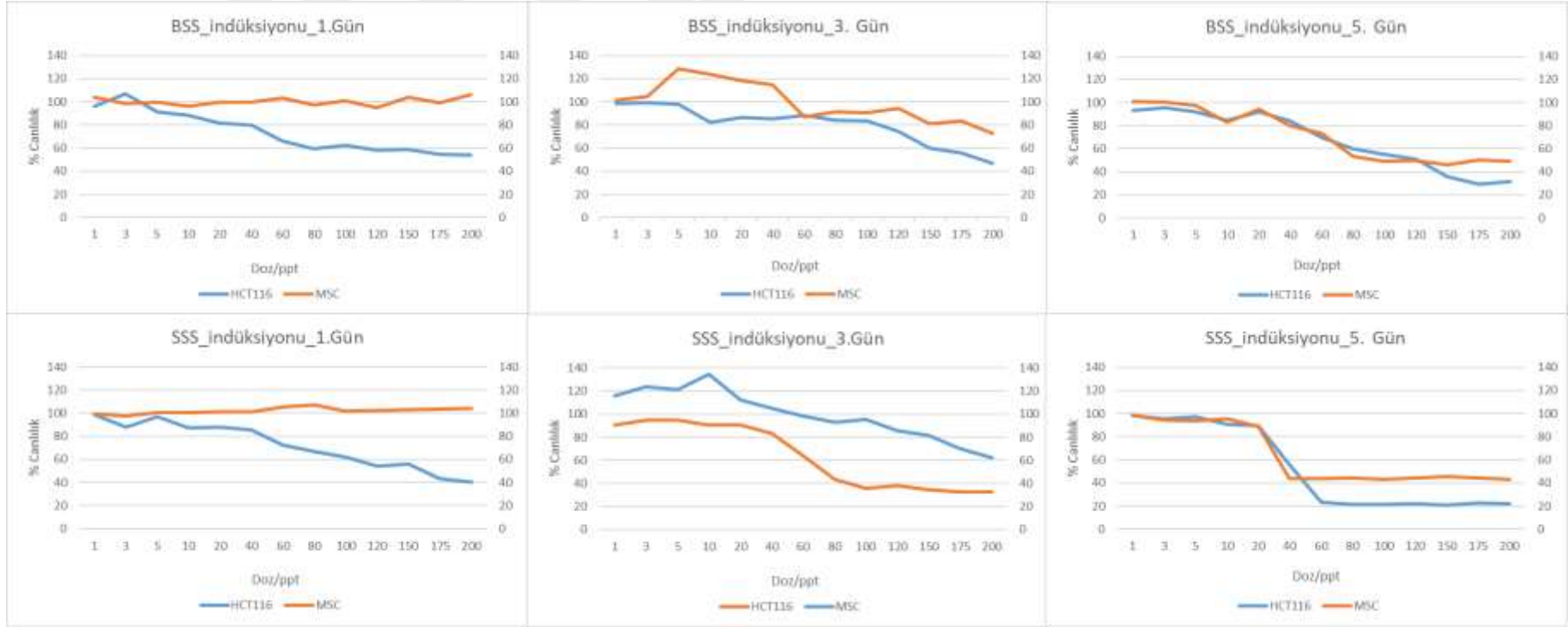
Zeytin yağı uygulandığında birinci günde 150 ppt doz grubunda etkili ortak dozdur. Üçüncü gün uygulanmada şekil 5.15'te gösterdiği gibi iki hücre grubunda ilk dozlarda hücre canlılığı artmadığı için paralel olarak aynı etkili noktada kaldılar. Ancak beşinci gün zeytin yağı uygulandığında 3 ortak etkili doz 40-60 ppt, 100-120 ppt ve 200 ppt doz grubunda şekil 5.15 gösterdiği gibi ortak etkili dozlardı.

Beyaz sarımsak sohxlet ekstraktı birinci gün uygulandığında kolon kanser hücre hattı ve mezenkimal kök hücrelerde birkaç ortak etkili doz bulundu. Bu dozlar ise 3 ppt, 10 ppt ve 40 ppt'dir. Üçüncü güne gelindiğinde 100 ppt ortak etkili doz bulundu ama beşinci günde 20 ppt ortak etkili doz göstermektedir.

Uçucu yağı insan kolon kanser hücre hattı ve mezenkimal kök hücrelere uygulandığında birinci günde 40 ppt ortak dozu olarak göstermektedir. Üçüncü gün uçucu yağı uygulandığında 10-20 ppt arasında etkili doz belirlenmiştir. Beşinci gün ise etkili doz 5 ppt belirlendi.







