



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**BAZI *CITRUS* L. TÜRLERİNİN MEME TÜMÖRÜ
ÜZERİNDEKİ *IN VITRO* VE *IN VIVO* ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖMER FARUK YAKINCI

FARMAKOĞNOZİ ANA BİLİM DALI

HAZİRAN 2024



**BAZI *CITRUS* L. TÜRLERİNİN MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNDEKİ *IN VITRO* VE
IN VIVO ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ömer Faruk YAKINCI

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindesundüğüm verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasındayararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Omer Faruk YAKINCI

26/06/2024

BAZI *CITRUS* L. TÜRLERİNİN MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNDEKİ *IN VITRO* VE *IN VIVO* ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Ömer Faruk YAKINCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2024

ÖZET

Kanser dünyadaki ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır ve meme kanseri en yaygın görülen üç kanser türünden biridir. Bu maligniteye karşı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmekte ve antikarsinogenik etkili fitokimyasallar üzerinde yapılan araştırmalar, yeni biyoaktif bileşiklerin bulunması ve klinikte uygulanma potansiyellerinin ortaya konulması yönünden büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, *Citrus* türlerinin meyvelerinin, *in vitro* ve *in vivo* antitümör etkilere sahip olduğu bildirilen limonoitler, flavonoidler ve kumarinler gibi çeşitli sekonder metabolitler içerdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda, farklı molekül iskeletlerine sahip potansiyel sitotoksik etkili bileşikler bir arada bulundurması nedeniyle *Citrus aurantium* L. (turunç), *Citrus maxima* (Brum.) Merr. (şadok), *Citrus medica* L. (ağaç kavunu) ve *Citrus paradisi* Macfad. (greyfurt) bitkilerinin meyve kabuklarının meme tümörü üzerinde tedavi edici etki gösterebileceği öngörülmüş ve bu doğrultuda, anılan meyvelerin kabuklarından hazırlanan ekstraktların ve ekstraktlardan, *in vitro* (MCF-7 hücre hattı) sitotoksik aktivite-yönlendirmeli fraksiyonlama çalışmaları doğrultusunda elde edilen fraksiyonların ve sekonder metabolitlerin *in vivo* N-metil-N-nitrozoüre (NMU)-nedenli meme tümörü modeli üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Aktivite-yönlendirmeli olarak yapılan fraksiyonlama ve izolasyon çalışmaları doğrultusunda en aktif bulunan *C. aurantium* meyve kabuklarının etil asetatlı ekstresinden Sephadex LH-20 ve silika jel açık kolon kromatografisi yöntemleriyle fraksiyon ve alt fraksiyonlar elde edilmiş; bunlardan en etkili bulunan SP FR.A+B ve CASK-3 üzerinde izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aktif alt fraksiyondan CAS 5 (izomeranzin), CAS 10 (3-metoksi nobiletin), CAS 11 (nobiletin) ve CAS 12 (tangeretin) bileşikler izole edilmiştir. Tek doz NMU enjeksiyonu sonrasında meme tümörü oluşturulan Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlara *in vitro* deneylerde en etkili bulunan numuneler oral gavajla 8 hafta boyunca uygulanmış, deney sonunda alınan doku ve kan örneklerinde biyokimyasal, histopatolojik, immunohistokimyasal çalışmalar ile gen analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *in vivo* bulgular, en etkili tedavinin nobiletin uygulaması ile sağlandığını göstermiştir. İzole edilen bileşikler üzerinde antikanser aktiviteye yönelik olarak yapılan *in silico* analizler, *in vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen sonuçlar için destekleyici veri sağlamıştır.

Bilim Kodu : 1017

Anahtar Kelimeler : *Citrus*, meme tümörü, kanser, *in vitro*, *in vivo*, NMU, MCF-7, sitotoksikite

Sayfa adedi : 189

Danışman : Prof. Dr. İpek SÜNTAR

EVALUATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* EFFECTS OF SOME *CITRUS* L. SPECIES
ON MAMMARY TUMORIGENESIS

(Ph. D. Thesis)

Ömer Faruk YAKINCI

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2024

ABSTRACT

Cancer is among the top causes of death in the world, and breast cancer is one of the three most common types of cancer. Studies on the development of new treatment approaches against this malignancy, and research on phytochemicals with anticarcinogenic effects is of great importance in terms of finding new bioactive compounds and revealing their potential for clinical application. Previous studies have revealed that the fruits of *Citrus* species contain various secondary metabolites such as limonoids, flavonoids and coumarins, which are reported to have antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. In the present study, *Citrus aurantium* L. (bitter orange), *Citrus maxima* (Brum.) Merr. (shaddock), *Citrus medica* L. (citron) and *Citrus paradisi* Macfad (grapefruit) were selected due to their content of potentially cytotoxic compounds with different molecular structures. It has been considered that the fruit peels of *Citrus* plants may have a therapeutic effect on mammary tumors. Accordingly, the present study aims to investigate the *in vivo* anticancer effects of the extracts, fractions and the secondary metabolites of the mentioned fruits on N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-induced mammary tumor model in rats, in the line with cytotoxic *in vitro* activity-guided fractionation studies on MCF-7 cell line. Fractions and subfractions were obtained by Sephadex LH-20 and silica gel open column chromatography methods from the ethyl acetate extract of *C. aurantium* fruit peels. Isolation studies were carried out on SP FR.A+B and CASK-3, which were found to be the most effective. Compounds CAS 5 (isomeranzin), CAS 10 (3-methoxy nobiletin), CAS 11 (nobiletin) and CAS 12 (tangeretin) were isolated. The active samples were administered by oral gavage to Sprague-Dawley female rats in which mammary tumors were induced after a single dose of NMU injection. Biochemical, histopathological, immunohistochemical studies and gene analyzes were performed on the tissue and blood samples taken at the end of the experiment. Obtained *in vivo* findings showed that the most effective treatment was provided by nobiletin application. *In silico* analyzes for anticancer activity on the isolated compounds provided supporting data for the results obtained from *in vitro* and *in vivo* experiments.

Science Code : 1017

Key words : *Citrus*, mammary tumorigenesis, cancer, *in vitro*, *in vivo*, NMU, MCF-7, cytotoxicity

Page Number : 189

Supervisor : Prof. Dr. İpek SÜNTAR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, gerek akademik gerekse kişisel yaşamımdaki konularda ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İpek SÜNTAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışma materyallerinin toplanmasında ve tayininde destek olan Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve Dr. Ertuğrul TURGUTOĞLU'na; sitotoksik aktivite deneylerinde laboratuvarında çalışma imkânı sağlayan, desteğini ve ilgisini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Esra EMERCE'ye; izole edilen bileşiklerin spektroskopik analizlerinin yapılmasında ve yapı tayinlerinin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları bulunan ve bilgilerinden istifade ettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ'e; *in vivo* deneylerin her noktasında desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL'e; fitokimyasal analizlerde destek veren Öğr. Gör. Ayhan İbrahim AYSA'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında Farmakognozi Anabilim Dalı'nın laboratuvar olanaklarını kullanmama imkânı veren Anabilim Dalı Başkanı ile tüm öğretim üye ve yardımcılarına teşekkür ederim.

Tüm kararlarımda destek ve ilgisini daima hissettiğim sevgili eşime sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmalarıma, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (2020/1-220S197) ile finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botanik Bilgiler.....	3
2.1.1. Rutaceae familyası.....	3
2.1.2. <i>Citrus</i> L.....	4
2.1.3. <i>Citrus</i> L. botanik özellikleri.....	6
2.1.4. Çalışmamızda kullandığımız <i>Citrus</i> türlerinin botanik özellikleri	8
2.2. <i>Citrus</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	11
2.2.1. Halk arasında ve geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılışı	11
2.2.2. <i>C. aurantium</i> L. üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar	15
2.2.3. <i>C. aurantium</i> L. üzerinde yapılan aktivite çalışmaları	23
2.3. Kanser	33
2.3.1. Meme kanseri	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
3.1. Bitki Materyali	51
3.2. <i>Citrus</i> Türlerinin Ekstraksiyonu ve Kromatografik Çalışmalar.....	51

	Sayfa
3.2.1. Ekstraksiyon	51
3.2.2. Fraksiyonlama	54
3.2.3. Saflaştırma ve izolasyon	57
3.2.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile nobiletin miktar tayini*	60
3.3. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	61
3.3.1. Kültür şartları	61
3.3.2. Sitotoksosite protokolü	61
3.3.3. Mikroskopta hücre morfolojisinin değerlendirmesi	62
3.4. <i>In silico</i> Biyolojik Aktivite Tahmin Çalışmaları	62
3.5. <i>In vivo</i> Biyolojik Aktivite Çalışmaları	63
3.5.1. Deney hayvanları	63
3.5.2. Deney hayvanlarında tümör indüksiyonu ve uygulanan tedaviler	63
3.5.3. <i>In vivo</i> deneysel prosedür	65
3.6. Biyokimyasal Analizler	65
3.7. Gen Ekspresyon Analizleri	66
3.7.1. Toplam RNA ekstraksiyonu	66
3.7.2. Nükleik asit ölçümleri	66
3.7.3. Revers transkriptaz işlemi	67
3.7.4. Real time PCR mRNA gen ekspresyon analizleri	67
3.8. Histopatolojik Analizler	68
3.9. İmmunohistokimyasal Analizler	71
3.9.1. TUNEL boyama	72
3.10. İstatistiksel Analiz	72
4. BULGULAR	73
4.1. Fitokimyasal Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	73

	Sayfa
4.1.1. İzolasyon çalışmaları	73
4.1.2. HPLC ile nobiletin miktar tayini sonuçları.....	97
4.2. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Çalışma Sonuçları.....	102
4.3. <i>In silico</i> Biyolojik Çalışma Sonuçları	115
4.4. <i>In vivo</i> Biyolojik Aktivite Çalışma Sonuçları	120
4.4.1. Hayvan ağırlıkları ve tümör hacimleri.....	121
4.5. Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	125
4.6. Gen Ekspresyon Sonuçları	127
4.7. Histopatoloji ve İmmunohistokimya Analizlerinin Sonuçları	128
5. TARTIŞMA	141
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	155
KAYNAKLAR	157
EKLER.....	185
ÖZGEÇMİŞ	188

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çalışmamızda kullanılan <i>Citrus</i> türlerinin ülkemizde kayıtlı olan herbaryum bilgileri.....	10
Çizelge 2.2. Çalışmamızda kullandığımız <i>Citrus</i> türlerinin antik ve orta çağdaki kullanımları	12
Çizelge 2.3. Çalışmamızda kullanılan <i>Citrus</i> türlerinin halk arasında ve geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılışı.....	14
Çizelge 2.4. <i>C. aurantium</i> meyvelerinde bulunan kumarinler.....	17
Çizelge 2.5. <i>C. aurantium</i> meyvelerinde bulunan flavonoidler.....	19
Çizelge 2.6. <i>C. aurantium</i> meyvelerinde bulunan terpenoidler	21
Çizelge 2.7. Meme kanserinin 3 alt tipi için prevalans, prognoz ve tedavi seçenekleri .	40
Çizelge 2.8. Meme kanseri tedavisinde bitkisel bileşiklerin aktiviteleri	45
Çizelge 3.1. <i>Citrus</i> türlerinin herbaryum kayıt numaraları.....	51
Çizelge 3.2. <i>Citrus</i> meyve kabuklarının MeOH ekstraktlarının yüzde verimleri	52
Çizelge 3.3. <i>Citrus</i> türlerinden farklı polaritedeki çözücülerle hazırlanan ham ve alt ekstraktların verimleri	54
Çizelge 3.4. HPLC Analiz koşulları	60
Çizelge 3.5. Deney grupları ve yapılan uygulamalar.....	64
Çizelge 3.6. Primer dizini	67
Çizelge 3.7. Sıçan meme bezi tümörlerinin sınıflandırılması.....	68
Çizelge 3.8. SBR Derecelendirme Sistemi	70
Çizelge 4.1. CAS 5 bileşiğinin ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CDCl ₃ , ¹³ C: 150 MHz; ¹ H: 600 MHz)	74
Çizelge 4.2. CAS 10 bileşiğinin ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CDCl ₃ , ¹³ C: 150 MHz; ¹ H: 600 MHz)	80
Çizelge 4.3. CAS 11 bileşiğinin ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CDCl ₃ , ¹³ C: 150 MHz; ¹ H: 600 MHz)	86
Çizelge 4.4. CAS 12 bileşiğinin ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CDCl ₃ , ¹³ C: 150 MHz; ¹ H: 600 MHz)	92

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.5. MeOH ekstralarının MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen yüzde hücre canlılığı sonuçları	102
Çizelge 4.6. <i>Citrus</i> türlerinin ham ekstralarının MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri (IC ₅₀ değerleri)	105
Çizelge 4.7. <i>Citrus</i> türlerinin EtOAc alt ekstralarının MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri (IC ₅₀ değerleri).....	105
Çizelge 4.8. CA EtOAc ekstrelerinin SP LH-20 kolon fraksiyonlarının MCF-7 ve MCF-10A hücre hattındaki sitotoksik etkileri ve seçicilik indeksleri	109
Çizelge 4.9. Silika jel kolon fraksiyonlarının (alt fraksiyonların) MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri ve seçicilik indeksleri	111
Çizelge 4.10. CASK 3'ten izole edilen bileşiklerin MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri ve seçicilik indeksleri	113
Çizelge 4.11. <i>In silico</i> analizleri yapılan bileşiklerin bilgileri	116
Çizelge 4.12. İzole edilen bileşiklerin antikanser aktivite ile ilişkili PASS ile hesaplanmış sonuçları	118
Çizelge 4.13. İzole bileşiklerin mutajenik aktivite değerlendirme sonuçları.....	120
Çizelge 4.14. Hayvanların haftalık vücut ağırlık ölçümleri.....	121
Çizelge 4.15. Ölçülen tümörlerin hesaplanan hacimleri.....	123
Çizelge 4.16. Serum CD4 ⁺ , CD8 ⁺ ve IFN-gamma düzeyleri	126
Çizelge 4.17. Doku CXCL seviyeleri	126
Çizelge 4.18. Meme dokularında yapılan gen ekspresyon analizleri.....	127
Çizelge 4.19. SBR derecelendirme sistemine göre gruplarda belirlenen grade düzeyleri	128
Çizelge 4.20. E-kaderin immun boyama değerleri	130
Çizelge 4.21. EGFR immun boyama değerleri.....	131
Çizelge 4.22. Östrojen immun boyama değerleri	132
Çizelge 4.23. Ki-67 immun boyama değerleri.....	133
Çizelge 4.24. Laminin immun boyama değerleri.....	134
Çizelge 4.25. P-63 immun boyama değerleri.....	135
Çizelge 4.26. Pansitokeratin immun boyama değerleri	136

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.27. Progesteron immün boyama değerleri	137
Çizelge 4.28. Ortalama apoptotik indeks değerleri.....	138
Çizelge 4.29. Vimentin immün boyama değerleri	139



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>C. aurantium</i> meyvelerinde bulunan kumarinler	16
Şekil 2.2. <i>C. aurantium</i> meyvelerinde bulunan flavonoidler	18
Şekil 2.3. Kanser için başlıca tedavi yöntemleri	36
Şekil 2.4. Doğal bileşiklerin meme kanseri yolağındaki moleküler hedefleri	44
Şekil 3.1. CA meyve kabuklarının ekstraksiyon, fraksiyonlama ve izolasyon şeması.	59
Şekil 4.1. CAS 5 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl ₃)	75
Şekil 4.2. CAS 5 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl ₃)	76
Şekil 4.3. CAS 5 bileşiğinin Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) spektrumu	77
Şekil 4.4. CAS 5 bileşiğinin HMBC spektrumu	78
Şekil 4.5. CAS 5 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (<i>m/z</i> 261,1130) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu	79
Şekil 4.6. CAS 10 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl ₃), A: CAS 10 bileşiğinin M-Nova (14.2.1-27684) programında safsızlıklar ve çözücü sinyali çıkarıldıktan sonraki spektrumu	81
Şekil 4.7. CAS 10 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl ₃)	82
Şekil 4.8. CAS 10 bileşiğinin HSQC spektrumu	83
Şekil 4.9. CAS 10 bileşiğinin HMBC spektrumu	84
Şekil 4.10. CAS 10 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (<i>m/z</i> 433,1502) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu	85
Şekil 4.11. CAS 11 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl ₃)	87
Şekil 4.12. CAS 11 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl ₃)	88
Şekil 4.13. CAS 11 bileşiğinin HSQC spektrumu	89
Şekil 4.14. CAS 11 bileşiğinin HMBC spektrumu	90
Şekil 4.15. CAS 11 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (<i>m/z</i> 403,1387) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu	91
Şekil 4.16. CAS 12 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl ₃)	93

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. CAS 12 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl_3).....	94
Şekil 4.18. CAS 12 bileşiğinin HSQC spektrumu	95
Şekil 4.19. CAS 12 bileşiğinin HMBC spektrumu	96
Şekil 4.20. CAS 12 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (m/z 373,1288) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu	97
Şekil 4.21. Nobiletinin kalibrasyon eğrisi.....	98
Şekil 4.22. Nobiletin (a) ve CA EtOAc ekstresi (b) kromatogramları.....	99
Şekil 4.23. Nobiletinin madde kalibrasyon (a, b, c, d, e) ve CA EtOAc ekstresinin (f) kromatogramları	100
Şekil 4.24. Nobiletinin kalibrasyon enjeksiyonları, overlaid görünüm	101
Şekil 4.25. <i>Citrus</i> türlerinin MeOH ekstraktlarının 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi	103
Şekil 4.26. <i>Citrus</i> türlerinin ham ve alt ekstraktlarının 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	104
Şekil 4.27. <i>Citrus</i> türlerinin ham ekstraktlarının 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi	106
Şekil 4.28. <i>Citrus</i> türlerinin EtOAc alt ekstraktlarının 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi	107
Şekil 4.29. CA EtOAc ekstresinin SP LH-20 kolon fraksiyonlarının A) MCF-7 ve B) MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri.....	110
Şekil 4.30. Silika jel kolon fraksiyonlarının (alt fraksiyonların) MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri	112
Şekil 4.31. CASK 3'ten izole edilen bileşiklerin MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri	114

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Soldan sağa sırasıyla <i>C. medica</i> , <i>C. maxima</i> , <i>C. paradisi</i> ve <i>C. aurantium</i> meyveleri.....	7
Resim 2.2. <i>Citrus aurantium</i> L.	8
Resim 2.3. <i>Citrus</i> türlerinin Türkiye’deki yayılışı.....	11
Resim 3.1. SP LH-20 kolonundan toplanan fraksiyonların, farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonraki UV 254 ve UV 366 dalga boylarındaki İTK görünümleri (Mobil faz: CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O)	56
Resim 3.2. 26/7 SK kodlu Silika jel kolon sonucunda toplanan fraksiyonların, <i>n</i> -hekzan:EtOAc (2:8) ve son iki fraksiyonun EtOAc:MeOH (8:2) çözücü sisteminde yürütüldükten sonraki UV 366 altındaki İTK kromatogramı	57
Resim 3.3. 24/10 Silika jel kolon sonucunda toplanan fraksiyonların, <i>n</i> -hekzan:EtOAc (3:7) çözücü sisteminde yürütüldükten ve %30 H ₂ SO ₄ (EtOH içerisinde) reaktifi ile muamele edilip 110°C’de ısıtıldıktan sonraki İTK kromatogramı	58
Resim 3.4. Histopatolojik sınıflandırılmada dikkat edilen lezyon kriterleri.....	69
Resim 3.5. SBR Derecelendirme Sistemine göre değerlendirme kriterleri	70
Resim 4.1. Deney sonunda hayvanlarda gözlenen tümör görüntü örnekleri	125
Resim 4.2. Böbrek dokusunda metastaz	129
Resim 4.3. E-kaderin immunopozitifliği	130
Resim 4.4. EGFR immunopozitifliği	131
Resim 4.5. ER immunopozitifliği	132
Resim 4.6. Ki 67 immunopozitifliği	133
Resim 4.7. Laminin immunopozitifliği.....	134
Resim 4.8. P-63 immunopozitifliği.....	135
Resim 4.9. Pansitokeratin immunopozitifliği	136
Resim 4.10. Progesteron immunopozitifliği	137
Resim 4.11. TUNEL immunopozitifliği	138
Resim 4.12. Vimentin immunopozitifliği	139

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
Hz	Hertz
<i>J</i>	Etkileşim sabiti
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim
U	Ünite
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Sigma
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar

Kısaltmalar**Açıklamalar**

¹H-NMR	Proton NMR
5-HT1A	Serotonin 1A
A375	İnsan melanom hücre hattı
A549	İnsan akciğer epitel adenokarsinoma hücre hattı
AA	Araşidonik asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AC	Adriamisin/siklofosfamid
AC-T	Adriamisin/siklofosfamid/paklitaksel
AKT	Protein Kinaz B
AMPK	Aktifleştirilen protein kinaz
BAX	Pro-apoptotik protein
Bcl2	Anti-apoptotik protein
BuOH	Butanol
Bcl-xL	Antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteini
CD₃OD	Dötero metanol
CA	<i>Citrus aurantium</i> L.
CHCl₃	Kloroform
CD4⁺	Yardımcı T hücreleri
CD8⁺	Sitotoksik T hücreleri
CG	<i>Citrus grandis</i>
CM	<i>Citrus medica</i>
COX	Siklooksijenaz
CP	<i>Citrus paradisi</i>
DCM	Diklorometan
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ERBB2	Epidermal büyüme faktörü 2'
EtOAc	Etil asetat
ERα	Östrojen reseptörü alfa
ERK	Fosforile hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FADD	Fasassociated death domain
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
Fr.	Fraksiyon
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi)
GSK3	Glikojen sentaz kinaz 3
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HaCaT	Normal cilt hücre hattı
HCC827	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
HepG2	İnsan Karaciğer Karsinoma hücre hattı
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HR	Hormon reseptörü
HTF	5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Heteronükleer Tekli Kuantum Uyumu)
IC₅₀	%50 İnhibisyon gösteren konsantrasyon
IFN	interferon
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
iNOS	İndüklenabilir Nitrik Oksit sentaz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
JNK	Fosforile c-Jun N-terminal kinaz
KAH	Kalp atım hızı

Kısaltmalar**Açıklamalar**

KK	Kolon Kromatografisi
LA	Limoneksik asit
LOX	Lipooksijenaz
MDA	Malondialdehit
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücre hattı
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MeOH	Metanol
MÖ	Milattan önce
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
NCI	National Cancer Institute (ABD Ulusal Kanser Enstitüsü)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)
NMU	N-metil-N-nitrozoüre
NPs-CA	Kitosan <i>C. aurantium</i> kabuğu ekstrelerinin nanopartikülleri
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik oksit
PC12	Feokromasitoma hücre hattı
PC-3	İnsan prostat kanseri hücre hattı
Prep. İTK	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi
PPAR	Peroksisom proliferatör aktivasyonlu reseptör
PR	Progesteron reseptörü
pEOCa	<i>C. aurantium</i> meyve kabuğu uçucu yağı
PLA2	Fosfolipaz A2
RP	Ters Faz (Reverse Phase)
RT-PCR	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Standard Error of the Mean (Ortalama Standart Hata)
SOD	Süperoksit dismutaz
SP	Sefadeks
STAI	Durumluk-Sürekli Kaygı Ölçeği

Kısaltmalar**Açıklamalar****s-Hex**

Sikloheksan

TC

Dosetaksel/siklofosfamid

TCM

Geleneksel Çin Tıbbı

TUNELTerminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTP çentik uç
etiketleme**TH**

Paklitaksel/trastuzumab

TNF- α Tümör nekroz faktörü- α **TNM**

Tümör-Nod-Metastaz

TRAIL

TNF ile ilişkili apoptozis indükleyici ligant reseptörü

UV

Ultraviyole

var.

Varyete

XIAP

X'e bağlı apoptoz inhibitörü proteini

1. GİRİŞ

Kanser, genel olarak kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesi olarak tanımlanır. Esas olarak hücrelerin çekirdeğinde bulunan genlerdeki mutasyondan kaynaklanır. Kanserli hücreler vücudun spesifik bir organında lokalize olarak kalırsa benign tümör olarak adlandırılır, ancak tümör hücreleri diğer organlara doğru göç etmeye başlarsa malign hale gelir. Meme hücrelerinde başlayan ve maligniteye ulaşan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile meme kanseri meydana gelir. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignitedir ve akciğer ve kolon kanseri ile birlikte dünya çapında en yaygın görülen üç kanser tipinden biridir. Sekiz ila on kadından birinin yaşamları boyunca meme kanseri olacağı istatistiki olarak öngörülmektedir. Meme kanseri halen az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde akciğer kanserinden sonra ikinci en yaygın ölüm nedenidir (Majeed ve diğerleri, 2014; Tao ve diğerleri, 2015). Günümüzde kanserlerin tedavisinde başvurulanan yöntemler radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi girişimdir ancak tedavide henüz istenilen düzeye ulaşılamamıştır. İlaç tedavilerine direnç geliştirebilen kanser hücreleri çoğalmalarını devam ettirebilmekte veya sağlıklı hücrelere zarar verebilmektedir. Bu nedenle, antikarsinojenik etkili yeni bileşiklerin araştırılması hız kesmeden devam etmektedir (Debela ve diğerleri, 2021).

Doğal kaynaklar günümüzde potansiyel kemoterapötik ajanların en önemli kaynağı olarak kabul edilmektedir. 1960 yılından bu yana Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan antikanser ilaçların %50'sinden fazlası doğal kaynaklıdır. 1996-2003 yılları arasında 400'den fazla sitotoksik etkili bileşik, bitkilerden, deniz canlılarından ve mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Mayer ve Gustafson, 2004).

Citrus türleri (turunçgil, narenciye) tüm tropikal ve subtropikal ülkelerde kültürü yapılan, insan sağlığına ve diyetine katkıda bulunan, küresel erişilebilirliği ve popüleritesiyle oldukça önemli meyvelere sahip, ekonomik değeri yüksek olan bitki türleridir. Ayrıca, *Citrus* türleri antitümöral, kardiyoprotektif, serbest radikal süpürücü, bakterisidal ve antiviral etkilere sahip tıbbi ve aromatik bitkiler olup bu etkileri nedeniyle nutrasötik, geleneksel bitkisel tıbbi ürün ve bitkisel ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Ezzati, Yousefi, Velaei ve Safa, 2020).

Yapılan literatür çalışmaları, *Citrus* türlerinin meyvelerinin çeşitli hastalıklardan korunmada ve hastalıkların tedavisinde yaygın bir kullanım alanına sahip olduğunu göstermektedir. *Citrus* meyvelerinin çeşitli tipte kanserlerin önlenmesi için yararlı olabileceği yapılan epidemiyolojik araştırmalarda bildirilmiştir (Y. Wang ve diğerleri, 2017). Farklı iskelete sahip biyoaktif bileşikler (flavonoidler, kumarinler, limonoidler, vb.) taşıyan bu türlerin, enflamasyon ve oksidasyon süreçleri üzerinde olumlu etkiler göstererek, diyabet, kanser ve kalp-damar hastalıkları riskini ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir (Flavia Cristina Fernandes Pimenta, Tavares, ve diğerleri, 2017). Çalışmamızda, içerdiği bileşik grupları nedeniyle antikanser etki gösterme potansiyellerinin olduğu belirlenen fakat üzerinde daha önce meme tümörüne karşı ayrıntılı ve karşılaştırmalı antikanser aktivite çalışması bulunmayan *Citrus aurantium* L. (turunç), *Citrus maxima* (Brum.) Merr. (şadok), *Citrus medica* L. (ağaç kavunu) ve *Citrus paradisi* Macfad. (greyfurt) türleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* prelinik araştırmaların yürütülmesi amaçlanmıştır. Etkili sekonder metabolitlerin, meyve kabuklarında daha yüksek oranda bulunması (Favela-Hernández, González-Santiago, Ramírez-Cabrera, Esquivel-Ferriño ve Camacho-Corona, 2016) ve turunçgil atıklarının katma değeri yüksek ürünler olarak değerlendirilme potansiyelinin ortaya konulabilmesi amacıyla çalışmamızın *Citrus* meyve kabukları üzerinde yürütülmesi planlanmıştır. Anılan türlerin meyve kabuklarından hazırlanan ekstraktların ve aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışmaları ile elde edilen alt ekstraktların, fraksiyonların, alt fraksiyonların ve bileşiklerin antitümöral etkilerinin *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* deneyler ile detaylı ve karşılaştırmalı olarak araştırılması, etki mekanizmalarının ortaya konulması ve bu suretle meme kanseri üzerine etkili doğal kaynaklı bileşiklerin bilimsel literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Genel Bilgiler” bölümünün “Botanik Bilgiler” ve “Halk arasında ve Geleneksel Tedavi Sistemlerinde Kullanılışı” alt bölümlerinde, çalışmamızda kullanmış olduğumuz *Citrus aurantium* L. (turunç), *Citrus maxima* (Brum.) Merr. (şadok), *Citrus medica* L. (ağaç kavunu) ve *Citrus paradisi* Macfad. (greyfurt) türlerine ait bilgiler sunulmuştur. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre, bu türler arasında en yüksek aktivite gösteren türün *C. aurantium* olduğu belirlendiğinden, “Fitokimyasal Çalışmalar” ve “Biyolojik Aktivite Çalışmaları” alt bölümlerinde yalnızca *C. aurantium*’a ait bilgiler sunulmuştur.

2.1. Botanik Bilgiler

Alem: Plantae

Bölüm: Spermatophyta

Alt Bölüm: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledoneae

Alt Sınıf: Dialypetalae

Takım: Sapindales

Familiya: Rutaceae

Cins: *Citrus* L.

2.1.1. Rutaceae familyası

Rutaceae familyası, ağırlıklı olarak tropikal ve subtropikal bölgede yetişen bitkilerden oluşan, yaklaşık 2100 tür ve 154 cins ile Sapindales takımındaki tür sayısı açısından en büyük familyadır. Türler dünya çapında çoğunlukla (sub) tropikal bölgelerde bulunur ve üç ana çeşitliliğe sahip bölge vardır: Tropikal Orta ve Güney Amerika, Güney Afrika (özellikle Cape Town bölgesi) ve Avustralasya (Appelhans ve diğerleri, 2021; Kubitzki, 2010).

Rutaceae familyası çoğu ağaçlar veya çalılardan oluşan, bazen tırmanıcı, nadiren otsu bitkilerden oluşur (Kubitzki, 2010). Bazı taksonların sapları dikenlidir. Yapraklar basit, trifoliat veya pinnattır, bazen pinnatifittir; genellikle pellusit veya benekli salgı bezleri bulunur. Çiçeklenme, nadiren yalnız çiçeklerden oluşan bir simoz veya salkımdır. Çiçekler

genellikle hermafrodit ve aktinomorf, hipogin, nadiren epigindir. Kaliks aposepal veya 4–5 sepal birleşik veya lobludur. Korolla petalsız veya 4-5 petal birleşik, imbrikat veya valvat ya da lobludur. Stamen sayısı 8-10-∞, genellikle diplostemon, bazı taksonlarda staminodyumlar bulunur; filamentler genellikle tabanda birleşiktir. Anterler boyuna yarıkla açılır. Ginekeum sinkarp, nadiren apokarp, üstün durumda, 4–5 karpellidir. Placentasyon aksillerdir. Ovüller anatrop veya hemitrop, bitegmik, karpel başına 2 ovül düşmektedir. Nektaryum genellikle ovaryum tabanında halka şeklinde bir disk olarak bulunur. Meyve şizokarp, bakka, drupa veya hesperidyumdur. Yaprak ve perikarp dâhil olmak üzere birçok dokuda uçucu yağ içeren salgı cepleri mevcuttur (Simpson, 2010).

Familiya dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen Asya kökenli bir tür olan *Citrus* L. cinsiyle ve bu cinsin türleri olan yenilebilir meyveleriyle (portakal, limon, mandalina, greylift, vb.) bilinir. Rutaceae familyasındaki *Citrus* dışındaki diğler cinsler, halk arasında kullanılan bitki türlerinin, uçucu yağların ve klinikte tedavi amacıyla kullanılan ajanların kaynağı olarak önemlidir. Bu familyadaki bazı bitkilerden, içerdikleri 5-metoksipsoralen, limonitler ve triterpenler gibi bileşiklerin antimikrobiyal ve antifungal etkilerinden dolayı doğal pestisitler ve herbisitler (Groppo, Afonso ve Pirani, 2022) olarak yararlanılmakla birlikte, bu familiya bitkilerinin asıl olarak çok sayıda farklı farmakolojik etkilere [(antidiyabetik (Den Hartogh ve Tsiani, 2019), antikanser (Saini ve diğlerleri, 2022), kardiyoprotektif (Victoria-Montesinos ve diğlerleri, 2021), antiobezite (Nakajima, Macedo ve Macedo, 2014), immünomodülatör (Miles ve Calder, 2021), antibakteriyel (Saeb, Amin, Gooybari ve Aghel, 2016) vb.]] sahip oldukları bildirilmiştir

2.1.2. *Citrus* L.

Citrus kelimesi Grekçe “κέρπος” kelimesinden türetilmiştir. *Citrus* ismi yazılı kayıtlarda ilk defa “Book of History” (MÖ 500 yıl) kitabında geçmiş ve bu türlerin kökeninin en az MÖ 2200'e kadar uzandığı bildirilmiştir. *Citrus* türlerinin coğrafi kökenine ilişkin farklı hipotezler bulunmaktadır ve bunların neredeyse tamamı Güneydoğu Asya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinden diğler kıtalara bu bölgelerden dağılması ile ilgilidir (Cebadera-Miranda, Morales ve Cámara, 2019).

Citrus L. cinsi Sapindales takımına ve Rutaceae familyasına aittir. Türlerin varyete çeşitliliği ve yüksek mutasyon sıklığı, taksonomik ilişkilerin kurulmasını zorlaştırdığından, *Citrus*

türlerinin sınıflandırılmasında, birkaç taksonomik yaklaşım ortaya konulmuştur (Cebadera-Miranda ve diğerleri, 2019).

Citrus cinsi, *Genera Plantarum*'un ilk baskısında 1737'de Carl Linnaeus tarafından belirlenmiştir. 1753'te *Species Plantarum* adlı çalışmasında Linnaeus, *Citrus* cinsinin üç türünü belirlemiştir: Ağaç kavunu ile limon ağaçlarını (*C. medica* var. *lemon*) içeren *C. medica*; acı-tatlı portakal ağaçlarını içeren *C. aurantium* (*C. aurantium* var. *sinensis*) ve pomelo veya şadok olarak adlandırılan (*C. aurantium* var. *grandis*). Osbeck, 1757'de pomeloyu *C. grandis* olarak adlandırmıştır ve 1765'te tatlı portakal ağacını (*C. sinensis*) acı portakal ağacından bağımsız bir tür olarak ayırmıştır (Cebadera-Miranda ve diğerleri, 2019).

Filogenetik bakış açısına göre en çok kabul gören hipotez, yetiştirilen tüm *Citrus* türlerinin üç özgün türden çeşitlendiğini varsaymaktadır. Bu türler, Hindistan kökenli ve Avrupa'da bilinen ilk *Citrus* türü olan ağaç kavunu (*C. medica*); Çin orijinli mandalina (*C. reticulata*) ve Malezya takımadaları ve doğu Hindistan orijinli pomelodur (*C. maxima*) (Barrett ve Rhodes, 1976; Scora, 1975). Kalan altı ticari tür, üç ana türden üretilen melezlerdir. Bu hipotez, biyokimyasal ve morfolojik kriterlere dayalı olarak Scora (Scora, 1975) ile Barret ve Rhodes (Barrett ve Rhodes, 1976) tarafından önerilmiş ve daha sonra moleküler biyoloji teknikleriyle desteklenmiştir (De-qui ve diğerleri, 1993; Federici, Fang, Scora ve Roose, 1998; Nicolosi ve diğerleri, 2000). Diğer *Citrus* türlerinin ve varyetelerinin, bahsi geçen orijinal türler veya onların soyundan gelen türler arasındaki ardışık melezlemeler veya doğal ya da indüklenmiş mutasyonlar ile oluştuğu öne sürülmüştür (Cebadera-Miranda ve diğerleri, 2019).

Ülkemizde yetişen *Citrus* türleri

Citrus aurantiifolia (Christm.) Swing. – Bergamot

Citrus aurantium L. – Turunç

Citrus deliciosa Ten. – Akdeniz mandalinası

Citrus limon L. Burn. f. – Limon

Citrus maxima (Burn.) Merrill – Şadok

Citrus medica L. – Ağaç kavunu

Citrus paradisi Macfad. – Greyfurt

Citrus reticulata Blanco – Mandalina

Citrus sinensis (L.) Obsbeck – Tatlı portakal

Citrus trifoliata L. – Üç turunç

2.1.3. *Citrus* L. botanik özellikleri

Küçük ağaçlar. Yapraklar basit, alternan, ince, lateral damarları az, yaprak sapları genellikle $\pm$ kanatlı veya kenarlı, genellikle yaprak tabanı ile eklemli. Çiçekler beyaz veya kırmızımsı mora çalan, tek ve aksiller veya kısa aksiller rasemus, tam veya ginekeum işlevsiz. Kaliks 4-5 parçalı, korolla 4-8 (genellikle 5-) parçalı. Stamenler petallerin 4-10 katı kadar. Ovaryum değişken, genellikle 10-14 loküler, ovüller 2 kollateral sıra halinde. Meyve etli bir hesperidyum, tohumlar etrafında stipitat, iğsi pulp-veziküllerle çevrili. Türkiye'de *Citrus* türleri ürünleri Ege ve Akdeniz illerinde (başlıca İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Mersin, Adana ve Hatay) ve Doğu Karadeniz'de (özellikle Rize) yetiştirilmektedir. "Flora of Turkey and The East Aegean Islands" kitabında *Citrus* türlerinin ayırımı için verilen "Tayin Anahtarı" aşağıdaki gibidir (Davis, 1970):

1. Yaprak sapı kanatsız, en fazla dar kenarlı, yaprak tabanına birleşik veya düzgün olmayan şekilde bağlantılı ***C. medica***

1. Yaprak sapı kanatlı, en azından dar kanatlı, yaprak tabanı ile belirgin şekilde eklemli
2. Stamenler çok sayıda, genellikle petal sayısının 4 katından fazla; çiçekler 2 türlü, hermafrodit veya erkek; olgun meyve parlak sarı, her iki ucunda mememsi bir çıkıntı var ***C. limon***

3. Meyve belirgin şekilde basık, her iki uça yassılaştırmış, kabuk kolayca ayrılabilir
4. Meyve büyük, 6 cm'den fazla; yapraklar eliptikten ovata kadar, genellikle 10 cm'den fazla; tomurcuklar 10 mm'den fazla ***C. unshiu***

4. Meyve daha küçük, nadiren 6 cm'ye ulaşır; yapraklar lanseolat, 10 cm'den küçük; tomurcuklar 10 mm'ye ulaşmaz ***C. deliciosa***

3. Meyve basık değil, kabuk segmentlere sıkıca bağlı
5. Meyve büyük-çok büyük, yaklaşık 10-15 cm çapında, çoklu (18-) loküler, soluk sarı; yaprak sapları geniş kanatlı

6. Kolayca parçalanen büyük pulpa kesecikleri olan meyveler; yaprak sapları geniş kanatlı, dış hatları subkordat; tohumlar tek embriyolu, çıkıntılı ***C. grandis***

6. Meyve daha küçük, yapışık pulpa-veziküllü; yaprak sapları daha az geniş kanatlı, dış hatları kordat değil; tohumlar pürüzsüz, poliembriyonik ***C. paradisi***

5. Meyve 5-10 cm çapında, 13 lok lere kadar; yaprak sapı geniş kanatlıysa meyve kırmızımsı veya turuncu

7. Meyve ovat yeşilimsi etli ve sarımsı yeşil kabuklu, genellikle her iki ucunda mememsi bir çıkıntı bulunur; yapraklar oldukça küçük ve dar ***C. aurantiifolia***

7. Meyve küremsi, kabuk soluk turuncudan kırmızı-turuncuya; yapraklar daha geniş ve daha büyük

8. Yaprak sapı geniş kanatlıdır; sert kabuklu ve keskin asitli meyve

C. aurantium

8. Yaprak sapları dar kanatlı; meyve daha yumuşak kabuklu ve tatlı

C. sinensis



Resim 2.1. Soldan sağa sırasıyla *C. medica*, *C. maxima*, *C. paradisi* ve *C. aurantium* meyveleri

2.1.4. Çalışmamızda kullandığımız *Citrus* türlerinin botanik özellikleri

Citrus aurantium L. (turunç)

Akdeniz havzası, Yemen, Hindistan, Çin Halk Cumhuriyeti, Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya'da yayılış göstermektedir. Ülkemizde, İzmir ve Antalya olmak üzere Güney Ege ve Akdeniz Bölgelerinde 500 m'den daha düşük seviyelerde yetişmekte ve kültürü yapılmaktadır. Killi topraklarda yetişir ve iyi drene edilmiş toprağı tercih eder.

Ağaç veya nadiren çalı formunda. Genç sürgünler tüysüz, yeşilimsi beyaz. Yapraklar foliat, yaprakçıklar 7,5-15 cm. Uzun, eliptik veya ovat, geniş, akut veya akuminat; yaprak sapları çıplak veya kanatlı, kanat genellikle obovat. Çiçek hermafrodit, beyaz. Stamenler 20-30 adet. Meyve küremsi, genellikle yassı ve turuncu renkli, kabuk gevşek veya yapışık; meyve tatlı, sarı, nadiren kırmızı (Resim 2.2). Çiçeklenme Nisan-Haziran ayları (Karthikeyan ve Karthikeyan, 2014).

Sinonimleri: *C. × aurantium* var. *aurantium*, *C. × aurantium* var. *sinensis*, *C. × aurantium* var. *paradisi*; *C. × aurantium* var. *tangerina*, *C. × aurantium* var. *unshiu* (satsuma mandarins), *C. × aurantium* var. *clementina*, *C. × aurantium* var. *nobilis*, *C. × aurantium* var. *temple*, *C. × aurantium* var. *deliciosa*, *C. × aurantium* var. *erythroa*, *C. × aurantium* var. *paratangerina* ve *C. × aurantium* var. *suhuiensis* (Ollitrault, Curk ve Krueger, 2020)



Resim 2.2. *Citrus aurantium* L.

Citrus maxima (Brum.) Merr. (şadok)

Güneydoğu Asya kökenli bir bitki olup, Hindistan, Çin, Japonya, Tayland, Filipinler, Endonezya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kültüre alınmaktadır.

Ağaç formunda. Genç dallar, abaksiyal yaprak yüzeyi, pedinküller ve ovaryum piloz. Dallar genellikle morumsu. Yaprak sapı $2-4 \times 0,5-3$ cm ya da daha az, kanatlı, yaprak ayası genişçe ovat ya da eliptik, $9-16 \times 4-8$ cm ya da daha büyük, kalın, koyu yeşil, taban yuvarlak, uç yuvarlaktan geniş ve bazen mukronat. Çiçekler tek veya salkım halinde; çiçek tomurcukları morumsu veya nadiren beyaz. Kaliks 3-5 loblu. Taç yapraklar 1,5-2 cm. Stamenler 25-35, bazıları gelişmemiş. Stilus uzun ve kalın. Meyve soluk sarı ve sarımsı yeşil, küremsi, yassı, piriform veya geniş obkonik, genellikle 10 cm'den daha büyük çaplı, 200 tohumlu veya tohumsuz; perikarp süngerimsi; sarkokarp 10-15 (-19) segmentli, beyaz, pembe, kırmızımsı veya nadiren sarı. Tohumlar düzensiz şekilli, belirgin sırtlı, gelişmemiş tohumlar çok sayıda, embriyo tek, kotiledonlar beyaz. Çiçeklenme Nisan-Mayıs ayları (A. Singh, 2017)

Sinonimleri: *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus maxima* var. *uvacarpa* Merr. (Ollitrault ve diğerleri, 2020)

Citrus medica L. (ağaç kavunu)

Orta ve Batı Hindistan bölgesi orijinli bir bitkidir (Panara, Joshi ve Nishteswar, 2012). Daha çok Akdeniz bölgesinde, Orta ve Güney Amerika'da yayılış göstermekle birlikte Avustralya, Japonya, Çin, Bangladeş, Arabistan, gibi tropikal ve subtropikal bölgelerde yetişmektedir.