Şekil 5.15 Zeytinyağı, beyaz sarımsak maserat, siyah sarımsak maserat, sıcak ekstrakt , uçucu yağ ve soğuk ekstraktın insan kolon kanser hücre hattı ve mezenkimal kök hücrelerin üzerine etkili dozlarının karşılaştırmalı olarak göstergesi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek bir diyetle zeytinyağı alımı, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar, alzheimer, osteoporoz ve kanser insidansında azalma ile ilişkilidir. Deneysel ve klinik bulgulara göre zeytinyağının koruyucu bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ancak Storniolo ve arkadaşları oleik asit tüketiminin kolorektal kanseri indüklediğini söylemektedir. Zeytinyağını temsil eden küçük bileşenlerin varlığında oleik asit zıt etkilere sahiptir, bu da tohum yağlarının, yüksek oleik asitli tohum yağlarının veya zeytinyağının kolorektal kanser hücresi (KRK) üzerinde muhtemelen farklı etkileri olacağını düşündürmektedir (Storniolo vd., 2019). Literatürde bulunan prasad ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmaya göre, zeytin yağının içinde bulunan diğer bir bileşen kafeik asitin insan HT-1080 fibrosarkom hücre hattını üzerine yapmış olduğu etkiyi incelediklerinde, Kafeik asidin antiproliferatif etkisini; oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan durumundaki değişiklikler ve MTT testi ile belirlemişler. (Prasad vd., 2011). Prasad ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre, kafeik asidin HT-1080 hücre hattında güçlü antikanser etkisi sergilediği ve bir antikanser ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Oleocanthal ve ligstroside aglycone, zeytinyağından türetilmiş polifenollerdir. Oleocanthal, tümör büyümesine, tümörijenik olmayan birincil hücre hatlarında çok az sitotoksiste ile müdahale etmektedir. Ekstrede ligstrosit aglikonun varlığı ise, sitotoksiste için gereken oleokant konsantrasyonunu düşürmektedir. Bu sonuçlar, bir polifenol özütünün etkilerini TNFa tarafından güçlendirilebileceğini ve otofajinin modülasyonunun muhtemelen bu etkileri hesaba kattığını ilk kez göstermektedir. TNFa ilavesiyle böyle bir etkiyi geliştirme olasılığı da araştırılmış olmakla birlikte hücrelerin polifenolik ekstrakta maruz kalmasıyla hem hücre proliferasyonu hem de ölüm oranında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu tür bir etkinin otofajinin indüksiyonu ile ilişkilendirilerek TNFa ile güçlendirilebileceği düşünülmüştür. Ekstrede ligstrosit aglikonun varlığı, sitotoksiste için gereken oleokant konsantrasyonunu düşürmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda bir polifenol özütünün etkilerinin TNFa tarafından güçlendirilebileceğini ve otofajinin modülasyonunun

muhtemelen bu etkileri ile hesaba kattığını ilk kez göstermektedir (De Stefanis vd., 2019).

Bu tez çalışmasında ise sızma zeytinyağı ticari olarak satın alınarak kullanıldı. Bu yağın küçük ve orta konsantrasyon dozlarında büyük bir etki yapmadığını gözlemlendi. Ancak yüksek dozlarda özellikle üçüncü güne bakarsak kanser hücrelerin proliferasyonu arttığını gözlemlendi. Bu artışın sebebi olarak literatür bilgi dikkate alındığında ticari zeytinyağının oleik asitin yüksek miktarı olduğu düşünülmektedir.

Son zamanlarda, sarımsak ve sarımsak bazlı özlerin kullanımı, epidemiyolojik çalışmalarda kanser oranı azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Literatürde sarımsak ekstraktı elde etmek için farklı yöntemler mevcuttur. Bu tez çalışmasında sarımsak karışımı elde etmek için farklı yöntemler kullanıldı ve bunlar (Siyah sarımsak ve beyaz sarımsak meserat yöntemi) her biri zeytinyağının varlığında farklı sonuçlar verdi. Beyaz ve siyah sarımsak birbirlerine göre hücre proliferasyonun etkileri açısından anlamlı bir fark göstermedi ve doz miktarı arttıkça hücre proliferasyonu arttığı tespit edildi. Sarımsak ekstraktları zeytinyağıyla hazırlandığı için oleik asitin kanser hücre proliferasyonunu arttırdığı ve kanser hücrelerini besleyici özellik gösterdiği düşünülmektedir. Bu konu ile ilişkili literatürde benzer çalışmalar bulunmamaktadır. Kullandığımız ticari zeytinyağının da zıt etkileri olabilir ve bunu incelemek için başka bir çalışmada ticari olmayan özel üretim zeytinyağı kullanımı önerilmektedir.

Literatürde bulunan eski bir çalışmada mısır yağı ve sarımsak karışımının, insan kolon tümör hücre hattından kaynaklanan ksenograftlara karşı etkili bir antitümörijenik ajan olduğu tespit edilmiştir (Sundaram vd., 1996). Literatürde yapılan bir diğer çalışmaya göre, yaşlandırılmış siyah sarımsak ekstraktlarının (ABGE) *in vitro* ve *in vivo* mide kanseri üzerindeki etkileri incelendiğinde, *in vitro* çalışmalarda ABGE ile tedavi edilen hücrelerde doza bağlı apoptoz saptanmıştır. Tümör taşıyan farelerde, aşılınmış tümörlerin büyümesinin engellenmesi gibi ABGE'nin önemli antitümör etkileri gözlenmiştir (wang vd., 2012). Yağda çözünen bileşikler: Dialil sülfid (DAS), dialil disülfid (DADS), dialil trisülfid (DATS) ve ajoen, kanseri önlemek veya tedavi etmek için kullanıldıklarında suda çözünen bileşiklerden daha etkilidir. DADS ve DATS,

sarımsı bir tonu olan ve suda çözünmeyen sarımsak yağının ana bileşenleridir (Wang vd., 2013).

Arunkumar ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise sarımsağın yağda çözünen organosülfür bileşiği olan dialil disülfürün (DADS), *in vitro* prostat kanseri hücrelerinde antiproliferatif ve hücre döngüsü durdurmasının indüksiyonu için çalışılmıştır. Hücre büyümesinin baskılanması MTT deneyiyle değerlendirilmiştir. Arunkumar ve arkadaşları, DADS'nin prostat kanseri hücrelerinin büyümesini, kontrole kıyasla doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir (Arunkumar vd., 2006). Wu ve arkadaşları *in vivo* çalışmasında ise sarımsağın başlıca organosülfür bileşikleri (OSB) olan dialil sülfür (DAS), dialil disülfür (DADS) ve dialil trisülfür (DATS), deneysel materyal olarak, hücre canlılığı ve hücre döngüsü üzerindeki modülasyon etkilerini araştırmak için kullanmıştır. İnsan karaciğer tümör hücreleri (J5), hücre canlılığı testinin sonuçlara göre 50 veya 100 μ M DATS, kontrol ile karşılaştığında doz ve zamana bağlı ilişkilerde hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır ($P < 0,05$). 24 saat boyunca 100 μ M DATS ile muameleden sonra hücre sayısı kaybı, şekil deformasyonu ve lizis olayları gözlemlenmiştir (Wu vd., 2004).

Choromanska ve arkadaşları, sarımsak yağının çeşitli farklılaşma derecelerine sahip gliomalara karşı olumlu anti-kanser potansiyeli sergilediğini göstermiştir (Choromanska vd., 2020). Hosono ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise hücrelerin büyümesi, dialil trisülfid (DATS, HCT-15 IC₅₀ = 11,5 mikrom, DLD-1 IC₅₀ = 13,3 mikrom) tarafından önemli ölçüde bastırılmış iken dialil monosülfid ve dialil disülfidin böyle bir etki göstermediği tespit edilmiştir. DATS, bir *in vitro* hücresiz sistemde tübülün polimerizasyonunu inhibe etmiştir. DATS, hücrelerin mikrotübül ağı oluşumunu bozduğu ve mikrotübül fragmanlarının, ara fazda görüldüğü tespit edilmiştir. DATS ile muamele edilmiş tübülün için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi analizi ile peptit kütle haritalaması, 72,1 Da'lık bir peptit kütle artışı ile S-alil merkaptosistein oluşturmak için sistein kalıntıları Cys-12beta ve Cys-354beta'da spesifik bir oksidatif modifikasyon olduğunu göstermiştir. DATS'nin güçlü antitümör aktivitesi, HCT-15 ksenografları taşıyan farelerde de gösterilmiştir (Hosono vd., 2005). Alkenil sülfidlerin antikanser aktivitesi, öncelikle insan kolon kanseri hücreleri HCT-15 ve DLD-1 kullanılarak incelenmiştir. G2 / M fazında tutulan

hücrelerin sayısı, alt G1 DNA içeriğine sahip hücreler ve kaspaz-3 aktivitesine sahip hücreler, dialil trisülfür muamelesiyle arttırılmıştır (Seki vd., 2008).

Bu tez çalışmasında beyaz sarımsak Soxhlet ekstraksiyonu ve uçucu beyaz sarımsak yağı asitleri iki farklı yöntem ile hazırlanarak kullanıldı. Literatürde sarımsak ekstraktının insan tümör hücrelerinin proliferasyonuna etkilerini inceleyen bir çalışma mevcuttur (Siegers vd., 1999). 175 ve 200 ppt eşzamanlı olarak 1. gün, 3. gün ve 5. gün doz gruplarında en etkili sonuç ve kanser hücrelerin proliferasyonu azaltan doz grubudur. Literatürde kısmen benzer bir çalışma bulunmakla birlikte etanol esaslı sarımsak ekstraktının moleküler ve hücresel aktiviteleri incelenmiştir. Sarımsak ekstraktının *in vitro* birkaç farklı kanser hücrelerinin büyümesini ve aynı zamanda bir meme kanseri modelinde *in vivo* kanser büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Petrovic ve arkadaşlarının elde ettiği verilere göre sarımsak ekstraktı ile tedavi edilen kanser hücrelerinin, azalmış proliferasyonunun artan endoplazmik retikulum stresine aracılık ettiğini göstermektedir (Petrovic vd., 2018). Çiğ sarımsak ekstraksiyonu, *in vitro* olarak kültürlenmiş kanser hücrelerini öldürmede, diğer 21 çiğ sebze ve meyveden elde edilen ekstraktlara göre önemli ölçüde daha fazla etkili olmuştur. Hücre kültüründe çiğ sarımsak ekstraksiyonu, kökeni ve hücre tipine bakılmaksızın çok çeşitli farklı kanser hücrelerini öldürmektedir. Kanser hücrelerinin genel olarak, normal besinleri işlemek için normal hücre karşılıklarında bulunan birçok yaygın metabolik yolda kusurlu olduğu iyi bilinmektedir. Normalde, kullanımı normal olan bu besinlerin metabolizması kanser hücrelerinde durabilir ve sitotoksik hale gelebilir. Çiğ sarımsak ekstraksiyonu ile kanseri tedavi etmenin en etkili yolu, pişmiş sarımsağı yemek yerine doğrudan enjeksiyonu olabilir (Li vd., 2018). Bu tez çalışmasında uygulanan sarımsak kaynaklı uçucu yağ asitleri kanser hücrelerine 3. gündeki etkisi 20 ppt doz grubundan başladı ve doz arttıkça kanser hücre proliferasyonunun arttığı tespit edildi. Ancak 5. gün uygulandığında hemen hemen tüm dozlar etkili bir şekilde hücre proliferasyonu azalttı.