Çalı veya küçük ağaç formunda. Dallar, yaprak tomurcukları ve çiçek tomurcukları gençken morumsu renkte. Dallar yaklaşık 4 cm, dikenli. Yapraklar basit, yaprak sapı kısa, kanatsız; yaprak ayası eliptikten ovat-eliptiğe kadar, $6-12 \times 3-6$ cm veya daha büyük. Çiçek salkımları aksiller, yaklaşık 12 çiçekli veya bazen çiçekler tek. Çiçekler hermafrodit veya erkek. Taç yapraklar 5 adet, 1,5-2 cm. Stamenler 30-50 adet. Ovaryum silindirik, stilus uzun ve kalın, stigma klavat. Meyve soluk sarı, subgloboz-elipsoid; perikarp beyaz-soluk sarı ve içi yumuşak, sarkokarptan daha kalın, zorlukla çıkarılır; sarkokarp 10-15 segmentli, renksiz, neredeyse pellusit-soluk sarı, kokulu. Tohumlar küçük, tohum kabuğu pürüzsüz,

embriyo(lar) tek ya da çok sayıda, kotiledonlar beyaz. Çiçeklenme Nisan-Mayıs ayları (Rani ve Gill, 2020).

Sinonimleri: *Citrus medica* var. *acida* Brandis (Ollitrault ve diğerleri, 2020)

Citrus paradisi Macfad. (greyfurt)

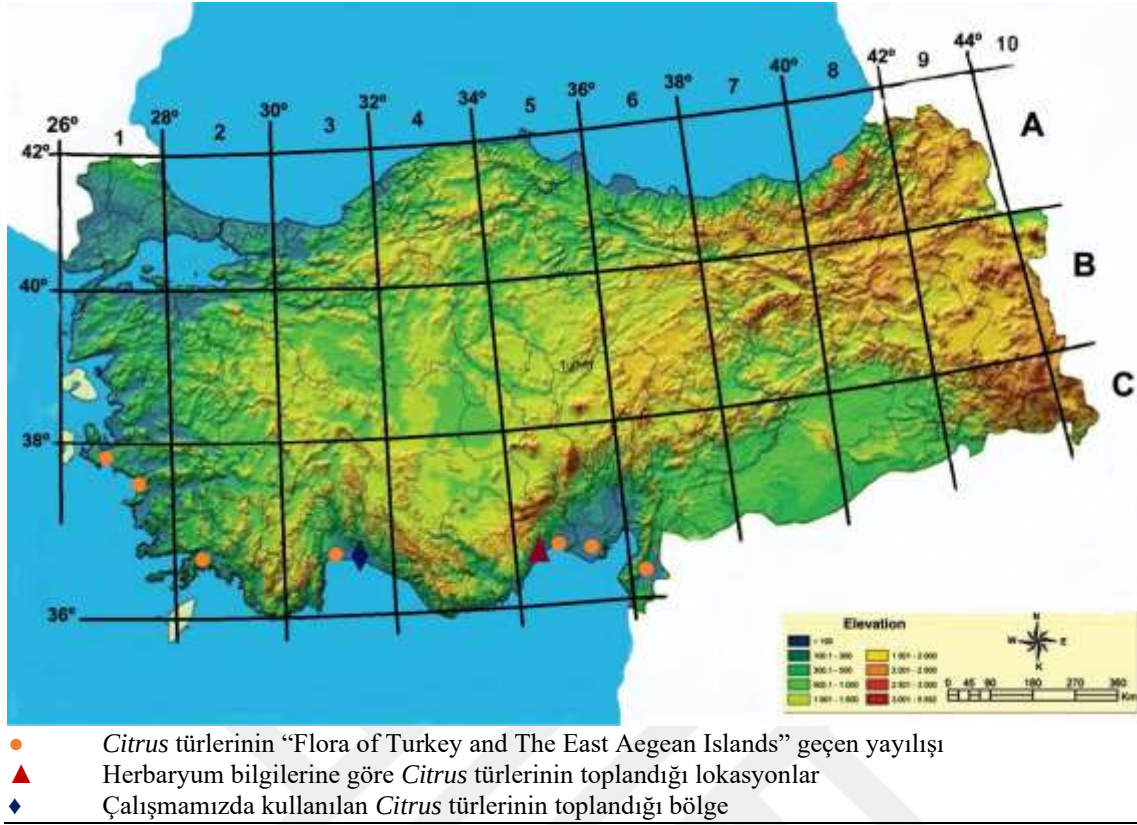
Yoğun taçlı ve küçük dikenleri olan 10-15 m yayılan büyük bir ağaçtır. Yapraklar 18 cm'ye kadar oval, koyu parlak yeşil, kenarları yuvarlak dentat, derimsi, sapı geniş kanatlı. Çiçekler beyaz, 2-20'li kümeler halinde, her seferinde bir tane açar, 4-5 cm genişliğinde. Meyve yuvarlak, 9-15 cm genişliğinde, 3-12'li kümeler halinde, meyve kabuğu yeşilden soluk sarı-turuncu renge değişen, inceden kalına kadar, pulpa sarı, büyük ve sıkı (Essombe Malolo ve diğerleri, 2022).

Çalışmamızda kullanılan *Citrus* türlerine ait herbaryum örneklerinin incelenmesi amacıyla Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu ziyaret edilmiş, bu herbaryumlar arasında sadece İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda kayıtlı örnekler bulunmuştur. Bulunan kayıtlar kareleme sistemine göre gruplandırılarak ülkemizdeki yayılışı Çizelge 2.1 ve Resim 2.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmamızda kullanılan *Citrus* türlerinin ülkemizde kayıtlı olan herbaryum bilgileri

Tür adı	Kare	Toplandığı yer ve tarih	Kayıt Bilgileri	Herbaryum No	Kaynak
<i>C. aurantium</i> L.	C5	İçel, Erdemli, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, 06.04.1989	Sermin Çetiner	60215 (İST)!	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
<i>C. medica</i> L.	C6	Antakya	Turhan Baytop	7868 (İST)!	
<i>C. paradisi</i> Macfad.	C5	İçel, Erdemli, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, 06.04.1989	Sermin Çetiner	60214 (İST)!	

(!): Tarafımızdan incelenen herbaryum örnekleri



Resim 2.3. *Citrus* türlerinin Türkiye’deki yayılışı

2.2. *Citrus* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Halk arasında ve geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılışı

Citrus meyveleri, insan sağlığı ve gıdası açısından önemli olan ve küresel erişilebilirliği olan ürünlerdir (Y. Liu, Heying ve Tanumihardjo, 2012). Etnobotanik literatür taramasından elde edilen bilgiler, *Citrus* taksonlarının dünya çapında çok çeşitli geleneksel kullanıma sahip olduğunu göstermektedir. Asya ülkelerinde, özellikle Çin, Güney Kore, Hindistan, İran ve Pakistan’da, *Citrus* taksonlarının etnobotanik kullanımlarına ilişkin önemli raporlar bulunmaktadır.

Geleneksel Çin Tıbbında (TCM), yaygın olarak Iuzi olarak bilinen *C. maxima* (Burm.) Merr.’in meyve kabukları sindirimi teşvik etmek amacıyla, mukolitik ve ekspektoran olarak, yaprakları akut diyareye, tohumları ise kronik dizanteriye karşı kullanılmaktadır (Au ve diğerleri, 2008). Ayrıca, *Citrus* türlerinin birkaç türü Avrupa geleneksel tıbbında

kullanılmaktadır. Akdeniz bölgesinde yetiştirilen *Citrus* türlerinin antik ve ortaçağdaki kullanımları Çizelge 2.2’de özetlenmiştir (Arias ve Ramón-Laca, 2005).

Çizelge 2.2. Çalışmamızda kullandığımız *Citrus* türlerinin antik ve orta çağdaki kullanımları

Tür adı	Kullanılan kısım ve amacı
<i>C. aurantium</i> L.	▪ Çiçek (distilasyon): Kardiyotonik, sindirime yardımcı ▪ Çiçek (bal veya şekerle karıştırılarak): Kardiyotonik ▪ Meyve kabuğu: Sindirime yardımcı ▪ Pulpa: Sarılıkta tedaviye yardımcı ▪ Korteks: İnsektisit
<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	▪ Pulpa: İştah açıcı, kardiyotonik, sindirime yardımcı
<i>C. medica</i> L.	▪ Yaprak: Sindirime yardımcı, insektisit ▪ Meyve: Antiemetik, sindirime yardımcı, insektisit ▪ Meyve kabuğu: Sindirime yardımcı ▪ Meyve kabuğu şurubu: Diüretik ▪ Çiçek ve kabuktan elde edilen uçucu yağ: Sindirime yardımcı ▪ Pulpa: Pulmoner sedatif ▪ Tohum: Antiemetik, sindirime yardımcı, pulmoner sedatif, pürgatif

C. paradisi Macfad ile ilgili kullanım bilgisine rastlanılmamıştır.

Brezilya topluluklarındaki etnofarmakolojik çalışmalarda, *C. aurantium* meyve kabuklarının, çiçeklerinin ve yapraklarının uykusuzluk, anksiyete ve histeri gibi merkezi sinir sistemi bozukluklarının tedavisinde kullanıldığı kayıtlıdır (de Moraes Pultrini, Galindo ve Costa, 2006; Silva, Dreveck ve Zeni, 2009). Başka bir etnofarmakolojik araştırmada, *C. aurantium*’un yapraklarından hazırlanan çayın mide kramplarını ve kabızlığı gidermek, mide asiditesini dengelemek ve ateşi hafifletmek amacıyla, tohumlardan hazırlanan çayın, kan şekerini kontrol etmek amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Flavia Cristina Fernandes Pimenta, Cunha-Tavares, ve diğerleri, 2017). *C. aurantium*’un Haiti’de dahilen antipiretik, anti-epileptik ve antiromatizmal amaçla kullanıldığı; soğuk algınlığına karşı, sindirim sistemi hastalıklarında, safra kesesi ve karaciğer rahatsızlıklarında ve haricen cilt lekelerine karşı kullanm kaydı bulunmaktadır (Paul ve Cox, 1995). Meksika’da bitkinin yapraklı sürgünleri dahilen kusma ve mide ağrısına karşı kullanılmaktadır (Encarnacion Dimayuga, Virgen ve Ochoa, 1998). Sudan’da kurutulmuş bitkilerin sıcak sulu ekstresi dahilen sıtma tedavisi için kullanılmaktadır. Hindistan’da tüm bitkinin sıcak sulu ekstresinin dahilen menorajiye karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Karthikeyan ve Karthikeyan, 2014).

Ülkemizde ise İzmir yöresinde *C. medica*'nın taze meyve kabuklarının ağız kokusunun önlenmesinde ve skorbüt hastalığının tedavisinde ve kuru meyvelerinin laksatif amaçla kullanıldığı bildirilmiştir (Ugulu, Baslar, Yorek ve Dogan, 2009).

Çizelge 2.3.'de özetlendiği üzere, *Citrus* türlerinin farklı ülkelerde solunum problemlerine, sindirim rahatsızlıklarına ve cilt hastalıklarına karşı yaygın olarak kullanıldığı; bu türlerin anti-hipertansif, antipiretik, anti-diyabetik, sedatif ve kardiyotonik etkilerinden yararlanıldığı görünmektedir.



Çizelge 2.3. Çalışmamızda kullanılan *Citrus* türlerinin halk arasında ve geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılışı

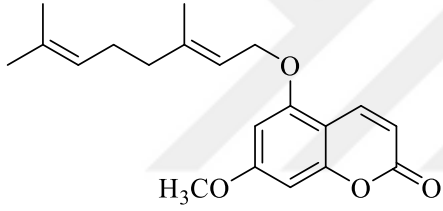
Tür adı	Ülke/Lokalite	Yerel isim	Kullanılış amacı	Kullanılan kısım	Kaynak
<i>C. aurantium</i> L.	Afganistan	Narenj	Gastrointestinal hastalıkların tedavisinde	Meyve kabuğu (toz kabuk)	(Amini ve Hamdam, 2017)
	İran/Meşhed	Bahar Naranj	Anti-stres, kardiyotonik, sindirime yardımcı ve anti-hipertansif amaçla	Çiçek	(Amiri ve Joharchi, 2013)
	Madagaskar/ Farafagana	Voasary makirana	Antitüsif amaçla ve sıtmaya karşı	Meyve	(Razafindraibe ve diğerleri, 2013)
	Türkiye/Edremit	Turunç	Baş ağrısına karşı	Meyve (dekoksasyon)	(Polat ve Satıl, 2012)
<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Bangladeş	Jhambura	Cilt hastalıklarına (uyuz, egzama, kaşıntı) karşı	Meyve (meyve suyu)	(Rahmatullah ve diğerleri, 2009)
	Brezilya	Laranjeira	Sedatif ve sindirime yardımcı	Meyve ve yaprak (infüzyon veya şarap içerisinde maserasyon)	(Agra, Silva, Basílio, Freitas ve Barbosa-Filho, 2008)
			Sedatif	Çiçek (infüzyon)	
	İspanya	Pomelo	İştah açıcı, sindirime yardımcı ve kardiyotonik	Meyve (meyve kabuğu)	(Arias ve Ramón-Laca, 2005)
	Meksika/Tlanchinol	Limón	Antipiretik, antitüsif, sedatif amaçla; grip ve sivrisinek ısırığına karşı	Meyve (meyve suyu), yaprak (infüzyon)	(Andrade-Cetto, 2009)
<i>C. medica</i> L.	Kamerun	Lamassi (Bangangte)	Lenfödem, böbrek iltihabı ve romatizmaya karşı	Meyve	(Kayani ve diğerleri, 2014)
	Gine	Cathiou	Sıtmaya karşı	Yaprak	(Traore ve diğerleri, 2013)
	İspanya	Citron	- Meyve (anti-emetik, antitoksik, insektisit, vebaya karşı, sindirime yardımcı) - Meyve kabuğu (sindirime yardımcı) - Meyve kabuğundan şurup (antitoksik ve idrar söktürücü) - Yaprak (sindirime yardımcı, insektisit).	Meyve (meyve kabuğu), yaprak (infüzyon)	(Arias ve Ramón-Laca, 2005)
	Nijerya/Odeda, Abeokuta Güney ve Sagamu Yerel Yönetim Bölgeleri	Osan were	Sıtmaya karşı	Meyve, yaprak	(Idowu, Soniran, Ajana ve Aworinde, 2010)
<i>C. paradisi</i> Macfad.	Almanya/Köln	Greyfurt	Antidiyabetik amaçla	Meyve (mezokarp-taze) Dekoksasyon (bazen yabani kekik ile birlikte)	(Pieroni, Muenz, Akbulut, Başer ve Durmuşkahya, 2005)

2.2.2. *C. aurantium* L. üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar

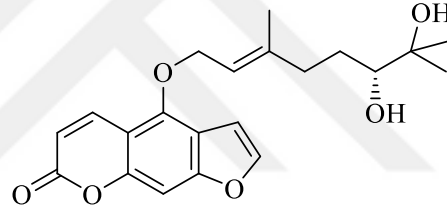
Citrus türleri, biyoaktif ve besinsel değeri yüksek bileşiklerinin zenginliği nedeniyle dünya çapında popülerdir. *Citrus* türleri, başta fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler ve kumarinler), terpenoidler (monoterpenler, limonoidler ve karotenoidler) ve pektin olmak üzere çeşitli biyoaktif bileşiklerin kaynağıdır. Ayrıca *Citrus* türleri askorbik asit (C vitamini), tokoferoller ve tokotrienoller (E vitamini) ve mineraller (selenyum, çinko, bakır, demir ve manganez) açısından da zengindir (Saini ve diğerleri, 2022). *Citrus* türlerinin kabukları üzerine yapılan çalışmalarda, kabukların başlıca uçucu yağ, kumarinler, flavonoidler, limonoidler ve karotenoidler bakımından zengin olduğu gösterilmiştir (Rafiq ve diğerleri, 2018).

C. aurantium'da bulunan başlıca biyoaktif bileşikler flavonoidler ve kumarinlerdir. Limonin ve nomilin gibi limonoidler ve *p*-sinefrin gibi alkaloidlere de rastlanmaktadır. *C. aurantium*'un meyve suyu, çiçek, tohum, yaprak ve meyve kabuğu gibi kısımları farklı biyoaktif bileşikler içermektedir. Kalitatif ve kantitatif fitokimyasal bileşiminin, *C. aurantium*'un yetiştiği coğrafi bölgeden, yetiştirme mevsiminden ve hasat döneminden belirgin bir şekilde etkilendiği rapor edilmiştir (Suntar, Khan, Patel, Celano ve Rastrelli, 2018). *C. aurantium* üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar, madde gruplarına göre sınıflandırılmış ve en önemli biyoaktif bileşenler kumarinler (Şekil 2.1 ve Çizelge 2.4); flavonoidler (Şekil 2.2 ve Çizelge 2.5); ve terpenoidler (Çizelge 2.6) ve diğer bileşikler olmak üzere sunulmuştur.

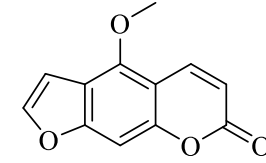
Kumarinler



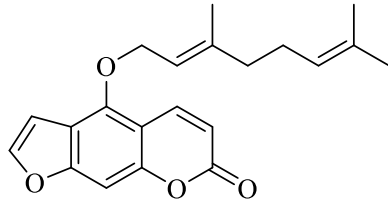
5-Geraniyl-7-metoksikumarin



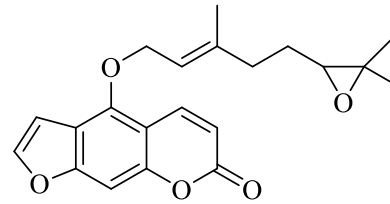
6' 7'-Dihidroksibergamottin



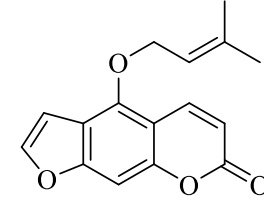
Bergapten



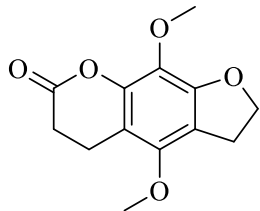
Bergamottin



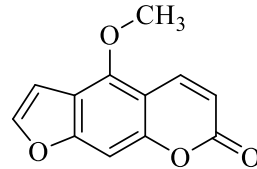
Epoksibergamottin



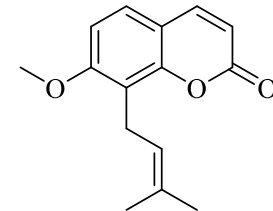
İzoimperatorin



İzopimpinellin



Oksipösedanin



Ostol

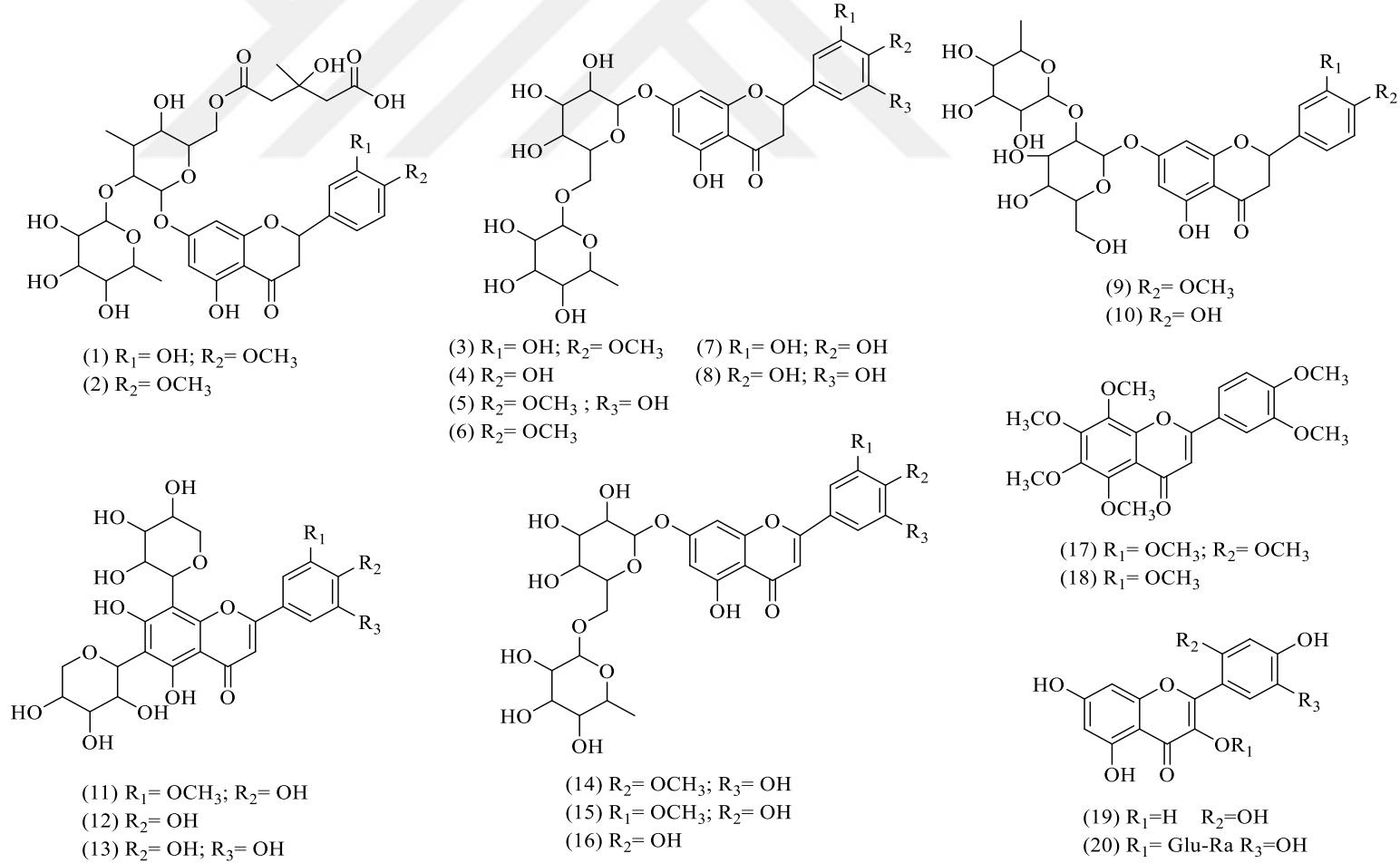
Şekil 2.1. *C. aurantium* meyvelerinde bulunan kumarinler

Çizelge 2.4. *C. aurantium* meyvelerinde bulunan kumarinler

Bileşiğin adı	Kullanılan kısım	Ekstre tipi	Kaynak
6' 7'-Dihidroksibergamottin	Meyve kabuğu ve pulpa	Metanol	(Dugrand-Judek ve diğerleri, 2015)
	Meyve kabuğu	Etanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
(-)-8-[(S)-2,3-Dihidroksi-3-metilbutil]-7-metoksi-2H-1-benzopiran-2-on	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
5-Geranioksi-7-metoksikumarin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Auraptin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Bergamottin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Bergaptin	Tüm taze meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
Epoksibergamottin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
İzoimperatorin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
İzopimpinellin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Meranzin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Oksipösedanin	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Ostol	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
Skoparon	Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Y. H. Hu ve diğerleri, 2020)

Flavonoitler

18



Şekil 2.2. *C. aurantium* meyvelerinde bulunan flavonoitler

Çizelge 2.5. *C. aurantium* meyvelerinde bulunan flavonoidler

Bileşiğin adı	Bileşiğin türü	Kullanılan kısım	Ekstre tipi	Kaynak
(1) Brutieridin	Flavanon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
(2) Melitidin	Flavanon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
(3) Hesperidin	Flavanon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Y. H. Hu ve diğerleri, 2020)
		Meyve kabuğu	Metanol	(Guihua Xu, Ye, Chen ve Liu, 2007)
		Meyve kabuğu	Metanol	(Ana ve diğerleri, 2018)
(4) Narirutin	Flavanon	Meyve suyu	-	(Fang, Wu, Jiang ve Mao, 2018)
		Meyve kabuğu	Metanol	(X. Zhou, Wang, Ma, Xu ve Liu, 2021)
		Tüm meyve	%80 Aseton	Xu et al. (2007)
(5) Neohesperidin	Flavanon	Meyve suyu	-	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Meyve kabuğu ve meyve suyu	Etanol	Zhou et al. (2021)
		Meyve kabuğu	Metanol	Zhang et al. (2012)
		Tüm meyve	%80 Aseton	Xu et al. (2007)
		Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(Ana ve diğerleri, 2018)
(6) Didimin	Flavanon	Meyve suyu	-	(Wen ve diğerleri, 2021)
(7) Eriyositrin	Flavanon	Meyve suyu	-	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
		Tüm meyve	%80 Aseton	(X. Zhou ve diğerleri, 2021)
(8) Neoeriyositrin	Flavanon	Tüm meyve	%80 Aseton	Zhou et al. (2021)
(9) Ponsirin	Flavanon	Meyve kabuğu	Metanol	(Wen ve diğerleri, 2021)
(10) Naringin	Flavanon	Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Meyve kabuğu ve meyve suyu	Etanol	(Fang ve diğerleri, 2018)
		Meyve kabuğu	Etanol	(Ana ve diğerleri, 2018)
		Tüm meyve	%80 Aseton	(Y. H. Hu ve diğerleri, 2020)
		Tüm meyve	%80 Aseton	(J. Zhang ve diğerleri, 2012)
		Tüm meyve	%80 Aseton	(Guihua Xu ve diğerleri, 2007)
(11) Krizoriol 6,8-di-C-glukozit	Flavon	Olgunlaşmamış kuru meyve	Etanol	(Wen ve diğerleri, 2021)

Çizelge 2.5. (devam) *C. aurantium* meyvelerinde bulunan flavonoidler

Bileşiğin adı	Bileşiğin türü	Kullanılan kısım	Ekstre tipi	Kaynak
(12) Apigenin 6,8-di-C-glukozit	Flavon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
(13) Luteolin 6,8-di-C-glukozit	Flavon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Tüm meyve	%80 Aseton	(J. Feng ve diğerleri, 2020)
(14) Diosmin	Flavon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Meyve kabuğu	Etanol	(Ana ve diğerleri, 2018)
(15) Neodiosmin	Flavon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
(16) Roifolin	Flavon	Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Wen ve diğerleri, 2021)
(17) Nobiletin	Flavon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Tüm meyve	%80 Aseton	(Y. H. Hu ve diğerleri, 2020)
(18) Tangeretin	Flavon	Tüm meyve	%80 Aseton	(Wen ve diğerleri, 2021)
		Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Y. H. Hu ve diğerleri, 2020)
(19) Morin	Flavonol	Meyve kabuğu	Etanol	(Ana ve diğerleri, 2018)
(20) Rutin	Flavonol	Meyve kabuğu	Etanol	(Ana ve diğerleri, 2018)

Çizelge 2.6. *C. aurantium* meyvelerinde bulunan terpenoitler

Bileşiğin adı	Bileşiğin Türü	Kullanılan kısım	Ekstre tipi	Kaynak
α -Fellandren	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
α -Pinen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
α -Terpinen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
α -Tuyen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
β -Karyofillen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
β -Mirsen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
β -Pinen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
γ -Terpinen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Geranial	Monoterpen	Meyve kabuğu, Meyve suyu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Geranial asetat	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Limonen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Linalil asetat	Monoterpen	Meyve kabuğu, Meyve suyu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Linalol	Monoterpen	Meyve kabuğu, Meyve suyu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Mirsen	Monoterpen	Meyve kabuğu, Meyve suyu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Neral	Monoterpen	Meyve kabuğu, Meyve suyu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Sabinen	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Ana ve diğerleri, 2018; M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Sitronellal	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Sitronellol asetat	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Sabinene	Monoterpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Germakren B	Seskitерpen	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)

Çizelge 2.6. (devam) *C. aurantium* meyvelerinde bulunan terpenoitler

Bileşiğin adı	Bileşiğin Türü	Kullanılan kısım	Ekstre tipi	Kaynak
Notkaton	Seskiterpen	Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Y. H. Hu ve diğerleri, 2020)
		Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
β -Sitaurin	Triterpenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan, Wang, Wang ve Xu, 2020)
Obakunoik asit 17- β -D-glukopiranozit	Limonoit	Tüm meyve	Metanol	(Duan, Guo, Liu, Liu ve Li, 2014; Wen ve diğerleri, 2021)
Deasetilnomilin	Limonoit	Tüm meyve	Metanol	(Duan ve diğerleri, 2014; Wen ve diğerleri, 2021)
Limonin	Limonoit	Kuru meyve kabuğu	Etanol	(Duan ve diğerleri, 2014; Y. H. Hu ve diğerleri, 2020; Wen ve diğerleri, 2021)
Nomilin	Limonoit	Olgunlaşmamış kuru meyve	Metanol	(Duan ve diğerleri, 2014; J. Feng ve diğerleri, 2020; Wen ve diğerleri, 2021)
α -Karoten	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
β -Karoten	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
β -Kriptoksantin	Karotenoit	Meyve kabuğu	Diklorometan	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
ζ - Karoten	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
9-cis-Violaksantin	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
Fitoen	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Pulpa	Hekzan/Aseton/ Etanol	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Fitofluen	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Pulpa	Hekzan/Aseton/ Etanol	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Lutein	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)

Çizelge 2.6. (devam) *C. aurantium* meyvelerinde bulunan terpenoitler

Bileşiğin adı	Bileşiğin Türü	Kullanılan kısım	Ekstre tipi	Kaynak
Luteoksantin	Karotenoit	Meyve kabuğu	Diklorometan	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Violaksantin	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Pulpa	Hekzan/Aseton/Etanol	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)
Zeaksantin	Karotenoit	Meyve kabuğu	Kloroform	(Luan ve diğerleri, 2020)
		Meyve kabuğu, meyve suyu	Hekzan/Aseton/Etanol	(M. Zhang ve diğerleri, 2019)

Diğer bileşikler

Yukarıda bahsedilen metabolitler dışında *C. aurantium* meyve kabuğunda organik asitler (*p*-kumarik, kafeik asit, ferulik asit, vanilik asit, *p*-hidroksibenzoik, klorojenik, sinapik, karbamik asit, sikloheksanasetik asit, malik asit, kinik asit, şikimik asit, 2-ketoglutarik asit, 4-aminobütanoik asit, palmitik asit) (Guihua Xu ve diğerleri, 2007; M. Zhang ve diğerleri, 2019), şekerler (sakaroz, arabinoz, turanoz, mannoz, galaktoz, fukoz, fruktoz, *d*-psikoz, myo-inozitol, ksiloz) ve alkaloid (*p*-sinefrin) bulunmaktadır (Stohs, Preuss ve Shara, 2012).

2.2.3. *C. aurantium* L. üzerinde yapılan aktivite çalışmaları

Antidiyabetik aktivite

C. aurantium L. meyve kabuğundan elde edilen farklı ekstraların (sikloheksan, kloroform, etil asetat, aseton ve etanol-su) α -amilaz ve α -glukozidaz üzerinde inhibitör etkileri olduğu görülmüştür. Benayad ve diğerlerinin (2021) yaptığı *in vitro* antidiyabetik aktivite çalışmasında anılan ekstraların güçlü inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. 166 ve 332 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda yapılan deneylerde sikloheksan ve etil asetat ekstraları ile uçucu yağ, referans molekül olan akarbozdan daha düşük α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi gösterirken, etanol-su, aseton ve kloroform ekstraları akarbozdan daha güçlü inhibitör etki göstermiştir (Benayad ve diğerleri, 2021). Bir başka çalışmada, *C. aurantium*'dan izole edilen neohesperidin bileşiği, *in vivo* diyabet modeli oluşturulan KK-A^y farelerine uygulanmış ve bileşiğin farelerde açlık glikozunu, serum glikozunu ve glikozile serum proteinini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Neohesperidin, diyabetik farelerde oral

glikoz toleransı ve insülin duyarlılığını önemli ölçüde artırmış ve insülin direncini azaltmıştır. Ayrıca neohesperidin, KK-A^y farelerinde serum trigliseritlerini, toplam kolesterolü ve leptin seviyesini önemli ölçüde azaltmıştır. Neohesperidin karaciğerde lipid birikimini engellemiş ve KK-Ay farelerinde epididimal adipozit boyutunu azaltmıştır. Ayrıca, neohesperidin ile tedavi edilen farelerde hepatik aktifleştirilen protein kinaz (AMPK) fosforilasyon seviyesinde artış gözlenmiştir (Jia ve diğerleri, 2015).

C. aurantium ekstrelerinin diyabetik farelerde karaciğer antioksidan savunması üzerindeki etkinliği rapor edilmiştir. *C. aurantium* ekstreleri ile tedavi edilen deneysel diyabet modeli oluşturulan farelerde kan glikoz seviyesi, tedavi edilmeyen diyabetik farelere kıyasla önemli ölçüde düşmüştür. Diyabetik farelerin karaciğerinde glutatyon peroksidaz, malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) aktiviteleri önemli ölçüde azalırken, süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri artmıştır. Bu çalışmada, *C. aurantium* ekstresinin karaciğer antioksidan aktivitesini arttırdığı tespit edilmiş ve karaciğer hasarlarını azaltmada da etkili olduğu histolojik analizlerle ortaya konulmuştur (Jiao, Huang, Wang ve Yu, 2007). Başka bir çalışmada, *C. aurantium* flavonoidlerinin 3T3-L1 hücrelerinde glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) fosforilasyonunu ve Protein Kinaz B (AKT) aktivasyonunu önleyerek insülin sinyal kaskadını modüle ettiği bildirilmiştir (G.-S. Kim ve diğerleri, 2012).

Antiobezite etkisi

Termojenez ve adipogenezi kontrol etmedeki rolü nedeniyle, *C. aurantium* obezite karşıtı ajan olarak kabul edilebilir. Protoalkaloit *p*-sinefrinin ve *C. aurantium* ekstrelerinin, iştah bastırıcı rolleri nedeniyle kilo kaybını teşvik etmek amacıyla gıda endüstrilerinde ve diyet takviyelerinde tanımlanmış dozlarda güvenle kullanılabileceği bildirilmiştir (Stohs, 2017; Stohs, Preuss ve Shara, 2011). Bir çalışmada, *C. aurantium*'un iki ana bileşeni olan naringin ve neohesperidin'in obezite karşıtı etkilerinin altında yatan mekanizma araştırılmıştır. Yüksek yağlı diyetle indüklenen obezite modelinde, C57BL/6 farelerine sekiz hafta boyunca *C. aurantium* ekstresi verilmiş ve farelerin yağ dokusu, vücut ağırlığı ve toplam serum kolesterolü ölçülmüştür. *C. aurantium* ekstresinin bahsi geçen parametrelerde önemli bir düşüş sağladığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, *C. aurantium* ile muamele edilen 3T3-L1 adipozitlerinde lipid damlacıklarında azalma kaydedilmiştir ve *in vitro* çalışmalar bu sonuçları doğrulamıştır. *C. aurantium* uygulanan primer kahverengi adipozitlerde daha büyük bir farklılaşma ve peroksizom proliferatör aktivasyonlu reseptör (PPAR) koaktivatör

1 alfa ve protein 1 termojenik faktörlerin ayrılmasında bir artış gözlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca AMP ile AMPK baskılanmasının *C. aurantium*'un adipozitlerdeki etkilerini engellediğini gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar, *C. aurantium*'un anti-adipojenik ve termojenik bir ajan olarak etkisinin AMPK yolağına dayandığını göstermiştir (J. Park ve diğerleri, 2019). Diğer bir araştırmada, *C. aurantium* çiçeklerinden hazırlanan kloroform ekstrelerinin 3T3-L1 hücre farklılaşmasını inhibe ettiği ve lipid birikimini baskılayarak yüksek yağlı diyet ile obezite oluşturulan farelerde metabolik hastalıkları hafiflettiği belirlenmiştir (X.-Y. Li ve diğerleri, 2021). Başka bir araştırmada, *C. aurantium* meyve kabuklarından elde edilen *p*-sinefrin içeren ekstreler, kilo kaybını sağlamak amacıyla kafein gibi diğer bileşiklerle birlikte kullanılmıştır. Bu kombinasyonun hem hayvanlarda hem de insanlarda termojenezi ve lipolizi artırarak kilo kaybını sağlamada etkili olduğu kanıtlanmıştır (Peixoto ve diğerleri, 2012).

Anksiyolitik aktivite

Çalışmalar, *C. aurantium*'un merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinin, özellikle de anksiyolitik etkisinin araştırılmasına odaklanmıştır. Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda bu türün anksiyolitik etkisi gösterilmiştir. Örneğin, *C. aurantium* meyve kabuklarından elde edilen uçucu yağın, tek doz uygulamasının, sıçanlar üzerinde, yükseltilmiş artı labirentin açık kollarında kalma süresinde artış sağlayarak anksiyolitik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Carvalho-Freitas ve Costa, 2002). Ayrıca, yaygın anksiyete ve obsesif-kompulsif bozukluğun deneysel modellerinde anksiyolitik aktivite gözlenmiştir. Aynı zamanda, fareler 15 günlük ardışık tedaviden sonra bile herhangi bir motor bozulma belirtisi göstermemiştir (de Moraes Pultrini ve diğerleri, 2006). Leite ve diğerleri (2008) tarafından yürütülen bir çalışmada, 12 sıçan, yükseltilmiş artı labirent ve açık alan labirent testleri olmak üzere iki anksiyete modelinde değerlendirilmiştir. Sıçanların önceden *C. aurantium* uçucu yağını %1; 2,5 ve 5 konsantrasyonlarda akrilik bir kutuda 7 dakika boyunca solumaları sağlanmıştır. Her iki deney modelinde de hayvanların duygusal reaktivitesinde bir azalma gözlenmiş ve bu da olası bir merkezi etkiye işaret etmiştir (Leite ve diğerleri, 2008).

Başka bir çalışmada, *C. aurantium*'un serotonin reseptörlerinin bir alt tipi olan serotonin 1A (5-HT_{1A}) reseptörünün anksiyolitik aktivitesine dahil olmak suretiyle merkezi sinir sistemini etkilediği ortaya konulmuştur (Costa ve diğerleri, 2013). *C. aurantium*'un

anksiyolitik etkisini test eden klinik çalışmalar da tatmin edici sonuçlar ortaya koymuştur. Klinik bir araştırmada, ameliyattan 2 saat öncesinde oral premedikasyon olarak *C. aurantium* çiçeği distilatı (1 mL/kg) verilmiş, ardından anksiyete değerlendirmesi için STAI ölçeği kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, deney grubundaki hastaların ameliyat öncesi anksiyetelerinde azalma tespit edilmiştir (Akhlaghi ve diğerleri, 2011). Başka bir çalışmada, kronik miyeloit lösemili hastalar, medüller materyal toplama prosedüründen önce *C. aurantium* uçucu yağını inhale etmişlerdir. Sonuçlar, bu müdahaleye tabi tutulan hastaların anksiyete seviyelerinde azalma olduğunu ve prosedür sırasında rahat hissettiklerini göstermiştir. Buna ek olarak, *C. aurantium* uçucu yağı, tek bir dozda bile, pozitif kontrol olarak kullanılan anksiyolitik ilaç ile karşılaştırılabilir bir aktivite göstermiştir (Flávia Cristina Fernandes Pimenta ve diğerleri, 2016).

Bir başka çalışmada, 18-35 yaşındaki ilk kez çocuk doğuracak kadınlara doğum sırasında *C. aurantium* yağı ile aromaterapi uygulanmış ve sonuçlar bu kadınların doğum sırasındaki anksiyetelerinde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. İlk kez çocuk doğuracak olan 126 kadın üzerinde yapılan bir başka klinik çalışmada, *C. aurantium* uçucu yağının doğumun ilk aşamasındaki ağrı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hastalara her 30 dakikada bir gazlı bezlere batırılmış distile su içinde 4 mL *C. aurantium* inhale etmeleri amacıyla verilmiştir. Sonuçlar, bu işleme tabi tutulan kadınlarda ağrının hafıflediğini göstermiştir. *C. aurantium* kullanılarak yapılan aromaterapinin tatmin edici olup olmadığı sorulduğunda, katılımcıların %88,1'i uygulanan yöntemden memnun olduklarını ve %92,1'i gelecekteki işlemlerde bu yöntemi kullanacaklarını söylemiştir. Bu çalışmalar, *C. aurantium* ile aromaterapinin hamile kadınlar için faydalı olabilecek basit, ucuz ve noninvaziv bir müdahale olduğunu göstermiştir (Seraj, Nourani, Mokhber ve Shakeri, 2014).

Anti-enflamatuvar aktivite

C. aurantium bileşenlerinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri dışındaki diğer olası etkilerini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar *C. aurantium*'dan nobiletin, naringin ve hesperidin gibi flavonoidleri izole etmiş ve bunların sıçan hücreleri üzerindeki anti-enflamatuvar etkilerini *in vitro* olarak değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, izole edilen flavonoidlerin anti-enflamatuvar etkisini doğrulayan pro-enflamatuvar araçların baskılandığını göstermiştir (S. R. Kang ve diğerleri, 2011). *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın, NO, interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü-

α (TNF- α) ve interlökin-1 β (IL-1 β) üretimini ve bu sitokinlerin gen ekspresyon düzeylerini inhibe ederek anti-enflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir. Uçucu yağın enflamasyonla ilişkili hastalıkların tedavisi için fonksiyonel bir gıda olarak geliştirilme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Shen, Jiang, Zhu ve Ou-Yang, 2017). Hamedi ve diğerlerinin (2019), *C. aurantium* tohum yağının sıçanlarda olası anti-enflamatuvar ve antinosiseptif aktivitelerini formalin-nedenli pençe yalama, ödem ve miyeloperoksidaz aktivitesi üzerinden değerlendirilmiştir. Tohum yağı, formalin testinin birinci ve ikinci aşamalarında anti-enflamatuvar etki göstermiştir ancak miyeloperoksidaz aktivitesi üzerinde etkili bulunmamıştır (Hamedi ve diğerleri, 2019). Diğer bir çalışmada araştırmacılar *C. aurantium* meyve kabuğu uçucu yağının (pEOCa) kimyasal bileşimini analiz etmiş bunun yanı sıra anti-enflamatuvar aktivitesini *in vivo* olarak değerlendirmiştir. Sonuçlar, pEOCa'nın ana bileşenlerinin limonen ve linalool olduğunu göstermiştir. Uçucu yağ, lipopolisakkarit ile muamele edilen RAW264,7 makrofajları tarafından NO üretimini konsantrasyona bağlı olarak azaltmıştır. Bu inhibisyon transkripsiyonel düzeyde gerçekleşmiştir. pEOCa, karbon tetraklorür uygulanan sıçanlarda, hepatik oksidatif stres biyobelirteçleri düzeyleri, plazma biyokimyasal parametreleri ve deoksiribonükleik asit (DNA) molekülü yönündeki iyileşme ile izlendiği üzere hepatotoksisiteyi azaltmıştır. pEOCa ile tedavinin karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer hasarını önlediği ve böylece serbest radikallerin zararlı etkilerini engellediği açıkça görülmektedir (Ben Hsouna ve diğerleri, 2019).

Kardiyovasküler aktivite

C. aurantium'un kardiyovasküler etkisinin değerlendirildiği çalışmalar sınırlıdır. *C. aurantium*'un kardiyovasküler etkilerinin araştırıldığı preklinik bir çalışmada, dişi Sprague-Dawley sıçanlara 28 gün boyunca her gün gavaj yoluyla biri %6, diğeri ise %95 oranında sinefrin içeren iki farklı dozda (10 veya 50 mg/kg) ekstre uygulanmıştır. Ayrıca, birçok besin takviyesi kafein de içerdiğinden, bu dozlara kafein de eklenmiştir. Sinefrin, *C. aurantium* ekstresi içinde, ya da saf sinefrin olarak, kalp atış hızını ve kan basıncını artırmıştır. %95 sinefrin uygulanan hayvanlarda kalp hızı ve kan basıncı minimal düzeyde etkilenmiştir. *C. aurantium* ekstresi ile daha kuvvetli etkiler göstermiş, bu da ekstre içindeki diğer bileşenlerin bu fizyolojik parametreleri değiştirebileceğini düşündürmüştür (Hansen ve diğerleri, 2012).