Sarımsaktan (*Allium sativum* L.) ekstrakte edilen bir kimyasal olan allisin, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte allisinin, özellikle hematopoietik sistemde kurşun kaynaklı toksisite üzerindeki biyolojik aktiviteleri belirsizliğini korumaktadır. Burada, kurşuna maruz kalmanın, HSC'lerde

bozulmuş hücre durgunluğu, engelli kendi kendini yenileme işlevi ve koloni oluşturma yeteneği ve miyeloid taraflı farklılaşma dahil yaşlanma fenotiplerini ortaya çıkardığı bulunmuş, bunların hepsi farelerde önemli hematopoietik bozukluklara nedeni olmuştur (Cai vd., 2019).

Literatürde bulunan diğer bir çalışmada ise insan mezenkimal kök hücrelerinin (hMKH) proliferasyonunu teşvik etmek için, bir antioksidan olarak bilinen ve sarımsak ekstraksiyonu ana bileşeni olan s-alil sisteinin (SAC) etkisi incelenmiştir. SAC'nin hidrojen peroksit kaynaklı hücre ölümünü ve hücrel apoptozu engellemiş olduğu ancak kısa süreli kültür sırasında hMSC'lerin büyümesini etki etmediği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına bakılarak, SAC'nin hMSC'lerin kendini yenileme kapasitesinin korunmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür. Birlikte ele alındığında, SAC, antioksidan enzimlerin düzenlenmesi yoluyla oksidatif stresle indüklenen hücre apoptozunun inhibisyonu yoluyla hMSC'lerin proliferasyonunu geliştirmektedir. Bu nedenle SAC'nin, insan MSC'lerinin kendini yenilemesini ve çok potansiyelli karakterizasyonunu sürdürmek için *in vitro* bir kültür sisteminde vazgeçilmez bir bileşen olabileceği düşünülmektedir (Park., 2009). Bu tez çalışmasında kanser hücrelerine uyguladığımız sarımsak ekstraktları mezenkimal kök hücrelere de uygulandı. Doz artışına bağlı olarak mezenkimal kök hücre proliferasyon oranında da artış gözlemlendi. Ancak uçucu yağ asitleri uygulandığında mezenkimal kök hücre proliferasyon oranı dozlar arası benzerlik gösterdi.

6.1 Öneriler

Yapılan tez kapsamında farklı yöntemlerle hazırlanan sarımsak ekstraktları test edildi. Bu yöntemlerle elde edilen doğal (beyaz) ve fermente (siyah) sarımsak ürünlerinin bir kısmı halk arasında da alternatif tıp uygulamaları olarak kullanılmakla birlikte, antikarsinojenik etkinliğini gösterir kliniğe yönelik net bilimsel veri bulunmamaktadır. Buna karşın sarımsak bileşenlerinin antikarsinojenik etkisine dair yapılan çalışmalar literatürde bulunmakla birlikte, alternatif tıpta kullanıldığı şekilde üretilen sarımsak reaktifleri ile ilgili veriler yetersizdir ve bu ürünler halk tarafından söylentilere dayalı bilgilere göre kullanılmaktadır. Bu bağlamda, yürütülen tez kapsamında, geleneksel yöntemlerle hazırlanan sarımsak ekstraktlarına ilave, yeni sarımsak ürünlerinin ve

ekstraktlarının üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sarımsak ürünlerinin HCT116 hücreleri üzerine antikarsinojenik etkisi karşılaştırılmalı olarak test edilmiş ve bu etkinin sağlıklı hücreler üzerindeki olumlu ve/veya olumsuz etkileri de kiMKH ile belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki zeytinyağı içerisinde maserasyon yöntemi ile hazırlanan tüm sarımsak ürünleri, hücrelerin proliferasyonunu artırmakta yani hücre canlılığını teşvik etmektedir. Bu bakımdan, sağlıklı insanlarda bu ekstrakt ürünlerinin kullanılmasının yaşlanma karşıtı ve yara iyileşmesini destekleyici olarak etki gösterebileceği düşünülmekte birlikte, elde edilen sonuçlara göre kanser hastalığının tedavisine olumsuz etki yapabileceği belirlenmiştir.

Beyaz sarımsak için aynı çözücü sistemi kullanılarak sıcak ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan ekstraktın soğuk ekstraksiyon yöntemine göre antikarsinojenik etkisinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna karşın kiMKH ile yapılan kontrol deneylerde sıcak yöntemle hazırlanan ekstraktların yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bakımdan, sıcak ekstraksiyon ürünlerinin hem kanser hastaları hem de sağlıklı bireyler tarafından dikkatli kullanılması ve aşırı tüketimden kaçınılması gerektiği önerilmektedir.