C. aurantium takviyesinin bir submaksimal aerobik egzersiz seansını takiben kardiyorespiratuvar ve otonomik parametrelerin iyileşmesi üzerindeki etkisinin

değerlendirildiği on iki sağlıklı erkek yetişkin üzerinde yapılan çapraz, randomize, çift kör ve plasebo kontrollü bir klinik çalışmada, *C. aurantium* (600 mg, %30 oranında *p*-sinefrin (180 mg)) veya plasebo (600 mg nişasta) gönüllülere randomize günlerde, değerlendirmeden 90 dakika önce oral yolla verilmiştir. Sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı, nabız basıncı, ortalama arter basıncı, kalp atım hızı (KAH) ve KAH değişkenlik indeksleri istirahat ve egzersizden sonra 60 dakika boyunca değerlendirilmiştir. *C. aurantium* alımı, egzersiz sonrası sistolik kan basıncını azaltmış, yüksek frekans indeksi, pNN50 (%) ve parasempatik modülasyon indeksleri aracılığıyla egzersiz sonrası kalbin vagal modülasyonunu düzenlemiştir. KAH, diyastolik kan basıncı, nabız basıncı ve ortalama arter basıncı parametreleri için olumsuz kardiyovasküler etkiler elde edilmemiştir. *C. aurantium*'un sağlıklı erkeklerde submaksimal aerobik egzersizin yanı sıra kardiyovasküler ve otonomik sistemler için güvenli olduğu gösterilmiştir (Benjamim ve diğerleri, 2022).

Antimikrobiyal aktivite

Citrus meyve ekstreleri doğal antimikrobiyal etki gösterdiğinden, gıdalarda antimikrobiyal amaçla kullanılmaktadır (Hindi ve Chabuck, 2013). *C. aurantium* yapraklarının su, etanol ve kloroform ekstreleri gram-pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*) ve gram-negatif bakterilere (*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonia*) karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Gopal, 2012). *C. aurantium* meyve suyunun iki bakteriyel izolat (*Listeria monocytogenes* ve *Salmonella typhimurium*) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Test edilen mikroorganizmaların pH'sı nötralize edilmiş meyve suyunda sadece iki gün hayatta kalabildikleri; yedi günlük inkübasyondan sonra büyüyemedikleri gösterilmiştir (Karabıyıklı, Değirmenci ve Karapınar, 2014). Cezayir'de yetiştirilen on *Citrus* türünün meyve suyu ve yaprak ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri agar well difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. *C. aurantium* meyve suyunun, test edilen tüm gram-pozitif (*S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis* ve *S. epidermidis*) ve gram-negatif bakterilere (*Klebsiella*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*) karşı yaprak ekstrelerinden daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilediği bildirilmiştir. *C. aurantium* ve *C. limon* en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösterirken, bunları *C. paradisi* ve *C. reticulata* izlemiştir. Elde edilen bulgulara göre, mikroorganizmaların duyarlılık derecelerindeki farklılıklar, içsel toleranslarına ve ekstrelerde bulunan bileşiklerin yapılarına bağlanmıştır (Haraoui, Allem, Chaouche ve Belouazni, 2020).

Ayrıca, *C. aurantium*'un yapraklarından, ağaç dallarından ve dal kabuklarından elde edilen uçucu yağların (5, 10, 15, 20 ve 25 µL) antibakteriyel etkileri üç patojen bakteri olan *Agrobacterium tumefaciens*, *Dickeya solani* ve *Erwinia amylovora*'ya karşı değerlendirilmiştir. 25 µL uygulandığında, dallardan elde edilen uçucu yağ *A. tumefaciens*'e karşı en yüksek aktiviteyi göstermiş (inhibisyon zon çapı: 17,66 mm), yapraklardan elde edilen uçucu yağlar *D. solani* ve *E. amylovora*'ya karşı 17,33 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Araştırmacılar *C. aurantium*'un çeşitli kısımlarından elde edilen uçucu yağın potansiyel antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu sonucuna varmıştır (Okla ve diğerleri, 2019). Başka bir çalışmada, *C. aurantium* uçucu yağlarının antibiyofilm aktivitesi *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium crustosum*, *P. expansum* ve *P. citrinum*'a karşı araştırılmış ve inhibisyon zonlarının yaklaşık 8 ila 18 mm arasında olduğu belirlenmiştir (Kačániová ve diğerleri, 2020). Son olarak, *C. aurantium* çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın *Streptococcus mutans* ve insan diş eti epitel hücreleriyle etkileşimi değerlendirilmiştir. *Streptococcus mutans*'ın büyümesini azaltmış ve virülans genlerinin (*comC*, *comD*, *comE*, *gtfB*, *gtfC* ve *gbpB*) mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyonunu düşürmüştür. *C. aurantium* uçucu yağının oral enfeksiyonları önlemek veya kontrol etmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (Benzaid, Belmadani, Tichati, Djeribi ve Rouabhia, 2021).

Antioksidan aktivite

C. aurantium, doğal antioksidanların önemli bir kaynağıdır. *C. aurantium* yaprak ekstreleri, kararlı radikal olan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazile (DPPH) karşı en yüksek antiradikal aktiviteyi (%92,5) göstermiştir. Ayrıca, β-karoten ağartma yöntemi kullanılarak diğer *Citrus* türlerine kıyasla β-karoten ve linoleik asitin oksidasyon seviyesini (%77) azaltma etkisinin olduğu ortaya konulmuştur (Lagha-Benamrouche ve Madani, 2013). Farklı *Citrus* türlerinin (*C. aurantium*, *C. clementina*, *C. aurantiifolia*, *C. hamlin*, *C. limon*, *C. grandis* ve *C. navel*) antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, *C. aurantium*'un metanollü ekstresinin demir indirgeme antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu bulunmuştur (Khettal ve diğerleri, 2017). Başka bir çalışmada, *C. aurantium*'un meyve kabuğu ekstresinin toplam antioksidan aktivitesinin pulpa ekstresinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu etki, meyve kabuğunun fitokimyasal içeriğinin fenolik asitler ve türevleri bakımından daha zengin olmasına bağlanmıştır. Metanollü meyve kabuğu ekstresi sulu kabuk ekstresine göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Buna karşılık, en yüksek antioksidan

kapasiteye sahip olan ekstrenin sulu pulpa ekstresi olduğu bildirilmiştir (Divya, Jamuna ve Jyothi, 2016).

Karoi ve Marzouk'un yaptığı bir *in vitro* çalışmada, *C. aurantium*'un meyve kabuğunun metanollü ekstresi ile meyve suyunun antioksidan aktiviteleri standart antioksidanlar olan bütül hidroksi anisol, bütül hidroksi toluen ve askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. *C. aurantium*'un standartlardan daha az etkili bulunmasına rağmen doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği rapor edilmiştir (Jabri karoui ve Marzouk, 2013). Zhao ve diğerlerinin (2012) yaptığı çalışmada, *C. aurantium* var. *amara* çiçeklerinden elde edilen iki ana bileşik olan 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon (HTF) ve limoneksik asit (LA), *in vitro* antioksidan, anti-enflamatuvar, antiviral ve antitümör aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Feokromasitoma hücre hatları (PC12) hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisine maruz bırakıldıktan sonra 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenen hücre canlılığı belirgin şekilde azalmıştır, bu da PC12 hücrelerinin H_2O_2 kaynaklı hücre hasarına karşı çok hassas olduğunu göstermiştir. 12,5-200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında C vitaminin indirme gücü (RP) (ölçülen absorbans 0,237-0,953) ile karşılaştırıldığında, HTF ve LA'nın düşük bir RP (ölçülen absorbans 0,205-0,412) sergilediği ve 25 ila 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda RP'de neredeyse hiç artış olmadığı belirlenmiştir. İki bileşiğin DPPH için en yüksek radikal süpürme oranının sadece %20-30 olduğu, en yüksek radikal süpürme oranının ise 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %90'ın üzerine ulaşan C vitamininden çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, iki bileşenin RP ve DPPH'ı temizlemede kayda değer bir etkisi olmadığını göstermiştir. SOD ve MDA seviyeleri hücre hasarının derecesi ile ilişkilendirilmiştir. HTF ve LA, MDA üretim seviyelerini azaltarak ve SOD seviyelerini artırarak H_2O_2 toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir. PC12 hücreleri 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda LA ile ön işleme tabi tutulduktan sonra, SOD aktivitesinin inhibisyon oranı %60'ın üzerinde bir azalmaya ulaşırken, kontrol C vitaminin inhibisyon oranı 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %55,6 olmuştur. PC12 hücreleri H_2O_2 ile indüklenmeden önce ön işleme tabi tutulduğunda LA, SOD aktivitesi üzerinde önemli bir koruyucu etki göstermiştir. PC12 hücreleri HTF ve LA ile inkübe edildiğinde, H_2O_2 ile indüklenen hücrelerin MDA aktivitesindeki artış durdurulmuştur. HTF'nin C vitamini ve LA'ya göre MDA aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi olmamıştır. Sonuç olarak, *C. aurantium* var. *amara*'dan elde edilen HTF ve LA'nın ilaç endüstrilerinde umut verici doğal ajanlar olabileceği öne sürülmüştür (Zhao, Yang, Wei, Huang ve Jiang, 2012). *C. aurantium* meyvesinin çeşitli kısımlarından hazırlanan ekstraktların farklı *in vitro*

deneylerle antioksidan etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, metanollü ve sulu ekstrelerin antioksidan etkileri nispeten daha etkili bulunmuştur. Ekstrelerin toplam fenol içeriği sırasıyla meyvenin yenen kısmı için 2,5-22,5 mg/g ve kabuk kısmı için 5-45 mg/g aralığında bulunmuştur. Meyve bileşenleri radikal süpürücü etki göstermiş ve lipid peroksidasyonunu önlemede etkili bulunmuştur. Regresyon analizi, toplam fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Divya ve diğerleri, 2016).

Antikanser aktivite

C. aurantium'dan elde edilen polisakkaritlerin insan meme adenokarsinoma (MCF-7) ve insan akciğer kanseri (HCC827) hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, *C. aurantium* var. *amara* polisakkaritlerinin, RAW264.7 hücrelerinde TNF- α ve IL-6 üretimini uyardığını ve indüklenebilir NO sentaz (iNOS), TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın mRNA ekspresyon seviyelerini artırdığını göstermiştir. Bulgular, *C. aurantium* var. *amara* polisakkaritlerinin, bağışıklık sistemini uyararak antikanser aktivite sergilediğini göstermektedir. Ayrıca, *C. aurantium* var. *amara* polisakkaritleri ile muamele edilen RAW264.7 hücrelerinde fosforile hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), fosforile c-Jun N-terminal kinaz (JNK), fosforile p38 ve fosforile p65 düzeyleri önemli ölçüde artmıştır. Bu bulgular, *C. aurantium* var. *amara* polisakkaritlerinin, hücre proliferasyonunu ve apoptozunu etkileyerek kanser hücrelerini öldürmede etkili olabileceğini ortaya koymuştur (Shen, Yang, Jiang, Zheng ve Zhu, 2017). *C. aurantium*'dan izole edilen flavonoidler de murin akciğer hücrelerinde olası antikanser aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. *C. aurantium* flavonoidleri apoptoz ve hücre göçünün düzenlenmesi yoluyla antikanser etki göstermiştir (K.-I. Park ve diğerleri, 2014).

C. aurantium'un kabuklarının metanollü ekstresinin anti-proliferatif aktivitesinin ve apoptoz üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada metanollü ekstrenin U937 insan lösemi hücrelerinin büyümesini doz bağımlı olarak inhibe ettiği ve kaspaz-bağımlı apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. İlgili ekstrenin anti-apoptotik proteinler olan X'e bağlı apoptoz inhibitörü proteini (XIAP) ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin (Bcl-xL) ekspresyonunu inhibe ettiği, Akt aktivitesini doz bağımlı olarak inhibe ettiği ve apoptotik aktiviteyi Akt artışıyla önemli ölçüde zayıflattığı ortaya konulmuştur (Han ve diğerleri, 2012). Amalina ve Wahyuni, yaptıkları çalışmada, kitosan-*C. aurantium* kabuğu ekstresinin

nanopartiküllerinin (NPs-CA) insan meme kanseri hücre hatlarına (MDA-MB-231) karşı sitotoksik etkisini araştırmıştır. Sitotoksik etkiyi belirlemek için MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine MTT testi uygulanmıştır. Çeşitli test konsantrasyonlarında, NPs-CA'nın *C. aurantium* kabuklarından daha iyi sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu bulguların, kanser tedavisinde nanopartiküllerin geliştirilmesinin faydalı olabileceğini ortaya koymuştur (Amalina ve Wahyuni, 2021). Kalam, Soujanya, Mahendar ve Begum (2016) farklı oranlarda *Zingiber officinale* Roscoe (rizom), *Curcuma longa* L. (rizom), *Aloe vera* (L.) Burm.f. (yaprak), *Citrus aurantium* L. (kabuk), *Embllica officinalis* (meyve) ve *Ricinus communis* L. (hint yağı) içeren polih herbal merhem formülasyonların antioksidan aktivitelerini ve cilt kanseri hücre hatlarına karşı (insan akciğer epitel (A431) ve insan melanom (A375) hücre hattında) sitotoksik aktivitelerini standart olarak kullanılan sisplatin ile karşılaştırarak *in vitro* yöntemlerle araştırmışlardır. Tüm formülasyonlar, standart ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde antioksidan aktivite göstermiştir. Seçili formülasyonun normal cilt hücreleri (HaCaT) için toksik olmadığı, ancak A375 ve A431 hücre hatlarında sırasıyla 35 µg/mL ve 41.5 µg/mL IC₅₀ değerleriyle cilt kanseri hücreleri için toksisite sergilediği bulunmuştur (Kalam, Soujanya, Mahendar ve Begum, 2016).

Segun ve diğerlerinin (2018) çalışmasında, *C. aurantium* gövde kabuğunun metanollü ekstresinin sitotoksik etkisi, dört farklı insan kanser hücre hattına karşı [insan akciğer kanseri hücre hattı (A549), insan karaciğer karsinoma hücre hattı (HepG2), MCF-7 ve insan prostat kanseri hücre hattı (PC-3)] *in vitro* sitotoksikite testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ekstrenin en yüksek aktiviteyi A549 hücrelerine karşı gösterdiğini, ardından MCF-7, HepG2 ve PC-3 hücrelerini takip ettiğini göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, *C. aurantium*'un kansere karşı etkili olabileceğini göstermiş, bu etkiden akridon alkaloitlerinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Segun ve diğerleri, 2018). Sevindik, Aydın ve Yıldırım'ın (2018) çalışmasında, *C. sinensis* ve *C. aurantium* çiçeklerinden elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimi ve antiproliferatif etkileri değerlendirilmiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) analizi sonuçlarına göre, *C. sinensis* uçucu yağında nerolidol (%22,13), linalol (%14,06); *C. aurantium* uçucu yağında nerolidol (%28,07), 2,6,10-dodekatrien-1-ol (%15,11) en yüksek oranda bulunmuştur. Hem *C. sinensis* hem de *C. aurantium* uçucu yağları, düşük ve orta konsantrasyonda (1,9-2,9 µg/mL) güçlü antiproliferatif etki göstermiştir. Sonuç olarak, *C. aurantium*'un gövde kabuğu ve çiçeklerinden elde edilen biyoaktif bileşikler, antikanser aktiviteye sahip potansiyel

adaylardır. Bu bileşiklerin daha fazla araştırılması, antikanser ilaçların geliştirilmesi için önemli bir katkı sağlayabilir (Sevindik, Aydın ve Yildirim, 2018).

C. aurantium etil asetatlı ekstresinden izole edilen ikaneksik asit ve izolimonik asidin HT-29 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu bileşiklerin G2/M aşamasındaki hücre sayısını artırarak hücre döngüsünü durdurmada potansiyel bir rol oynadığını göstermiştir (G. Jayaprakasha ve diğerleri, 2008). Ayrıca, *C. aurantium* çiçeklerinden izole edilen iki ana bileşik, HTF ve LA, SMCC-7721 hücre hatları üzerinde 12,5 ila 200 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda ve B16 hücre hatları üzerinde 6 ila 50 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermiştir (Zhao ve diğerleri, 2012). Başka bir çalışmada, *C. aurantium* meyve kabuğu ekstresinin kolestatik karaciğer fibrozu oluşturulan farelerde fibrozu büyük ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Biyokimyasal analiz, *C. aurantium* meyve kabuğu ekstresinin aspartat transaminaz, alanin transaminaz, toplam bilirubin, gama-glutamil transferaz ve tiyobarbitürik asit reaktif madde konsantrasyonlarını azaltarak bu farelerde anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteler sergilediğini göstermiştir (Lim ve diğerleri, 2016).

2.3. Kanser

Kanser, tümör baskılayıcı genlerin aşağı regülasyonu ve/veya tümör teşvik edici genlerin yukarı regülasyonu ile yönlendirilen kontrolsüz ve çoğunlukla agresif hücre büyümesi ile karakterize bir hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2011). İlk kanser vakası 1845 yılında sistematik olarak rapor edilmiş olsa da, biyolojisi ve patolojisinin derinlemesine anlaşılması ancak son yıllarda gerçekleşmiş ve kanseri ortadan kaldırmak için muazzam çabalar sarf edilmiştir (Arruebo ve diğerleri, 2011). Nüfus tabanlı kanser kayıtlarından elde edilen verilere göre, kanser ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Siegel, Miller ve Jemal, 2019).

Amerikan Kanser Derneği'nin açıkladığı verilere göre, 2024 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2.001.140 yeni kanser vakası ve 611.720 kanser ölümü gerçekleşeceği öngörülmektedir. Sigara kullanımının azalması, bazı kanserlerin daha erken teşhis edilmesi ve hem adjuvan hem de metastatik ortamlarda gelişmiş tedavi seçenekleri sayesinde 1991'den bu yana 4 milyondan fazla ölüm önlenerek kanser ölümleri 2021 yılına kadar azalmaya devam etmiştir. Ancak bu kazanımlar, ilk on kanserden altısının görülme

sıklığındaki artış nedeniyle tehdit altındadır. İnsidans, 2015-2019 yıllarında meme, pankreas ve uterus kanserleri için yıllık %0,6-1; prostat, karaciğer, böbrek ve insan papilloma virüsü ile ilişkili ağız kanserleri ve melanom için yıllık %2-3 oranında artmıştır. Genç yetişkinlerde rahim ağzı (30-44 yaş) ve kolorektal kanserler (<55 yaş) için de insidans, yıllık %1-2 oranında artmıştır. Kolorektal kanser 1990'ların sonlarında 50 yaş altı kadın ve erkeklerde kanserden ölümlerde dördüncü sırada yer alırken şu anda erkeklerde birinci, kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır (Siegel, Giaquinto ve Jemal, 2024).

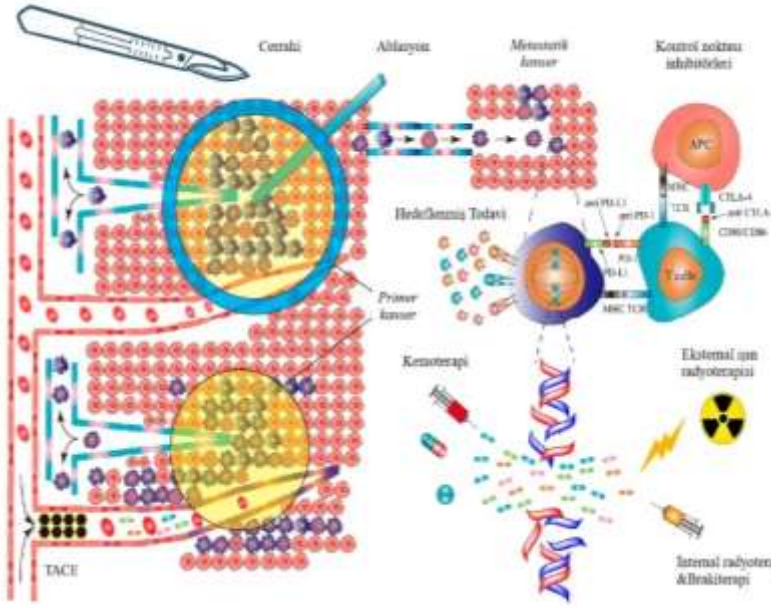
Bu durum hem finans hem de sağlık sistemleri üzerinde büyük bir yük oluşturmaktadır (W. Chen ve diğerleri, 2016). Kansere bağlı ölüm oranlarını azaltmak, kanser biyolojisinin anlaşılmasını derinleştirmek ve nihayetinde daha etkili kanser terapötiklerinin geliştirilmesini teşvik etmek amacıyla yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Barlas, 2016; T. Sun ve diğerleri, 2018). Klinik tedavi ve yönetimdeki ilerlemelerden yararlanılarak, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, meme kanseri ve multipl miyelom gibi birçok kanser türünde sağ kalım süresinde uzama sağlanmışken (G. Lu ve diğerleri, 2018; T. Sun ve diğerleri, 2018; S. Wang ve diğerleri, 2016; S. Wang, J. Tang, ve diğerleri, 2017), sarkom ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi solid malignitelerde son kırk yılda sağ kalımda iyileşme gözlenmemiştir (S. Wang, R. Song, ve diğerleri, 2017).

Klinikte kanser tedavisinin planlaması, kanser evresinin uygun bir şekilde sınıflandırılmasını gerektirir. Tümörler geleneksel olarak (I) doku, organ ve sisteme göre, (II) spesifik tipe göre, (III) Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre ve (IV) Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemine göre olmak üzere dört şekilde sınıflandırılır. TNM evreleme sistemi, çoğu kanser türü için (hematolojik maligniteler ve beyin tümörleri hariç) en yaygın olarak kullanılan evreleme sistemidir ve kanser hastalarını dört ana kategoride (I, II, III ve IV) evrelendirir (Greene ve Sobin, 2008). Evre I hastalar, organ içinde sınırlı ve yüksek oranda tedavi edilebilir kanserleri barındıran vakaları ifade ederken, evre IV hastalar metastatik vakalardır ve tedavileri zordur. Evre II ve evre III olarak nitelendirilen hastalar tedavi edilme potansiyeli orta düzeyde olan, sağ kalımlarını maksimum düzeyde uzatmak için multidisipliner modalitelerin uygulandığı hastalardır (Gress ve diğerleri, 2017).

Güncel kanser tedavileri

Kanserin tedavisi sadece sayısal olarak uzun sağ kalım süresini değil, aynı zamanda uygun şekilde tedavi edilen hastalar ile kansersiz popülasyon arasında eşit yaşam beklentisini de ifade eder. Tedavi edilebilirlik için makul ve ampirik bir kriter, etkili tedavilerden sonra 10 yıldan uzun süre nüks etmeden sağ kalımın sürdürülmesidir (Miller, Abraham, Rhodes ve Roberts, 2013). Bununla birlikte, klinikte kanser tedavisi için yaygın olarak kabul edilen bir kavram, beş yıl boyunca tam remisyonun sürdürülmesi anlamına gelir (Trad ve diğerleri, 2017).