Elde edilen ürünlerin antikarsinojenik etkisinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi, plastisitesi yüksek olan kiMKH ile incelenmiş olup, sarımsak reaktiflerinin özellikle düşük dozlarda sağlıklı hücreler üzerine herhangi bir sitotoksik etkisi tespit edilmemiştir. Ancak, sağlıklı hücreler için de kontrolsüz hücre çoğalması vücutta istenen bir durum olmadığından, kullanılabilecek en uygun dozlar HCT116 hücreleri ile kiMKH için yapılan istatistiksel analiz grafiklerinin değerlendirilmesi ile bulunmuştur (Şekil 5.15). Bu karşılaştırmalı değerlendirmelerde genel olarak elde edilen IC50 değerlerine karşılık, kiMKH proliferasyonunun da kabul edilebilir sınırlarda olduğu değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında HCT116 hücreleri için sitotoksik etki gösteren sarımsak ürünlerinin antikarsinojenik etki göstermesinin yanında sağlıklı hücrelerin rejenerasyonu da uyardığı belirlenmiştir.

Beyaz sarımsaktan elde edilen uçucu yağın bileşimi literatür ile benzer olup (El-Sayed ve ark.,2017; Boubechiche ve ark., 2017) yürütülen çalışma kapsamında elde edilen uçucu yağ bileşiklerinden total diallil sülfidlerin oranı % 87,32 olup, verilen literatürdeki farklı alanlarda yetişen sarımsaklardan elde edilen uçucu yağdaki total diallil sülfidlerin oranlarından (% 61,17 ila 84,78) oldukça yüksektir. Ayrıca, Taşköprü sarımsağından elde edilen uçucu yağ bileşiklerinden total trisülfidlerin oranı (% 54,83), Boubechiche ve arkadaşlarının çalışmasındaki total trisülfidlerin oranlarından (% 35,4 ila 38,48) oldukça yüksek, El-Sayed ve arkadaşlarının çalışmasında bulunan total trisülfidlerin oranlarından (% 63,03 ila 70,03) ise düşük kalmıştır. Elde edilen bileşiklerden diallil disülfür organik bir disülfür olup, antineoplastik ajan, antihipertansif ajan, antifungal ajan ve bitki metaboliti olarak işlevi vardır. Diallil tetrasülfid ise zararlı bir organizmanın kimyasal veya biyolojik yollarla uzaklaştırılmasında, yok edilmesi veya kontrol edilmesinde rol almaktadır. Sarımsak uçucu yağının en temel bir bileşeni olan diallil trisülfid, geleneksel Çin tıbbi ürünü allitridium'un önemli bir içeriği olup antifungal, antitümör ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Etkileri arasında ayrıca apoptoz indükleyici, östrojen reseptör antagonisti, antineoplastik ajan, vazodilatör ajan, anti-enflamatuar ajan, insektisit, antiprotozoal ilaç, trombosit agregasyon inhibitörü ve antilipemik ilaç olarak kullanımı sayılabilir ve bu bakımdan çok önemli ve değerli bir bileşiktir.

Sarımsak ürünleri içerisinde uçucu sarımsak yağlarının en etkili antikarsinojik ajan olduğu tespit edilmiştir. Bu etkisinin, yukarıda belirtildiği gibi içeriğindeki sülfid bileşiklerinden özellikle de içeriğinde yüksek oranda bulunan diallil trisülfitten kaynakladığı düşünülmektedir. Düşük dozlardan itibaren antikarsinojik ajan olarak etki göstermesinin yanı sıra kiMKH'ler üzerinde de proliferatif etkisi net olarak görülmüştür. Karşılaştırmalı değerlendirmeler göz önüne alındığında, sarımsak uçucu yağlarının güvenli ve yüksek reaktiviteyle kolon kanserinin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Buna karşın, etanolde hazırlanan ve en son sulu olarka elde edilen sarımsak ekstraktlarının kolon kanserinin tedavisinde dikkatli kullanılması gerektiği, yüksek dozlarda her ne kadar yüksek antikarsinojik aktivite gösterse de ve sağlıklı hücreler üzerine olası zararının önüne geçmek için düşük dozlarda kullanılmasının gerektiği önerilmektedir.