Mevcut yaygın kanser tedavileri arasında cerrahi (ve benzer ablasyon tedavileri), kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi yer almaktadır (Şekil 2.3). Bu tedavilerin her biri, büyük ölçüde kanser türüne, evresine, hastanın performans durumuna bağlı olarak küratif değişkenlik göstermektedir. Erken evre solid kanserlerde, cerrahi yaklaşım tek başına küratif olabilir (Mok ve diğerleri, 2019). Kemoterapi veya radyoterapiye duyarlı olan solid kanserlerin hiper-erken evresinde, tek bir tedavi de kanser tedavisi için yeterli olabilir. Bununla birlikte, kanser vakalarının çoğu, kanser hücrelerini maksimum düzeyde ortadan kaldırmayı ve hastaların sağ kalımını uzatmayı amaçlayan multimodalite stratejilerinin uygulandığı ileri evrelerde teşhis edilmektedir. Ne yazık ki, bu yöntemlerle uzun süreli sağ kalım pratikte tatmin edici değildir ve bu nedenle, kanseri iyileştirmenin temel taşları hala erken teşhis ve ardından zamanında ve yeterli tedavide yatmaktadır (Armitage, Gascoyne, Lunning ve Cavalli, 2017; Hamilton ve diğerleri, 2006; Shanbhag ve Ambinder, 2018).



Birincil bölgede, cerrahi, görüntüleme kılavuzluğunda girişimsel prosedür ve radyoterapi dahil olmak üzere lokal tedaviler küratif amaçla uygulanabilir. Metastatik hastalıkta cerrahi, radyoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi palyatif veya hatta küratif amaçla uygulanabilir (S. Wang ve diğerleri, 2019).

TACE: transkateter arteriyel kemoembolizasyon; APC: antijen sunan hücre; PD-1: programlanmış ölüm-1; PD-L1: programlanmış ölüm ligandı-1; MHC: majör histokompatibilite kompleksi; TCR: T hücre reseptörü; CTLA-4: sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4; CD: farklılaşma kümesi

Şekil 2.3. Kanser için başlıca tedavi yöntemleri

2.3.1. Meme kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir ve moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur (Coughlin ve Ekwueme, 2009), teşhis edilen en yaygın ikinci kanserdir ve aynı zamanda küresel olarak kadınlarda başlıca ölüm nedenidir (Ferlay, Héry, Autier ve Sankaranarayanan, 2010). Meme kanseri ile ilişkili risk faktörleri (eksojen ve endojen faktörler) her geçen gün artmaktadır (Ya Li ve diğerleri, 2017). Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilerin yan etkileri hasta üzerindeki yükü artırmakta ve tedaviyi daha zor hale getirmektedir. Konvansiyonel tedavilerle ilgili en sıkıntılı sorunlardan biri çoklu ilaç direncidir (Group, 2005; Ullah, 2008). Bu durumun üstesinden gelinebilmesi amacıyla, günümüzde terapötik olarak, diğer tedavilerin yanında adjuvan olarak veya kemopreventif olarak kullanılabilecek ajanların keşfi ve geliştirilmesi konusunda çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Boon, Olatunde ve Zick, 2007). Geçtiğimiz son 15 yıl içinde, tedavi konseptleri bu heterojenliği dikkate alacak şekilde gelişme göstermiş, daha biyolojik olarak yönlendirilen tedavilere ve tedavinin yan etkilerini azaltmak için tedavinin kademeli hale getirilmesine önem verilmiştir. Erken meme

kanseri (memede bulunan veya sadece aksiller lenf düğümlerine yayılmış olan) tedavi edilebilir olarak kabul edilir. Multimodal tedavideki gelişmeler hastaların ~%70-80'inde tedavi şansının artmasını sağlamıştır. İlerlemiş meme kanserinde tedavinin ana hedefleri, yaşam kalitesini korumak veya iyileştirmek, sağ kalımı uzatmak ve tedaviye bağlı düşük toksisite ile semptomları kontrol etmektir (Curigliano ve diğerleri, 2023)

Tanı ve patofizyoloji

Meme kanseri, standardize edilmiş patolojik kriterlere göre konulan histolojik bir tanıdır. En yaygın meme kanseri histolojisi invaziv duktal karsinomdur (hastaların %50-%75'i), bunu invaziv lobüler karsinom takip eder (hastaların %5-%15'i), karışık duktal/lobüler karsinomlar ve diğer nadir histolojiler hastaların geri kalanını oluşturur (Waks ve Winer, 2019). Meme kanseri patogenezinde iki ana moleküler hedef tanımlanmıştır. Bunlardan biri, invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde eksprese edilen östrojen reseptörü alfa (ER α)'dır. ER α bir steroid hormon reseptörü ve östrojen tarafından aktive edildiğinde meme kanseri hücrelerinde onkojenik büyüme yollarını aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür (Waks ve Winer, 2019).

Yakın ilişkili steroid hormon progesteron reseptörünün (PR) ekspresyonu da ER α sinyalinin bir belirticidir. Tümör hücrelerinin en az %1'inde ER veya PR ekspresyonu olan tümörler HR+ olarak kategorize edilir. ER sinyalinin aşağı regüle etmek için endokrin ajanların kullanımı ER-pozitif veya PR-pozitif meme kanserleri için birincil sistemik tedavidir (Hammond ve diğerleri, 2010). İkinci ana moleküler hedef, epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinde bir transmembran reseptör tirozin kinaz olan epidermal büyüme faktörü 2'dir (ERBB2) ve meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde amplifiye edilir veya aşırı eksprese edilir ve sistemik tedavinin yokluğunda kötü prognozla ilişkilidir (Piccart-Gebhart ve diğerleri, 2005). ERBB2 geninin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu olan tümörler ERBB2+'dır. ERBB2 amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu olan meme kanserli hastalar, anti-ERBB2 antikoru (trastuzumab ve pertuzumab gibi) ve küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri (lapatinib ve neratinib gibi) dahil olmak üzere ERBB2 hedefli tedaviden fayda görür (Wolff ve diğerleri, 2014).

Tüm meme tümörlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan üçlü-negatif meme kanseri, moleküler hedefler ER, PR veya ERBB2'nin ekspresyonu ile karakterize edilir. Üçlü-negatif tümörler,

tanıdan sonraki ilk 3 ila 5 yıl içinde yüksek bir uzak nüks riskine sahiptir. Üçlü-negatif meme kanserinin spesifik moleküler patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır (Denkert, Liedtke, Tutt ve von Minckwitz, 2017).

Farklı prevalanslar, prognozlar ve sistemik tedavi seçenekleri 3 meme kanseri alt tipini karakterize etmektedir: HR+, ERBB2+ veya üçlü-negatif. Meme kanseri I-IV olarak evrelendirilir; IV. evresi uzak metastatik hastalığı ifade eder. Anatomik olarak 2 cm'den küçük ve lenf nodu tutulumu olmayan meme tümörü olarak tanımlanan Evre I meme kanserlerinde 5 yıllık meme kanserine özgü sağ kalım HR+, ERBB2+ ve üçlü negatif alt tipler için sırasıyla en az %99, %94 ve %85'tir. Evre IV meme kanserleri, HR+ veya ERBB2+ alt tipleri için yaklaşık 5 yıl ve üçlü negatif için 1 yıl medyan genel sağ kalım oranına sahiptir (Waks ve Winer, 2019).



▲ işareti her bir alt tipte hücresel genin daha yüksek ekspresyonunu gösterir. Alt tipler genel sağ kalım (meme kanseri alt tipleri için) ve nüks etmeden sağ kalım (TNBC alt tipleri için) ile karakterize edilir

Şekil 2.4. Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin şematik gösterimi

Tedavi prensipleri

Nonmetastatik meme kanserinde tedavinin ana hedefleri tümörün memeden ve bölgesel lenf düğümlerinden eradike edilmesi ve metastatik nüksün önlenmesidir. Nonmetastatik meme kanseri için lokal tedavi, cerrahi rezeksiyon ve aksiller lenf nodlarının örneklenmesi veya çıkarılmasından oluşur ve postoperatif radyasyon göz önünde bulundurulur. Sistemik tedavi ameliyat öncesi (neoadjuvan), ameliyat sonrası (adjuvan) veya her ikisi birden olabilir. Meme kanseri alt tipi, uygulanan standart sistemik tedaviyi yönlendirir; bu tedavi tüm HR+ tümörler için endokrin tedavisi (bazı hastalar kemoterapi de gerektirir), tüm *ERBB2*+

tümörler için trastuzumab bazlı *ERBB2*'ye yönelik antikor tedavisi ile kemoterapi (eş zamanlı HR pozitifliği varsa ek olarak endokrin tedavisi verilir) ve üçlü negatif meme kanseri için tek başına kemoterapiden oluşur. Metastatik meme kanserinde terapötik hedefler yaşam süresinin uzatılması ve semptomların hafifletilmesidir. Halen, metastatik meme kanseri neredeyse tüm etkilenen hastalarda tedavi edilemez olmaya devam etmektedir. Burada özetlenen neoadjuvan/adjuvan yaklaşımlarda olduğu gibi metastatik meme kanserinde de aynı temel sistemik tedavi kategorileri kullanılmaktadır. Lokal tedavi modaliteleri (cerrahi ve radyasyon) tipik olarak sadece metastatik hastalıkta palyasyon için kullanılır (Waks ve Winer, 2019). Meme kanserinin 3 alt tipi için prevalans, prognoz ve tedavi seçenekleri Çizelge 2.7'de sunulmuştur.

Çizelge 2.7. Meme kanserinin 3 alt tipi için prevalans, prognoz ve tedavi seçenekleri

	Hormon Reseptörü (HR) +/ERBB2-	ERBB2+ (HR+ or HR-)	Üçlü-Negatif
Patolojik tanım	Tümör hücrelerinin ≥ 1 'i ER veya PR proteinleri için pozitif boyanır	Tümör hücreleri ERBB2 proteini için güçlü bir şekilde (3+) boyanır veya ERBB2 geni tümör hücrelerinde amplifiye edilir. ERBB2+ tümörlerin yaklaşık yarısı aynı zamanda HR+'dır	Tümör östrojen reseptörü, progesteron reseptörü veya ERBB2 pozitifliği için herhangi bir patolojik kriteri karşılamıyor
Moleküler patogeneze	Östrojen reseptörü α (bir steroid hormon reseptörü) onkogenik büyüme yollarını aktive eder	Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinden ERBB2 reseptör tirozin kinazı kodlayan ERBB2 onkogeni aşırı aktiftir	Bilinmiyor (muhtemelen çeşitli)
Meme kanseri vaka oranı, %	70	15-20	15
Prognoz			
Evre I (5 yıllık meme kanserine özgü sağ kalım), %	≥ 99	≥ 94	≥ 85
Metastatik (ortalama genel sağ kalım)	4-5 yıl	5 yıl	10-13 ay
Tipik sistemik için terapiler metastatik olmayan hastalık (ajanlar, yolak, ve süre)	• Endokrin tedavisi (tüm hastalar): ❖ Tamoksifen, letrozol, anastrozol, veya eksemestan ❖ Ağızdan tedavi ❖ 5-10 yıl • Kemoterapi (bazı hastalar): ❖ Adriamisin/siklofosfamid (AC) ❖ Adriamisin/siklofosfamid/paklitaksel (AC-T) ❖ Dosetaksel/siklofosfamid (TC) ❖ İntravenöz tedavi ❖ 12-20 hafta	Kemoterapi ve ERBB2 hedefli tedavi (tüm hastalar): - Paklitaksel/trastuzumab (TH) - Adriamisin/siklofosfamid/paklitaksel/trastuzumab $\pm$ pertuzumab (AC-TH$\pm$P) - Dosetaksel/karboplatin/trastuzumab $\pm$ pertuzumab (TCH$\pm$P) - İntravenöz tedavi - 12-20 hafta kemoterapi; 1 yıl ERBB2-hedefli tedavi - Endokrin tedavisi (eğer ayrıca hormon reseptörü pozitif) - Tamoksifen, letrozol, anastrozol veya eksemestan - Ağızdan tedavi - 5-10 yıl	• Kemoterapi (tüm hastalar): - AC - AC-T - TC - İntravenöz tedavi - 12-20 hafta

Bitki bazlı doğal ürünler ve meme kanseri

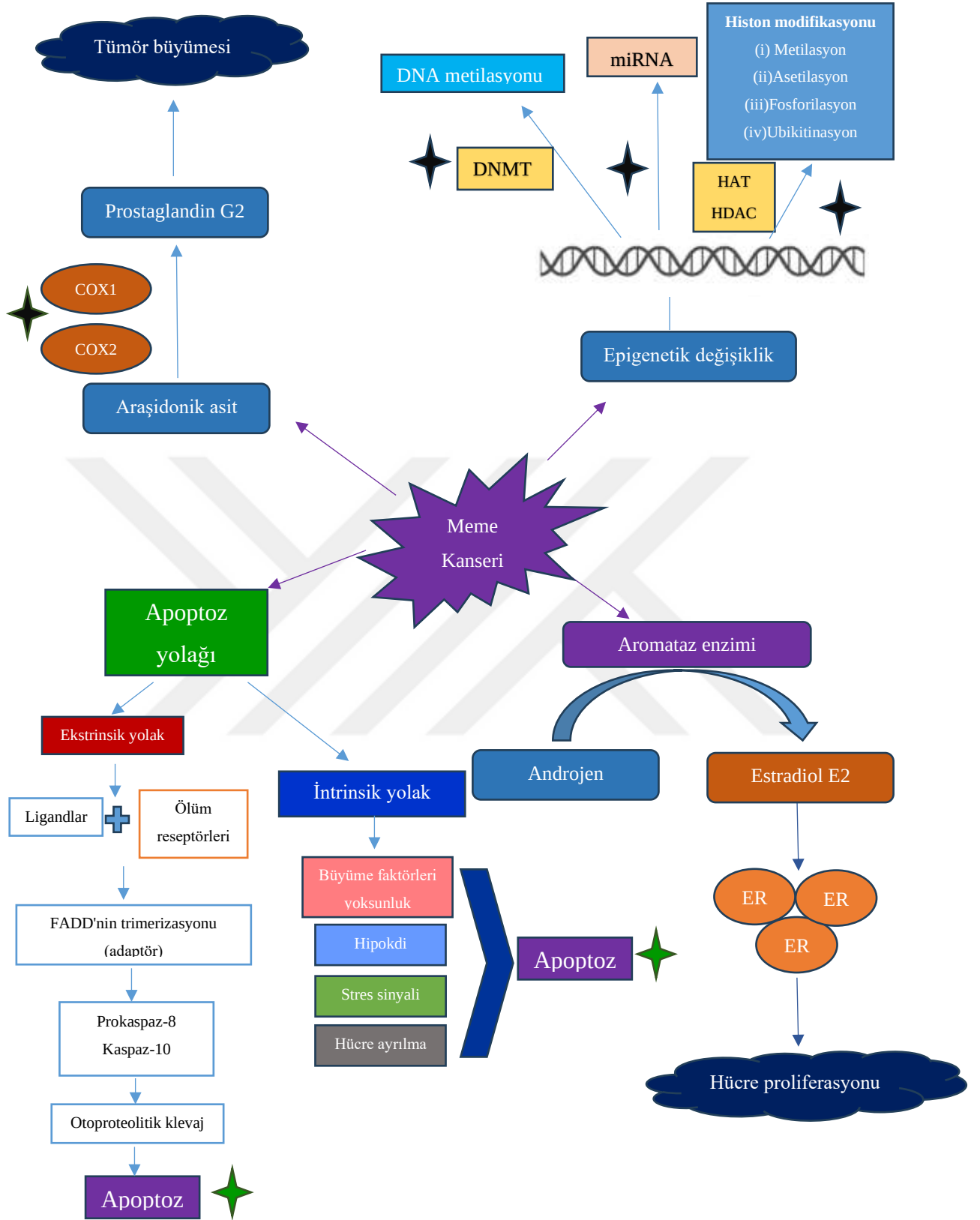
Bitkiler kanser tedavisinde uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Günümüzde kullanılan antikanser ajanların %60'ından fazlasının bitkiler, deniz organizmaları ve mikro-organizmalar dahil olmak üzere doğal kaynaklardan elde edilmektedir (Naeem ve diğerleri, 2022; Varghese ve Dalvi, 2021). Bitkisel kaynaklardan antikanser ajanların arayışı, 1950'lerde Vinca alkaloidlerinin (vinblastin ve vinkristin) keşfi ve geliştirilmesi, sitotoksik podofilotoksinlerin izolasyonu ile başlamıştır. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü 1960 yılında, esas olarak ılıman bölgelere odaklanan kapsamlı bir bitki toplama programı başlatmıştır. Bu program, taksonlar ve kamptotesinler de dahil olmak üzere bir dizi sitotoksik aktivite gösteren birçok yeni bileşiğin keşfedilmesine önayak olmuştur ancak bunların klinik olarak aktif ajanlara dönüştürülmesi 1960'ların başından 1990'lara kadar yaklaşık 30 yıllık bir dönem içerisinde olmuştur (Cragg ve Newman, 2005).

Doğal bileşikler, genler gibi belirli moleküler hedefler üzerine doğrudan etki ederek veya metabolik yolları etkileyen konjugatları dolaylı olarak stabilize ederek kanser tedavisinde olumlu etki sağlar (Saldanha ve Tollefsbol, 2012). Liao, Apaya ve Shyur (2013) yaptıkları çalışmada, bitkisel bileşiklerin kemoterapi veya diğer tedavilerden kaynaklanan bulantı, yorgunluk, mukozit ve anemi gibi yan etkileri azaltmak amacıyla konvansiyonel kemoterapiyle birlikte adjuvan olarak etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir (Liao, Apaya ve Shyur, 2013). Birçok çalışmada, doğal bileşiklerin birçoğunun antikanser aktiviteye sahip olduğu ve birçok mekanizma üzerinde (Şekil 2.6) etki gösterme potansiyeli bulunduğu kanıtlanmıştır (Grosso ve diğerleri, 2017; F. Li ve diğerleri, 2013; Zheng ve diğerleri, 2016; Y. Zhou ve diğerleri, 2016).

Kanserin erken oluşumunda ve ilerlemesinde, genetik değişikliklerin yanı sıra çoğunlukla epigenetik düzensizlikler gözlenmektedir (Ducasse ve Brown, 2006). Meme kanseri, DNA hipermetilasyonu ile birlikte histon asetilasyonu ve metilasyonu gibi anormal histon modifikasyonları, tümör baskılayıcı genlerin epigenetik susturulması ve genomik instabilite ile ilişkilidir (Jones ve Baylin, 2007; V. Stearns, Zhou ve Davidson, 2007). Yapılan çalışmalar, doğal kaynaklarda bulunan sekonder metabolitlerin epigenetik olayları modüle etme ve kanser ilerlemesine neden olmadan önce epigenetik değişiklikleri tersine çevirme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Khan, Aumsuwan, Khan, Walker ve Dasmahapatra, 2012; Thakur, Deb, Babcook ve Gupta, 2014). Fitokimyasalların, spesifik anahtar

transkripsiyon faktörlerini, kinazları ve büyüme faktörü reseptörü aracılı yolları hedef olarak, hücre döngüsünün durdurulması, apoptozun başlatılması ve tümör baskılayıcı genlerin yeniden etkinleştirilmesi yoluyla epigenetik değişikliklerde etkilerini gösterdikleri bildirilmiştir (R. Aggarwal, Jha, Shrivastava ve Jha, 2015; Landis-Piwowar, Milacic ve Dou, 2008). Meme kanseri kemoprevansiyonunda, Chlebowski (Chlebowski, 2014) çalışmasında, tamoksifen ve bazı aromataz inhibitörlerinin (eksemestan ve anastrozol dahil) klinik çalışmalarda meme kanserini azaltmada etkili kemopreventif etkilerini göstermiştir. Bunun yanı sıra bu ilaçlar, tamoksifen de dahil olmak üzere, endometriyal kanser riskini artıran yan etkiler göstermiştir. Sentetik ilaçlarla karşılaştırıldığında, doğal bileşikler hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde daha az yan etki ve minimum toksisite gösterdikleri için meme kanseri kemoprevansiyonunda umut vericidir (E.-Y. Ko ve Moon, 2015). Membrana bağlı protein ve sitokrom P450 enzim ailesinin bir üyesi olan aromataz, androstenedionun östrona ve testosteronun östrodiol dönüşümünü katalize eder ve östrojen biyosentezinde çok önemli bir rol oynar (Maggiolini ve diğerleri, 2002). Yapılan çalışmalarda, fitokimyasalların östrojene benzer kimyasal yapıya sahip olduğunu ve aromataz aktivitesini doğrudan inhibe ederek aromataz ekspresyonunu değiştirme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Lephart, 2015). Ayrıca, doğal ürünlerin metabolik enzimler siklooksijenazlar (COX'lar), fosfolipaz A2'ler (PLA2'ler) ve lipooksijenazlar (LOX'lar) dahil olmak üzere araşidonik asit (AA) yolunu hedef olarak kemopreventif etki gösterdiği de ortaya konulmuştur (Yarla ve diğerleri, 2016). Farklı çalışmalarda, araşidonik asit yolağının enflamasyonda ve tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Cuendet ve Pezzuto, 2000; D. Wang ve DuBois, 2010). Yüksek COX-2 seviyesi ile kötü prognoz, invazivlik ve meme kanseri hücrelerinin yoğunluğu arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Denkert ve diğerleri, 2003). Ranger, Thomas, Jewell ve Mokbel (2004) meme kanserinde COX-2 ekspresyon seviyeleri ile uzak metastazlar arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır (Ranger, Thomas, Jewell ve Mokbel, 2004). Bu durum göz önünde bulundurarak, COX- 2 düzeyinin düşürülmesinin farelerde meme kanseri hücrelerinin metastatik davranışını azaltabileceği ortaya konulmuştur (Stasinopoulos, O'Brien, Wildes, Glunde ve Bhujwalla, 2007). Apigenin, ginsetin, kurkumin ve likopen gibi fitokimyasalların, prostaglandinler ve lökotrienler gibi metabolik ürünlerin biyosentezini doğrudan inhibe ettiği bildirilmiş ve bu nedenle meme kanseri kemoprevansiyonunda güçlü terapötik ajanlar olarak kabul edilmiştir. Bulgular ayrıca fitokimyasalların hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak malign ve premalign hücrelerde apoptozu uyarmak için önemli etkilere sahip olduğunu göstermiştir (S.-Y. Sun, Hail Jr ve Lotan, 2004).