Hücreler herhangi bir stresle karşılaştığında ya senesens fazına yada apoptozise girmektedir. Ancak, literatüre göre hücre popülasyonlarında ikisinin de aynı anda gerçekleşebildiği bilinmektedir. Farklı yöntemlerle elde edilen sarımsak ekstraktları ile muamele ettiğimiz kolorektal kanser hücrelerinde de benzer bir durumun yaşandığı düşünülmektedir. Kromatografik analizlerinin MTT analizleri ile birlikte irdelenmesi sonucu, sarımsağın bileşimindeki pozitif iyon türlerinin antikarsinojenik etkiyi artırdığı tahmin edilmektedir. Bu bileşenlerin, hücre döngüsüne ait yolaklar üzerine etkinin tespiti için moleküler düzeyde analizlerin yapılmasını içeren yeni çalışmalar planlanmaktadır. Ayrıca, bu ürünlerin modern farmakolojide ilaç olarak kullanılabilirliğinin tespiti için *in vivo* analizlerin gerçekleştirilmesi ve *in vitro* bulgular ile karşılaştırmalı etkisinin tespiti önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Arunkumar, A., Vijayababu, M. R., Srinivasan, N., Aruldas, M. M., & Arunakaran, J. (2006). Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Molecular and cellular biochemistry*, 288(1-2), 107-113.
- Balakin, V. (2011). U.S. Patent No. 7,939,809. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Banerjee, S. K., & Maulik, S. K. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition journal*, 1(1), 4.
- Barker, J. N., & Wagner, J. E. (2003). Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(7), 526-532.
- Borkowska A, Knap N, Antosiewicz J. 2013. Diallyl Trisulfide Is More Cytotoxic to Prostate Cancer Cells PC-3 than to Noncancerous Epithelial Cell Line PNT1A: A Possible Role of p66Shc signaling Axis. *Nutr Cancer*, 65: 711-717.
- Boubechiche, Z., Chihib, N. E., Jama, C., Hellal, A. (2017). Comparison of volatile compounds profile and antioxydant activity of *allium sativum* essential oils extracted using hydrodistillation, ultrasound-assisted and sono-hydrodistillation processes. *Indian J. Pharm. Educ. Res*, 51, S281-S285
- Brown, J.W. (2012). Lionfish: Kudzu of the Caribbean. *ALS* 398. 11p.
- Burke, B., Sumner, S., Maitland, N., & Lewis, C. E. (2002). Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *Journal of leukocyte biology*, 72(3), 417-428.
- Cai, S. Z., Zhao, L. N., Liu, J., Ji, Y. T., Shi, X. Y., Ma, Z. R., ... & Chen, Y. (2019). Allicin alleviates lead-induced hematopoietic stem cell aging by up-regulating PKM2. *Bioscience Reports*, 39(7).
- Choromanska, A., Kulbacka, J., Saczko, J., & Surowiak, P. (2020). Effect of diallyl disulfide and garlic oil on different human astrocytoma cell lines. *Biomedical Reports*, 13(4), 1-1.
- Dasari, S. and Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- De Stefanis, D., Scimè, S., Accomazzo, S., Catti, A., Occhipinti, A., Berteà, C. M. and Costelli, P. (2019). Anti-proliferative effects of an extra-virgin olive oil extract

enriched in ligstroside aglycone and oleocanthal on human liver cancer cell lines. *Cancers*, 11(11), 1640.

Derzko, C., Elliott, S., & Lam, W. (2007). Management of sexual dysfunction in postmenopausal breast cancer patients taking adjuvant aromatase inhibitor therapy. *Current oncology*, 14(Suppl 1), S20.

Disis, M. L. (2014, October). Mechanism of action of immunotherapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 41, pp. S3-S13). WB Saunders.

Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 66(6), 1192-1308.

Dong, M., Yang, G., Liu, H., Liu, X., Lin, S., Sun, D., & Wang, Y. (2014). Aged black garlic extract inhibits HT29 colon cancer cell growth via the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedical Reports*, 2(2), 250-254.

Dreicer, R., & Wilding, G. (1992). Steroid Hormone Agonists and Antagonists in the Treatment of Cancer: Series on growth factors. *Cancer investigation*, 10(1), 27-41.

El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., G Wasef, L., Elewa, CİSPLATİN. CİSPLATİN., A Al-Sagan, A., El-Hack, A., ... & Prasad Devkota, CİSPLATİN. (2020). Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. *Nutrients*, 12(3), 872.

El-Sayed, H. S., Chizzola, R., Ramadan, A. A., Edris, A. E. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*, 221, 196-204.

Fufa, B. K. (2019). Anti-bacterial and anti-fungal properties of garlic extract (*Allium sativum*): A review. *Microbiology Research Journal International*, 1-5.

Garcia, M; Jemal, A; Ward, EM; Center, MM; Hao, CİSPLATİN; Siegel, RL; Thun, MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007. American Cancer Society, Atlanta, GA 2007, pp 1-52.

Gebreyohannes, G., & Gebreyohannes, M. (2013). Medicinal values of garlic: A review. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 5(9), 401-408.

Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer

Goncagul, G., & Ayaz, E. (2010). Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*). *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 5(1), 91-93.

Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., & Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 282-286.

Hejmadi, M. (2014). *Introduction to cancer biology*. Bookboon.

Hollingsworth, R. E., & Jansen, K. (2019). Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ vaccines*, 4(1), 1-10.

Horowitz, M. M. (2009). Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. *Thomas' hematopoietic cell transplantation*, 1, 8-15.

Hosono, T., Fukao, T., Ogihara, J., Ito, CİSPLATİN., Shiba, CİSPLATİN., Seki, T., & Ariga, T. (2005). Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of β -tubulin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41487-41493.

Houshmand B, Mahjour F, Dianat O. 2013. Antibacterial effect of different concentrations of garlic (*Allium sativum*) extract on dental plaque bacteria. *Indian J Dent Res*, 24: 71.

URL-1: <https://bartonsgreenhouse.com/product/vinca-cora-series/> taken from internet website.

URL-2: <https://bbc.com/news/health-44348551> taken from internet website.

URL-3: <https://cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy/external-beam> taken from internet website.

URL-4: <https://genome.gov/genetics-glossary/Gene-Therapy> taken from internet website.

URL-5: <https://health.harvard.edu/heart-health/avoiding-atherosclerosis-the-killer-you-cant-see> taken from internet website.

URL-6: <https://healthbenefitstimes.com/boldo/> taken from internet website.

URL-7: <https://the-scientist.com/news-opinion/theres-a-troubling-rise-in-colorectal-cancer-among-young-adults--66354> taken from internet website.

URL-8: <https://en.wikipedia.org/wiki/Alkaloid> taken from internet website.

URL-9: <https://bioinformant.com/allogeneic-stem-cell-transplant/> taken from internet website.

URL-10: <https://www.gettyimages.com/detail/photo/close-up-of-purple-garlic-bunch-royalty-free-image/104822116> taken from internet website.

Jia, L. T., Chen, S. CISPLATIN., & Yang, A. G. (2012). Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7), 868-876.

Karuppiyah P and Rajaram S. 2012. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2: 597-601.

Khanum, F., Anilakumar, K. R., & Viswanathan, K. R. (2004). Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(6), 479-488.

Koehn, F. E. (Ed.). (2012). *Natural products and cancer drug discovery*. Springer Science & Business Media.

Kritchevsky, D. Diet and Cancer: what 's next? *J Nutr*, 2003 133, 3827–3829.

Kumar R, Chhatwal S, Arora S, Sharma S, Singh J, Singh N, Bhandari V, Khurana A. 2013. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, anti-inflammatory and adenosine deaminase– lowering effects of garlic in patients with type 2 diabetes mellitus with obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 6: 49-56.

Langdon, S. P. (2010). *Cancer cell culture*. Humana.

Li, W. R., Shi, Q. S., Dai, H. Q., Liang, Q., Xie, X. B., Huang, X. M., ... & Zhang, L. X. (2016). Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Scientific reports*, 6, 22805.

Li, Z., Le, W., & Cui, Z. (2018). A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion. *Cell death discovery*, 4(1), 1-10.

Lin JG, Chen GW, Su CC, Hung CF. 2002. Garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine Nacetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adducts in human promyelocytic leukemia cells. *Am J Chin Med*, 30: 315-325.

Louw, VJ; Louw, HM; Webb, MJ. Autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2009 361, 1118-1119.

Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., ... & Nabavi, S. M. (2016). Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 49-56.

- Mihlon IV, F., Ray Jr, C. E., & Messersmith, CİSPLATİN. (2010, December). Chemotherapy agents: a primer for the interventional radiologist. In *Seminars in interventional radiology* (Vol. 27, No. 4, p. 384). Thieme Medical Publishers.
- Murth, NS; Aleyamma, M. Cancer epidemiology, prevention and control. *Current Science*, 2004 86(4), 518-527.
- Oldham, R. K., & Dillman, R. O. (Eds.). (2009). *Principles of cancer biotherapy*. Springer Science & Business Media.
- Palani, S., Joseph, N. M., Tegene, CİSPLATİN., & Zacharia, A. (2014). Medicinal Properties of Garlic–A Concise Review. *Current Research in Pharmaceutical Sciences*, 92-98.
- Pardoll, D. M. (1993). Cancer vaccines. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14(5), 202-208.
- Park, C., Park, S., Chung, Y. H., Kim, G. Y., Choi, Y. W., Kim, B. W., & Choi, Y. H. (2014). Induction of apoptosis by a hexane extract of aged black garlic in the human leukemic U937 cells. *Nutrition Research and Practice*, 8(2), 132-137.
- Park, R. S. (2009). Effect of S-allyl cysteine (SAC) on the proliferation of umbilical cord blood (UCB)-derived mesenchymal stem cells (MSCs). *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 22(2), 313-319.
- Parkin, DM. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005 55:74-108.
- Petrovic, V., Nepal, A., Olaisen, C., Bachke, S., Hira, J., Søgaaard, C. K., ... & Bartsova, Z. (2018). Anti-cancer potential of homemade fresh garlic extract is related to increased endoplasmic reticulum stress. *Nutrients*, 10(4), 450.
- Petrovska, B. B., & Cekovska, S. (2010). Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacognosy reviews*, 4(7), 106.
- Prasad, N. R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Reddy, B. V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and cellular biochemistry*, 349(1-2), 11-19.
- Recio-Boiles, A., Waheed, A., & Cagir, B. (2019). Cancer, colon. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Reid, P., Kantoff, P., & Oh, W. (1999). Antiandrogens in prostate cancer. *Investigational new drugs*, 17(3), 271-284.