Apoptoz, embriyonik gelişim ve doku homeostazı için çok önemli roller oynayan programlanmış hücre ölümünü ifade eder ve düzensizliği tümör oluşumuna ve hatta kanser hücresi ilaç direncinin gelişmesine neden olabilir (Johnstone, Ruefli ve Lowe, 2002). Bu nedenle, apoptozu düzenleme, kanser tedavi stratejisini bulmak ve tasarlamak için en önemli yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir (J.-j. Liu, Lin, Yu, Liu ve Bao, 2011). Apoptozun aktivasyonu ile ilgili iki ana yolak ekstrinsik ve intrinsik yolaktır. Ekstrinsik yolak, ligandın ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar ve sonuçta trimerizasyonu tetikleyerek adaptör protein Fasassociated death domain (FADD) ve prokaspaz-8 veya kaspaz-10'un hücre içi ölüm alanında ölüm indükleyici sinyal kompleksleri (DISC) oluşturmaya neden olur (Harper, Hughes, MacFarlane ve Cohen, 2003; Thomas, Henson, Reed, Salsbury ve Thorburn, 2004). Ölüm reseptörleri Fas (CD95/APO-1), TNF reseptörü 1 (TNF-R1/p55/CD120a), TNF ile ilişkili apoptozis indükleyici ligand reseptörü 1 TRAIL-R1/ölüm reseptörü 4 (DR4) ve reseptör 2'den (TRAIL-R2/DR5/APO-2/KILLER) oluşur (Guicciardi ve Gores, 2009; Wajant, 2003). DISC'de, kaspaz-8 veya kaspaz-10 oligomerizasyonu, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi aşağı akış efektör kaspazların enzimatik aktivitesinin tetiklenmesine yol açan otoproteolitik bölünme yoluyla DISC'yi aktive etmiştir (Green, 2000). Buna karşılık, intrinsik mitokondriyal yol hipoksi, büyüme faktörü yoksunluğu, hücre ayrılması veya stres sinyalleri gibi fiziksel veya kimyasal uyarımlarla aktive edilir ve proapoptotik Bcl- 2 ailesi üyeleri bu yolun başlatılmasında önemli rol oynar (M. H. Kang ve Reynolds, 2009). Kaspaz-9 ayrıca apoptozun intrinsik yolu ile de ilişkilidir. Yolak aktive edildiğinde, kaspaz-9, aşağı akış efektörü kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi böler ve aktive eder, bu da daha sonra hücre ölümünü gerçekleştirmek için anahtar düzenleyici ve yapısal proteinleri böler. En kapsamlı çalışmalar, birçok tümör promotör proteininin kanser hücresinde kemorezistans geliştirerek apoptozu inhibe ettiğini bildirmiştir. Bu nedenle, apoptotik programları manipüle eden proteinlerin hedeflenmesi, antikanser ilaçlar için öncelikli bir durumdur (Roth ve Reed, 2002; Toshiya, Testuya, Akira ve Takuji, 2012). Günümüzde birçok çalışma, bir veya birden fazla mekanizma yoluyla apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin büyümesini engelleme yeteneklerini bulmak için kanser tedavisinde klinik kullanım için onaylanmış doğal bileşiklere odaklanmaktadır (Dall'Acqua, 2014; H. Liu ve diğerleri, 2014).



Siyah yıldız işareti doğal bileşiklerin inhibitör olarak etkisini gösterirken, yeşil yıldız doğal bileşikler tarafından indüklenen yukarı regülasyonu temsil etmektedir.

Şekil 2.4. Doğal bileşiklerin meme kanseri yolağındaki moleküler hedefleri

Çizelge 2.8. Meme kanseri tedavisinde bitkisel bileşiklerin aktiviteleri

Bileşik	Bitki kaynağı	Mekanizmalar	Açıklamalar	Kaynaklar
3,3'-Diindolmetan	<i>Brassica oleracea</i> L.	Araşidonik asit yolağı	● MCF-7 meme kanseri hücrelerinde COX-2 ekspresyonunu inhibe eder	(Degner, Papoutsis, Selmin ve Romagnolo, 2009)
		Apoptotik yolak	● Survivin, Bcl-2 ve cdc25A'yı aşağı doğru regüle eder ●● p21 (WAF1) ekspresyonunu yukarı doğru regüle eder	(Rahman, Li, Wang, Sarkar ve Sarkar, 2006)
		HIF-1 sinyal yolağı	● Hipoksik tümör hücre hatlarında anahtar hipoksiye duyarlı faktörler olan VEGF, furin, enolaz-1, glikoz taşıyıcı-1 ve fosfofruktokinazın ekspresyonunu azaltır	(Riby, Firestone ve Bjeldanes, 2008)
		Aromataz aktivitesi	● Aromataz ekspresyonunu inhibe eder	(Riby ve diğerleri, 2008)
		Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● <i>FoxM1</i> , <i>Akt</i> ve <i>NF-κB p65</i> seviyesini azaltarak herceptinin etkinliğini artırır ●● Randomize, plasebo kontrollü çalışmada tamoksifenin kemosensitivitesini artırır ve östrojen metabolizmasını değiştirir ●●● MDR (Multi Drug Resistance) insan meme karsinomunu γ -ışımına karşı duyarlı hale getirir	(Ahmad ve diğerleri, 2013; Ahmad ve diğerleri, 2011; Thomson ve diğerleri, 2017)
Biokanin A	<i>Trifolium pratense</i> L.	Aromataz aktivitesi	● Aromataz ekspresyonunu inhibe eder	(Yun Wang, Gho, Chan, Chen ve Leung, 2008)
		Sitoplazmik sinyal yolları	● HER-2 reseptör aktivasyonunu inhibe eder ●● Erk1/2, Akt, mTOR, NF-κB, MMP-9 ve MT-MMP1'i inhibe eder	(Sehdev, Lai ve Bhushan, 2009)
			● 15mg/kg dozunda bir ksenograft hayvan modelinde tümör büyümesini inhibe eder	(Sehdev ve diğerleri, 2009)
		Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● İyonlaştırıcı radyasyonun duyarlılığını artırır ●● Tamoksifen, 5-fluorourasil ve doksorubisinin biyoyararlanımını artırır	(Qiao ve diğerleri, 2011; Shin ve Choi, 2009; M. E. Stearns, Amatangelo, Varma, Sell ve Goodyear, 2010; G. Zhang ve diğerleri, 2012)

Çizelge 2.8. (devam) Meme kanseri tedavisinde bitkisel bileşiklerin aktiviteleri

Bileşik	Bitki kaynağı	Mekanizmalar	Açıklamalar	Kaynaklar
Genistein	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	Araşidonik asit yolağı	● COX-2 ekspresyonunu inhibe eder ● PGE2'yi düzenler ●●● Meme kanseri hücrelerinde sPLA2, NF-κB ve ERK aracılı p65 fosforilasyonunu inhibe eder ●●●● Hem ERα hem de ERβ'yi aktive eder	(Banerjee, Li, Wang ve Sarkar, 2008; Chung ve diğerleri, 2014; Dharmappa, Mohamed, Shivaprasad ve Vishwanath, 2010; Lau ve Leung, 2006; Pons ve diğerleri, 2014)
		Apoptotik yolak	● MDA-MB-231 hücre hatlarında Bax (pro-apoptotik protein) ve p21WAF1 proteininin yukarı regülasyonu ● Kaspaz-3'ün aşağı regülasyonu ●●● Kalpain-kaspaz-7 ve 1-p38 mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyon kaskadlarını düzenler ●●●● IGF-1R-PI3K/Akt yolunu inaktive eder ve Bcl-2/Bax'ı azaltır ●●●●● ATM/Chk2/Cdc25C/Cdc2 kontrol noktası yolunu aktive ederek G2/M tutuklamasını artırır	(Jun Chen ve diğerleri, 2015; X. Liu ve diğerleri, 2013; Shim ve diğerleri, 2007; S. Yang, Zhou ve Yang, 2007)
		Epigenetik regülasyon	● p21 ve p16 ekspresyonunu düzenler ● ERα ifadesini epigenetik olarak geri yükler ●● DNMT1 ifadesini bloke eder	(Yuanyuan Li, Chen, Hardy ve Tollefsbol, 2013; Xie ve diğerleri, 2014)
			● Yetişkin ovariectomize sıçanlarda Brca1 ve Brca2 mRNA ekspresyonlarının yukarı doğru regüle eder ●● Tümörlerin boyutunu %50 oranında azaltır	(Tominaga ve diğerleri, 2007)
Kurkumin	<i>Curcuma longa</i> L.	Apoptotik yolak	● P53 seviyesini artırır ● Bax ekspresyonunu artırır ●●● MDA-MB-231 ve BT-483 hücre hattında NF-kappaB, siklin D ve MMP-1 transkripsiyonunu aşağı regüle eder	(Q. Liu, Loo, Sze ve Tong, 2009)
		Wnt sinyal yolağı	● MCF-7 hücre hattında 5 µM dozunda Wnt sinyalini inhibe eder	(Kakarala ve diğerleri, 2010)
		Epigenetik regülasyon	● Sınıf I HDAC'ların ekspresyonunu inhibe eder ●● Bcl-2 ekspresyonunu azaltmak için bazı miRNA'ların ekspresyonunu yukarı regüle eder	(Y. Chen ve diğerleri, 2007; J. Yang, Cao, Sun ve Zhang, 2010)
		Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● MDA-MB-231 hücrelerinde NF-κB ve MMP-9 ekspresyonlarını deaktive ederek paklitakselin etkinliğini artırır ●● MCF-7 ve MCF-7MDR hücre hattında P-gp, MXR ve MRP1'in efluks fonksiyonunu inhibe eder	(B. B. Aggarwal ve diğerleri, 2005; Limtrakul, Chearwae, Shukla, Phisalpong ve Ambudkar, 2007)

Çizelge 2.8. (devam) Meme kanseri tedavisinde bitkisel bileşiklerin aktiviteleri

Bileşik	Bitki kaynağı	Mekanizmalar	Açıklamalar	Kaynaklar
Likopen	<i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L) Karsten ex Farw., <i>Daucus carota</i> L., <i>Citrillus lanatus</i> (Thumb.) Matsum et Nakai, <i>Carica papaya</i> L., <i>Prunus avium</i> L.	Epigenetik regülasyon	● GSTP1 ekspresyonun yukarı doğru regüle eder ● GSTP1 promotörünü demetile eder	(King-Batoon, Leszczynska ve Klein, 2008)
		Apoptotik yolak	● Akt aşağı akış yolağının fosforilasyonunu bloke eder ● Antiapoptotik Bcl-xL'yi etkilemeden proapoptotik Bax'ı yukarı doğru regüle eder ● Siklin D1'i baskılar ve p21'i yukarı doğru regüle eder ● ERK1/2'nin aktivasyonunu sürdürür ● p53 ve Bax ekspresyonunu artırır	(Peng ve diğerleri, 2017; Takeshima ve diğerleri, 2014)
Silibinin	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Apoptotik yolak	● Bcl-2 ekspresyonunu aşağı regüle ederek otofajik hücre ölümünü indükler ● Atg12-Atg5 oluşumunu yukarı düzenler ve beclin-1 ekspresyonunu artırır	(Jiang ve diğerleri, 2015)
		Araşidonik asit yolağı	● Wnt/LRP6 sinyalini bastırır ● Meme kanseri hücrelerinde TPA ile indüklenen MMP-9 ekspresyonunu azaltır ve COX-2 ekspresyonunu inhibe eder	(S. Kim ve diğerleri, 2009; W. Lu ve diğerleri, 2012)
		Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● Sisplatin ve paklitakselin etkinliğini artırır	(Chavoshi ve diğerleri, 2017; Molavi ve diğerleri, 2017)

Çizelge 2.8. (devam) Meme kanseri tedavisinde bitkisel bileşiklerin aktiviteleri

Bileşik	Bitki kaynağı	Mekanizmalar	Açıklamalar	Kaynaklar
Sülforafan	<i>Brassica oleracea</i> L.	Epigenetik regülasyon	● hTERT'yi (insan telomeraz ters transkriptazı) inhibe eder	(Pledgie-Tracy, Sobolewski ve Davidson, 2007)
		Apoptotik yolak	● Siklin B1 ekspresyonunu artırır ●● Poli (ADP-riboz) polimeraz 1 ve kaspaz ailesi proteinlerini aktive eder ●●● Tubulin polimerizasyonunu inhibe eder ●●●● NF-κB sinyal yolunu aşağı doğru regüle eder ●●●●● Bcl-2 ve fosforile Akt serin/treonin kinaz ekspresyonlarını azaltır	(Jackson ve Singletary, 2004a, 2004b; Pledgie-Tracy ve diğerleri, 2007)
		Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● Meme kanseri hücrelerinde paklitakselin kemosensitivitesini artırır ●● ERα-negatif meme kanserinde ERα'nin epigenetik reaktivasyonu yoluyla tamoksifen duyarlılığını artırır	(S. H. Kim, Park ve Moon, 2017; Lewinska, Bednarz, Adamczyk-Grochala ve Wnuk, 2017; Yuanyuan Li, Meeran ve Tollefsbol, 2017)
		Araşidonik asit yolağı	● NF-κB ekspresyonunu inhibe eder ●● ERK1/2-IKK-α ve NAK-IKK-β'nin aracılık ettiği COX-2 ekspresyonunu bloke eder	(H.-N. Kim ve diğerleri, 2014; Q. Li ve diğerleri, 2014)
			● <i>In vivo</i> SOX9 ve ALDH1 ekspresyonlarını azaltır ●● 2 hafta boyunca 50 mg/kg dozunda NOD/SCID ksenograft modelinde ALDH+'yi azaltır ve Wnt/β-katenin kendini yenileme yollarını aşağı doğru regüle eder	(Q. Li ve diğerleri, 2014; Yanyan Li ve diğerleri, 2010)
Şikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	Östrojen sinyali	● ER ubiquitinasyonunu aktive eder ●● Östrojene duyarlı gen promotörleri olan pS2 ve c-myc'yi inhibe eder ●●● Nrf2 yolağını tetikleyerek DNA hasarına neden olur	(Yao, Brodie, Davidson, Kensler ve Zhou, 2010; Yao ve Zhou, 2010)
		Apoptotik yolak	● Steroit sülfataz genlerinin ekspresyonlarını azaltır ●● Kaspaz-3'ü etkinleştirir ●●● NF-κB yolağını, Bcl-2 ve Bax'ı baskılar ●●●● p65'i aşağı regüle eder ve IκB-α fosforilasyonunu inhibe eder	(Duru, Gernapudi ve Zhou, 2014; Y. Zhang, Qian ve Li, 2009)
		Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● ER negatif insan meme hücrelerinde taksoölün kemosensitivitesini artırır ●● G2/M fazında hücre döngüsünün durmasına neden olur ve ERK, Akt ve p70S6 kinazların aktivasyonunu inhibe eder ●●● uc.57'yi indükleyerek tamoksifen direncini azaltır ve BCL11A'yı aşağı regüle eder	(W. Li, Liu, Jackson, Shi ve Zhao, 2014; C.-H. Zhang ve diğerleri, 2017)

Çizelge 2.8. (devam) Meme kanseri tedavisinde bitkisel bileşiklerin aktiviteleri

Bileşik	Bitki kaynağı	Mekanizmalar	Açıklamalar	Kaynaklar
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i> L.	Epigenetik regülasyon	● DNMT 3b ekspresyonunu inhibe eder ve RASSF-1α metilasyonunu azaltır ●● SIRT1 ve asetil transferaz p300'ü aktive eder ●●● MCF-7 hücre hattında DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b, HDAC1 ve metil CpG bağlayıcı protein 2 (MeCP2) ekspresyonlarını azaltır	(Bishayee, 2009; Qin, Zhang, Clarke, Weiland ve Sauter, 2014; Stefanska, Karlic, Varga, Fabianowska-Majewska ve Haslberger, 2012; R.-H. Wang ve diğerleri, 2008)
		Araşidonik asit yolağı	● ERβ, COX-2, NQO2, IKK ve GSTP1'i inhibe eder	(Hsieh ve Wu, 2010; Sinha, Sarkar, Biswas ve Bishayee, 2016)
		Aromataz aktivitesi	● Aromataz mRNA ekspresyonunu azaltır ●● CYP19 promotörleri I.3 ve II'nin transaktivasyonunu baskılar	(Yun Wang, Lee, Chan, Chen ve Leung, 2006)
			● Günde 1 g resveratrol tüketimi, yüksek vücut kitle indeksine sahip postmenopozal kadınlarda östrojen metabolizmasının yanı sıra seks steroid hormonu bağlayıcı globulin üzerinde tamamlayıcı etkilere sahiptir	(Chow ve diğerleri, 2014)
		Apoptotik yolak	● MCF-7 hücrelerinde düşük dozda p53'e bağımlı yolağı uyarır ●● ER'ye bağılı PI3K yolunu baskılar ●●● Src tirozin kinaz ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT-3) fosforilasyon yolları ●●●● Akt fosforilasyonunu azaltır ve prokaspaz-9'u aktive eder ●●●●● Mitokondriyal protein (Smac/DIABLO), kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive eder	(H. Kim ve diğerleri, 2004; Laux, Aregullin, Berry, Flanders ve Rodriguez, 2004; Yan Li ve diğerleri, 2006; Sareen, Darjatmoko, Albert ve Polans, 2007)
Rosmarinik asit	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Araşidonik asit yolağı	● COX-2 ekspresyonunu, AP-1 aktivasyonunu azaltır ve ERK1/2 aktivasyonunu antagonize eder ●● NF-κB yolunda interlökin-8'i (IL-8) baskılar	(Scheckel, Degner ve Romagnolo, 2008; H. Wang ve diğerleri, 2012)
Rutin	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	Kemosensitivite/adjuvan tedavi	● HER2-negatif ve üçlü-negatif meme kanseri hücre hatlarında kemosenstiviteyi geri kazandırır ●● TNBC hücre hattında c-Met kinaz aktivitesini azaltır ve ayrıca 30mg/kg dozunda nude fare modelinde TNBC MDA-MB-231/GFP ortotopik ksenograftın büyümesini önemli ölçüde azaltır	(Elsayed ve diğerleri, 2017; Iriti ve diğerleri, 2017)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Citrus aurantium L., *Citrus maxima* (Brum.) Merr. (syn. *Citrus grandis*), *Citrus medica* L. ve *Citrus paradisi* Macfad. meyveleri Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden 2021 yılı Ocak ayında temin edilmiştir. Tür teşhisleri Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Bahçe Bitkileri Bölümünden Ziraat Mühendisi Dr. Ertuğrul TURGUTOĞLU'nun yardımıyla yapılmış, bitki numunelerine ait herbaryum örnekleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na (GUEF) kayıt edilmiştir (Çizelge 3.1). Çalışmamızda türlerin kısaltılmış isimleri kullanılacağından [*C. aurantium* (CA), *C. grandis* (CG), *C. medica* (CM) ve *C. paradisi* (CP)], *C. medica*'nın kısaltması (CM) ile karışmaması amacıyla *C. maxima*'nın sinonimi olan *C. grandis* (CG) ismi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. *Citrus* türlerinin herbaryum kayıt numaraları

Tür adı	Herbaryum no
<i>Citrus aurantium</i> L.	GUEF 3837
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	GUEF 3838
<i>Citrus medica</i> L.	GUEF 3839
<i>Citrus paradisi</i> Macfad	GUEF 3840

Meyvelerin kabuk kısımları ayrılmış ve gölgede kurutulduktan sonra ekstraksiyon için toz haline getirilmiştir. Meyve kabuklarının kuru ağırlık/yaş ağırlık oranları CA, CG, CM ve CP için sırasıyla 0,20; 0,15; 0,22 ve 0,12 olarak hesaplanmıştır.

3.2. *Citrus* Türlerinin Ekstraksiyonu ve Kromatografik Çalışmalar

3.2.1. Ekstraksiyon

Metanollü (MeOH) ekstrelerin hazırlanması

Kurutulmuş ve toz edilmiş *Citrus* türlerinin meyve kabukları tartılmış (10 g) ve üzerlerine MeOH (200 mL) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar MeOH ilave edilerek bu

işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstreler rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek çözücüsünden kurtarılmıştır. CA için %21,418; CG için %31,214; CM için %31,339 ve CP için %25,492 oranında verim elde edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Citrus* meyve kabuklarının MeOH ekstrelerinin yüzde verimleri

<i>Citrus</i> türü	Verim (%)
CA	21,418
CG	31,214
CM	31,339
CP	25,492

Citrus aurantium (CA), *Citrus grandis* (CG), *Citrus medica* (CM) ve *Citrus paradisi* (CP)

CA, CG, CM ve CP meyve kabuklarından hazırlanan MeOH ekstrelerinin sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Ekstrelerin 100 µg/mL doza kadar 48 saat boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda anlamlı bir aktivitenin olmadığı belirlendiği için, test edilen en yüksek dozda dahi hücre canlılığının devam etmesi nedeniyle araştırılan dozlarda IC₅₀ hesaplanamamıştır. Bu nedenle, ekstraksiyon yönteminin değiştirilmesi yoluna gidilmiştir. Buna göre materyaller *n*-hekzandan başlanarak hem doğrudan hem de sekanslı bir şekilde artan polaritedeki çözücülerle ekstre edilmiştir. Doğrudan bitkisel materyalin *n*-hekzan, diklorometan (DCM) ve etil asetat (EtOAc) ile ham ekstreleri hazırlanmış, bununla birlikte, sekanslı bir şekilde *n*-hekzandan başlanarak, kalan bitki materyalinin EtOAc ve sonrasında MeOH ile ekstre edilmesiyle alt ekstreler hazırlanmıştır.

Artan polaritedeki çözücülerle sekanslı bir şekilde hazırlanan ekstreler (art arda ekstraksiyon)

n-Hekzan ham ekstresi

Kurutulmuş ve toz edilmiş *Citrus* türlerinin meyve kabukları tartılarak (10 g) üzerlerine doğrudan *n*-hekzan (200 mL) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar aynı hacimde *n*-hekzan ilave edilerek bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstrelerin rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek *n*-hekzandan kurtarılması sağlanmıştır. Böylece 4 türe ait 4 adet *n*-hekzan ham ekstresi elde edilmiştir.