- Rollinger, J. M., Langer, T., & Stuppner, H. (2006). Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. *Current medicinal chemistry*, 13(13), 1491-1507.
- Sadeghi, M., Enferadi, M., & Shirazi, A. (2010). External and internal radiation therapy: past and future directions. *Journal of cancer research and therapeutics*, 6(3), 239.
- Sasikala, R., Ravindran, V.S., 2013. Antimicrobial activity of *Scorpaenopsis venosa* toxic extracts and its structural elucidation. *J. Chem. Pharm. Res.* 5, 254-259.
- Seki, T., Hosono, T., Hosono-Fukao, T., Inada, K., Tanaka, R., Ogihara, J., & Ariga, T. (2008). Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17.
- Shetty, K; Brown, J. Oral cancer risk factors among Mexican American Hispanic adolescents in South Texas. *J Dent Child (Chic)*, 2009 76, 142-148.
- Shin DY, Yoon MK, Choi YW, Gweon OC, Kim JI, Choi TH, et al. Effects of aged black garlic extracts on the tight junction permeability and cell invasion in human gastric cancer cells. *Journal of Life Sciences*. 2010;20(4):528-534. DOI: 10.3892/mmr.2011.588
- Siegers, C. P., Steffen, B., R bke, A., & Pentz, R. (1999). The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. *Phytomedicine*, 6(1), 7-11.
- Sitas, F; Parkin, DM; Chirenje, M; Stein, L; Abratt, R; Wabinga, C SPLAT N. Part II: Cancer in Indigenous Africans--causes and control. *Lancet Oncol*, 2008 9, 786-95.
- SM Wold, C SPLAT N., & Toth, K. (2013). Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Current gene therapy*, 13(6), 421-433.
- Song, Z., Wu, Y., Yang, J., Yang, D., & Fang, X. (2017). Progress in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumor Biology*, 39(7), 1010428317714626.
- Storniolo, C. E., Martinez-Hovelman, N., Mart nez-Hu elamo, M., Lamuela-Raventos, R. M., & Moreno, J. J. (2019). Extra virgin olive oil minor compounds modulate mitogenic action of oleic acid on colon cancer cell line. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(41), 11420-11427.
- Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.

- Sundaram, S. G., & Milner, J. A. (1996). Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *The Journal of nutrition*, 126(5), 1355-1361.
- Thomas, E., & Victor, K. (2014). *Biodiversity, Natural Products and Cancer Treatment*. World Scientific.
- Thomson, M., & Ali, M. (2003). Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Current cancer drug targets*, 3(1), 67-81.
- Tran, G. B., Pham, T. V., & Trinh, N. N. (2019). Black Garlic and Its Therapeutic Benefits. In *Medicinal Plants-Use in Prevention and Treatment of Diseases*. IntechOpen.
- Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K. 2011. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem*, 11: 249-253.
- Viswanathan, AN; Erickson, BA. Three-Dimensional Imaging in Gynecologic Brachytherapy: A Survey of the American Brachytherapy Society. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009 (In press).
- Vogelstein, B., Baker, S., Fearon, E. R., & Nigro, J. M. (2004). U.S. Patent No. 6,677,312. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wallace IV GC, Haar CP, Vandergrift WA 3rd, Giglio P, Dixon-Mah YN, Varma AK, Ray SK, Patel SJ, Banik NL, Das A. 2013. Multitargeted DATS prevents tumor progression and promotes apoptosis in ectopic glioblastoma xenografts in SCID mice via HDAC inhibition. *J Neurooncol*, 114: 43-50.
- Wallock-Richards D, Doherty CJ, Doherty L, Clarke DJ, Place M, Govan JRW, et al. (2014) Garlic Revisited: Antimicrobial Activity of Allicin-Containing Garlic Extracts against *Burkholderia cepacia* Complex. *PLoS ONE* 9(12): e112726.
- Wang X, Jiao F, Wang QW, Wang J, Yang K, Hu RR, et al. Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Medicine Reports*. 2012;5(1):66-72. DOI: 10.3892/mmr.2011.588.
- Wang, CİSPLATİN. C., Yang, J. CİSPLATİN., Hsieh, S. C., & Sheen, L. CİSPLATİN. (2010). Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), 7096-7103.
- Wang, E. J., Li, CİSPLATİN., Lin, M., Chen, L., Stein, A. P., Reuhl, K. R., & Yang, C. S. (1996). Protective effects of garlic and related organosulfur compounds

on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. Toxicology and applied pharmacology, 136(1), 146-154.

Wang, JY; Lu, CY; Chu, KS; Ma, CJ; Wu, DC; Tsai, HL; Yu, FJ; Hsieh, JS. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. Eur Surg Res, 2007 39, 245-250.

Wang, K., Groom, M., Sheridan, R., Zhang, S., & Block, E. (2013). Liquid sulfur as a reagent: synthesis of polysulfanes with 20 or more sulfur atoms with characterization by UPLC-(Ag⁺)-coordination ion spray-MS. Journal of Sulfur Chemistry, 34(1-2), 55-66.

Wang, X., Jiao, F., Wang, Q. CISPLATIN., Wang, J., Yang, K., Hu, R. R., ... & Wang, CISPLATIN. S. (2012). Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. Molecular medicine reports, 5(1), 66-72.

Wu, C. C., Chung, J. G., Tsai, S. J., Yang, J. CISPLATIN., & Sheen, L. CISPLATIN. (2004). Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. Food and Chemical Toxicology, 42(12), 1937-1947.

Yang GQ, Wang D, Wang YS, Wang YY, Yang K. Radiosensitization effect of black garlic extract on lung cancer cell line Lewis cells. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2013;33(8):1093-109.

Yang J, Wang T, Yang J, Rao K, Zhan CISPLATIN, Chen RB, Liu Z, Li MC, Zhuan L, ZangGH, Guo SM, Xu CISPLATIN, Wang SG, Liu JH, Ye ZQ. 2013. S-allyl cysteine restores erectile function through inhibition of reactive oxygen species generation in diabetic rats. Andrology, 487- 494.

Zain al-abdeen SS, Abdullah IT, Al-Salihi SS. 2013. The synergism effect of aqueous garlic extract and ciprofloxacin against some multiresistant bacteria. J Microbiol Biotech Res, 3: 136-142