EtOAc alt ekstresi:

n-hekzanlı ham ekstreler hazırlandıktan sonra kalan kısım kurutularak, üzerlerine EtOAc (200 mL) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar aynı hacimde EtOAc ilave edilerek bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstrelerin rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek çözücüsünden kurtarılması sağlanmıştır. Böylece 4 türe ait 4 adet EtOAc alt ekstresi elde edilmiştir.

MeOH alt ekstresi

EtOAc alt ekstresi hazırlandıktan sonra kalan bakiyeler kurutularak, üzerlerine MeOH (200 mL) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar aynı hacimde MeOH ilave edilerek bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstrelerin rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek çözücüsünden kurtarılması sağlanmıştır. Böylece 4 türe ait 4 adet MeOH alt ekstresi elde edilmiştir.

Diklorometan ve etil asetat ile hazırlanan ham ekstreler (doğrudan ekstraksiyon)

DCM ham ekstresi

Kurutulmuş ve toz edilmiş *Citrus* türlerinin meyve kabukları tartılmış (10 g) ve üzerlerine doğrudan DCM (200 mL) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar aynı hacimde DCM ilave edilmiş ve bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstrelerin rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek çözücüsünden kurtarılması sağlanmıştır. Böylece 4 türe ait 4 adet DCM ham ekstresi elde edilmiştir.

EtOAc ham ekstresi

Kurutulmuş ve toz edilmiş *Citrus* türlerinin meyve kabukları tartılmış (10 g) ve üzerlerine doğrudan EtOAc (200 mL) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar aynı hacimde

EtOAc ilave edilerek bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstrelerin rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek çözücüsünden kurtarılması sağlanmıştır. Böylece 4 türe ait 4 adet EtOAc ham ekstresi elde edilmiştir. Ekstreler tartılarak verim hesapları yapılmış ve Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. *Citrus* türlerinden farklı polaritedeki çözücülerle hazırlanan ham ve alt ekstrelerin verimleri

<i>Citrus</i> türü	Ekstre tipi	Verim (%)
CA	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	0,186
	DCM ham ekstresi	0,408
	EtOAc ham ekstresi	0,667
	EtOAc alt ekstresi	0,106
	MeOH alt ekstresi	9,241
CG	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	0,976
	DCM ham ekstresi	1,166
	EtOAc ham ekstresi	0,180
	EtOAc alt ekstresi	0,0864
	MeOH alt ekstresi	14,449
CM	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	0,101
	DCM ham ekstresi	0,813
	EtOAc ham ekstresi	0,728
	EtOAc alt ekstresi	0,089
	MeOH alt ekstresi	14,560
CP	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	0,467
	DCM ham ekstresi	0,745
	EtOAc ham ekstresi	1,286
	EtOAc alt ekstresi	0,079
	MeOH alt ekstresi	12,016

Citrus aurantium (CA), *Citrus grandis* (CG), *Citrus medica* (CM) ve *Citrus paradisi* (CP)

3.2.2. Fraksiyonlama

Aktivite çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda, çalışılan tüm *Citrus* türlerinin ham ekstrelerinin (*n*-hekzan, DCM ve EtOAc) aktif bulunduğu, en etkili ekstrenin CA EtOAc ham ekstresi olduğu tespit edildiği için, ileri çalışmalara, daha yüksek miktardaki CA kabuklarından EtOAc ham ekstresi hazırlanarak devam edilmiştir. Bu amaçla, kurutulmuş ve toz edilmiş CA meyve kabukları tartılmıştır (974,108 g) ve üzerine doğrudan EtOAc (5

L) ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında masere edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında süzülerek, kalan kısım üzerine tekrar aynı hacimde EtOAc ilave edilerek bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Süzülerek biriktirilen ekstrelerin rotavapor yardımıyla düşük sıcaklık ve basınçta distile edilerek çözücüsünden kurtarılması sağlanmıştır (41,018 g ekstre). Ekstre verimi %4,2108 olarak hesaplanmıştır.

CA EtOAc ham ekstresinin fraksiyonlandırılması amacıyla, düşük ekstre verimi göz önünde bulundurularak, devam eden izolasyon çalışmalarında madde kaybı yaşanmaması için Sephadex LH-20 (SP LH-20) kolon kromatografisi yöntemi tercih edilmiştir. CA EtOAc ham ekstresi “Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama” tekniği doğrultusunda önce SP LH-20 ve sonrasında silikajel kolon kromatografisi yardımıyla fraksiyonlandırılmıştır.

Sephadex LH-20 kolon kromatografisi

SP LH-20 (Sephadex™ LH-20, GE Healthcare) kolonu, CA EtOAc ham ekstresinin fraksiyonlanması amacıyla kullanılmıştır. İşlem esnasında 3 cm eninde ve 70 cm boyunda cam kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak DCM:MeOH (1:1) kullanılmıştır.

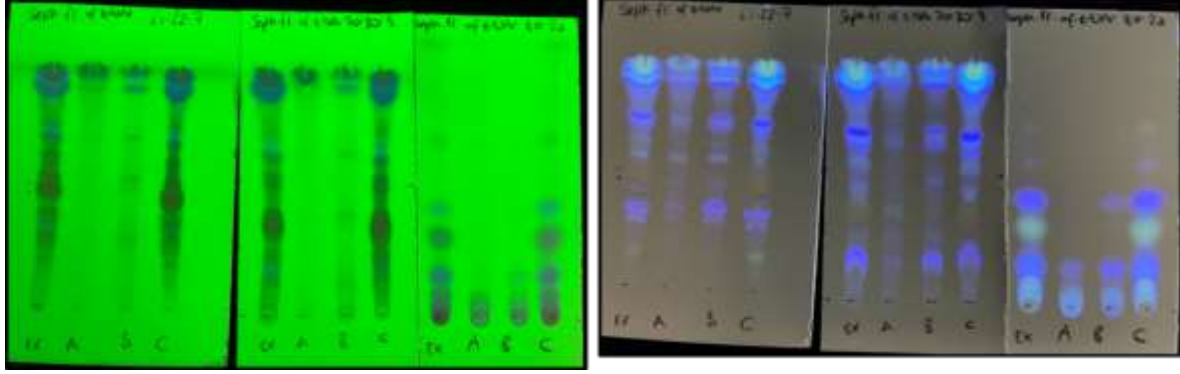
Kolonun hazırlanması:

Yaklaşık 60 g dolgu materyali, şişmesi ve doygun hale gelmesi için kolon hazırlanmadan bir gün önce DCM:MeOH (1:1) ile karıştırılıp bekletilmiştir. Süspansiyon halindeki dolgu materyali, alt kısmına pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmış ve üst kısımdan DCM:MeOH (1:1) ilave edilerek dolgu materyalinin oturması ve kolonun şartlandırılması sağlanmıştır.

Kolon kromatografisi için numune tatbiki ve elüsyon:

Ayrımı yapılacak 23 g EtOAc ekstresi az miktarda DCM:MeOH (1:1) karışımında çözünerek adsorban yüzeyine tatbik edilmiştir. Yüzeyin bozulmaması amacıyla adsorban üzerine pamuk yerleştirilmiştir. Mobil faz üstten ilave edilerek fraksiyonlama işlemleri tamamlanmıştır. Fraksiyonlar yaklaşık 25 mL olacak şekilde 20 tane 50 mL’lik erlene toplanmıştır. Toplanan yirmi fraksiyonun, normal faz silika jel plak (Merck F 254 20 x 20, 1.05554) kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile kontrolü yapılmış ve bu

fraksiyonlar madde gruplarının karakterine (molekül büyüklüğü/ağırlığı) göre 3 fraksiyonda birleştirilmiş ve yoğunlaştırılmıştır (SP FR.A: 2,6815 g, SP FR.B: 2,6216 g, SP FR.C 14,5943 g). İlgili ekstraların İTK profilleri Resim 3.1’de sunulmuştur.

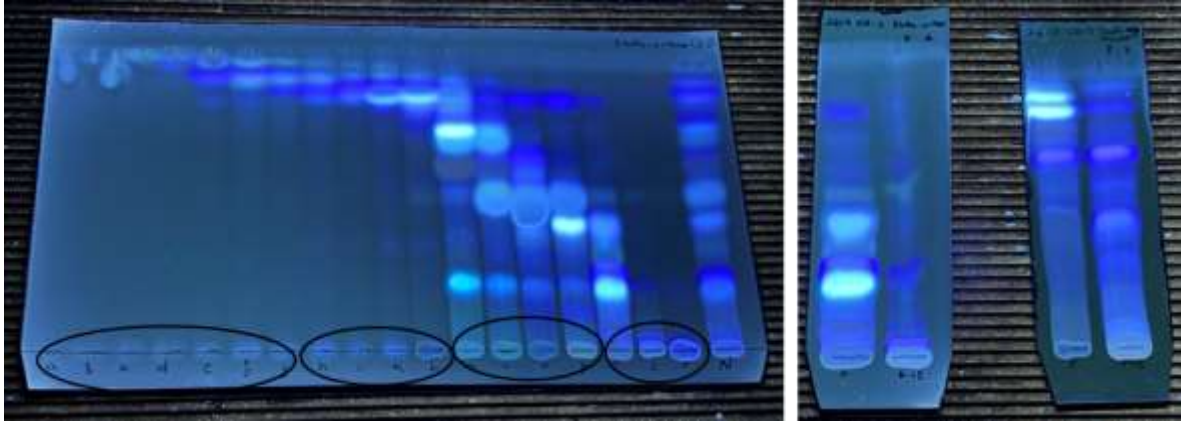


Resim 3.1. SP LH-20 kolonundan toplanan fraksiyonların, farklı çözücü sistemlerinde yürütüldükten sonraki UV 254 ve UV 366 dalga boylarındaki İTK görünümleri (Mobil faz: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$)

Sitotoksik aktivite deneyleri sonucunda, fraksiyonlar arasında görece en yüksek aktivite gösteren SP FR.A ve SP FR.B fraksiyonları birleştirilerek alt fraksiyonların elde edilmesi işlemlerine geçilmiştir.

Normal faz silika jel kolon kromatografisi

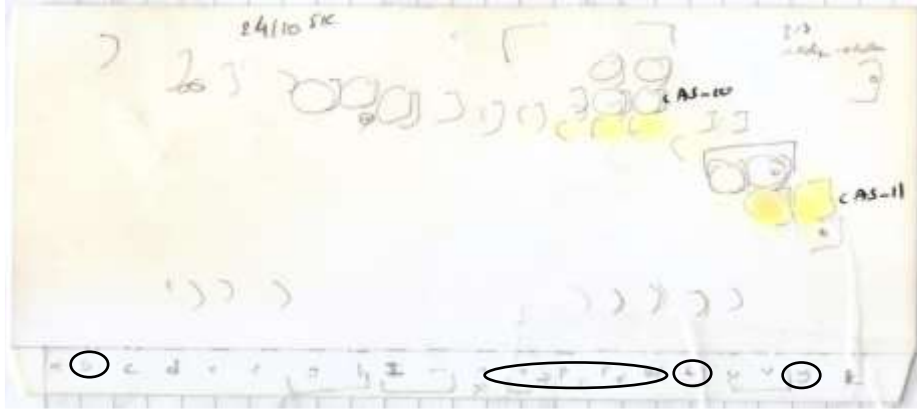
SP LH-20 kolondan alınan fraksiyonlar SP FR.A ve SP FR.B birleştirilerek (5,3 g), 4 x 100 cm boyutlarında ve yaklaşık 300 g silika jel (silica gel 60 (0.063-0200 mm)) kullanılarak, yeterli miktarda *n*-hekzan: EtOAc (2:8) yardımıyla hazırlanan cam kolona, kuru olarak (fraksiyon, uygun bir çözücüde tamamen çözülerek, uygun boyutlu bir kapsül içerisinde belli bir miktar silika jelle muamele edilip, sonrasında kurutularak hazırlanmıştır) tatbik edilmiştir. Elüsyon çözücü sistemleri maddelerin numuneyle, İTK takibi yapılarak, sırasıyla, *n*-hekzan:EtOAc (v/v; 8:2; 800 mL), *n*-hekzan:EtOAc (v/v; 1:1; 1000 mL), *n*-hekzan:EtOAc (v/v; 2:8; 500 mL), EtOAc (500 mL), EtOAc:MeOH (v/v; 8:2; 500 mL), EtOAc:MeOH (v/v; 1:1; 500 mL) ve MeOH (500 mL) şeklinde hazırlanarak, kolonun üst kısmına takılan çözücü haznesine, her çözücü, seviyesi kolonun üst kısmına geldiği zaman yavaşça ilave edilmiştir. Her fraksiyon yaklaşık 20 mL olacak şekilde 240 fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyonlar İTK ile belirlenen kimyasal profillerine göre 4 alt fraksiyonda birleştirilmiştir (Resim 3.2). Buna göre, Fr a-g, CASK-1 (1,3 g), Fr h-l, CASK-2 (730 mg), Fr m-p, CASK-3 (600 mg) ve Fr r-t, CASK-4 (1,4 g) olarak kodlanmıştır.



Resim 3.2. 26/7 SK kodlu Silika jel kolon sonucunda toplanan fraksiyonların, *n*-hekzan:EtOAc (2:8) ve son iki fraksiyonun EtOAc:MeOH (8:2) çözücü sisteminde yürütüldükten sonraki UV 366 altındaki İTK kromatogramı

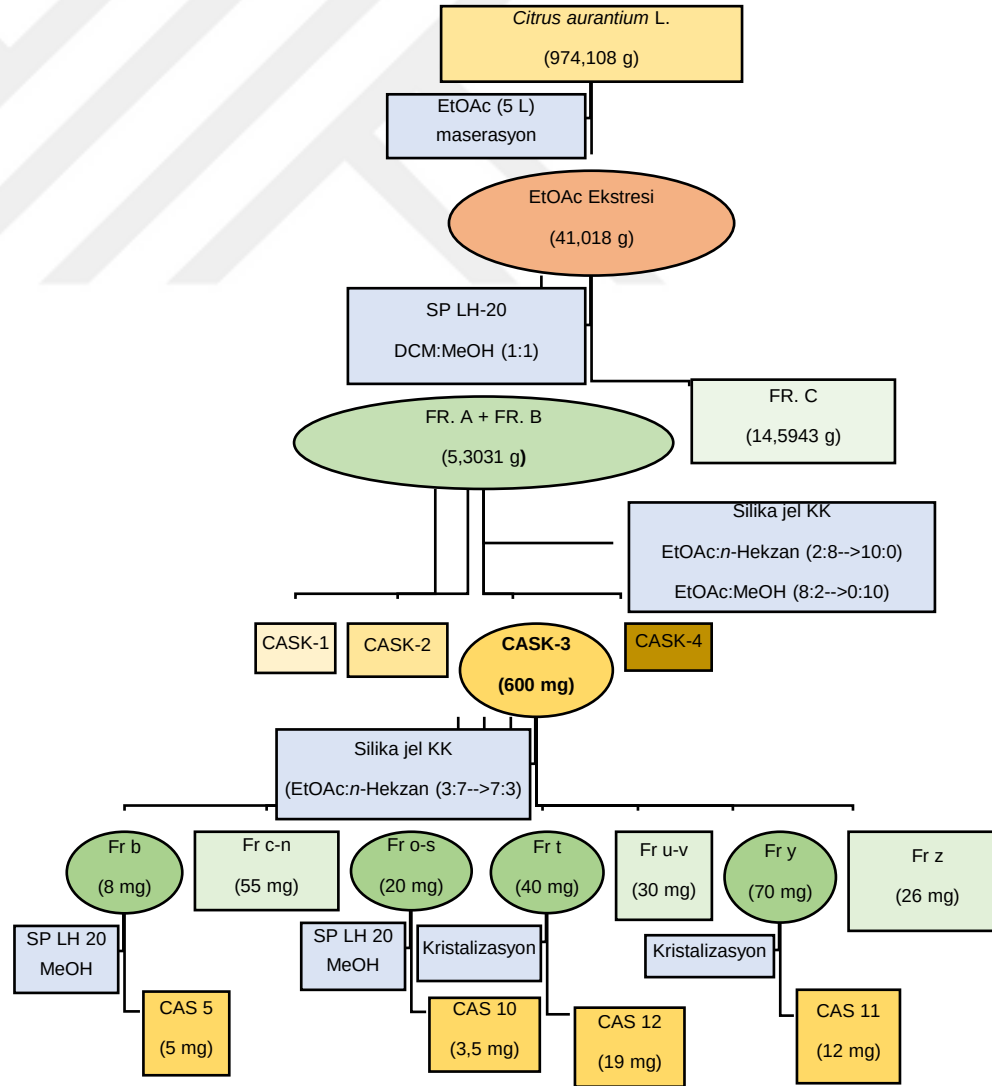
3.2.3. Saflaştırma ve izolasyon

In vitro sitotoksik aktivite sonuçlarına göre en yüksek etki gösteren CASK-3 alt fraksiyonu üzerinde saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 26/7 SK'dan alınan CASK-3 (600 mg), *n*-hekzan:EtOAc (7:3) çözücü sistemi ve çok az miktar MeOH kullanılarak çözülmüş ve bir enjektör yardımıyla (enjeksiyon hacmi 5 mL) 80 g'lık Sepacore silika jel hazır doldurulmuş kartuş kullanılarak fraksiyon toplayıcı ile entegre bir flash kromatografi sistemi kullanılarak (iki adet Buchi C-601 pompa sistemi (10 bar), C-660 fraksiyon toplayıcı sistemi ve C-620 kontrol ünitesi) ile fraksiyonlandırılmıştır (10 mL/min, 6-8 bar, 24/10 SK). Elüsyon çözücü sistemleri, sırasıyla, artan polaritede *n*-hekzan:EtOAc (v/v, 7:3; 400 mL), *n*-hekzan:EtOAc (v/v, 5:5; 800 mL), *n*-hekzan:EtOAc (v/v, 3:7; 400 mL) hazırlanarak ve her çözücü bitiminde elüsyonun durdurulması ve fraksiyonların İTK kontrolünün yapılması suretiyle sürdürülmüştür. Her fraksiyon yaklaşık 2-3 mL olacak şekilde toplam 660 fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyonlar İTK kromatogramlarına göre yıkama fraksiyonu ile birlikte 20 alt fraksiyonda toplanmıştır (Fra-z). Bu fraksiyonların İTK profili (UV 366 işaretlemeleri plak üzerinde sağ köşeli parantezlerle gösterilen ve plağın %30'luk H₂SO₄ (EtOH'de) reaktifi ile muamele edilip 110°C'ye ısıtıldıktan sonraki görüntüsü) Resim 3.3'te sunulmuştur. Fraksiyonların miktarı ve içerdiği maddelerin karakterleri göz önünde bulundurularak 20 alt fraksiyon uygun şekilde birleştirilerek fraksiyon sayısı 9'a düşürülmüştür. Buna göre, majör maddeleri taşıyan ve görece daha az kompleks olan 7 fraksiyon üzerinde izolasyon çalışmaları sürdürülmüştür.



Resim 3.3. 24/10 Silika jel kolon sonucunda toplanan fraksiyonların, *n*-hekzan:EtOAc (3:7) çözücü sisteminde yürütüldükten ve %30 H₂SO₄ (EtOH içerisinde) reaktifi ile muamele edilip 110°C’de ısıtıldıktan sonraki İTK kromatogramı

Fr b (8 mg), SP LH-20 kolonundan (1,5 x 40 cm) MeOH ile elüe edilmiş ve CAS 5 (5 mg) maddesi saf olarak elde edilmiştir. Aynı şekilde, Fr o-s (15 mg), SP LH-20 kolonundan (1,5 x 40 cm) MeOH ile elüe edilmiş ve CAS 10 (3,5 mg) maddesi saf olarak elde edilmiştir. Fr t (40 mg) ve Fr y (70 mg) 25 mL’lik balonlarda laboratuvar ortamında MeOH ve *n*-hekzan çözücü karışımlarıyla gece boyu uçmaya bırakılmıştır. Sonrasında, balonların çeperlerinde oluşan beyaz renkli düzgün olmayan kristaller, maddenin çözünmediği/az çözündüğü çeşitli organik çözücülerle (Et₂O, C₆H₆ vb.) yıkanarak alınmıştır. Bu yıkama işlemi birkaç saat arayla tekrar edilerek sırasıyla CAS 12 (19 mg) ve CAS 11 (12 mg) temizlenmiştir. Kolonun diğer fraksiyonlarından FR i-k (15 mg), Fr u-v (30 mg), Fr (z)’den preparatif İTK ile özellikle UV 366 aktif maddeler temizlenmeye çalışılmıştır ve bu fraksiyonlardan elde edilen ve CAS 6 (1,5 mg), CAS 7 (0,9 mg), CAS 8 (0,6 mg), CAS 9 (1 mg) ve CAS 13 (2,4 mg) kodlu maddelerin ¹H ve ¹³C NMR spektrumları alınmış, ancak madde miktarları ve maddelerde bulunan safsızlıklar, yapı tayinine olanak verecek düzeyde spektrumların elde edilememesine sebep olduğu için bu maddelere raporda yer verilmemiştir. Ancak yine de, bu maddelerin proton spektrumları incelendiğinde majör maddelerin kumarinlere ait karakteristik pikleri taşıdığı görülmüştür. Sonuç olarak, CASK-3 fraksiyonundan *in vitro* deneyler için yeterli düzeyde izole edilen ve yapısı tayin edilen CAS 5, CAS 10, CAS 11 ve CAS 12 elde edilmiştir. İzolasyon çalışmaları Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. CA meyve kabuklarının ekstraksiyon, fraksiyonlama ve izolasyon şeması

3.2.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile nobiletin miktar tayini*

İzole edilen bileşiklerden CAS 11 kodlu nobiletin bileşiği, *in vitro* sitotoksik aktivite deneylerinde, diğer bileşiklerden daha yüksek etki gösterdiğinden, bu bileşiğin *in vivo* deneylerde ekstre içindeki miktarı ile orantılı olacak şekilde deney hayvanlarına uygulanabilmesi için ekstre içindeki miktarının belirlenmesi amacıyla HPLC ile miktar tayini yapılmıştır.

Ekstreten $27,0 \pm 0,1$ mg tartılarak 10,0 mL MeOH içerisinde çözülmüştür (15 mL tüp). 1 dk vorteks uygulanmış ve daha sonra çözelti 30 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Çözeltinin 1 mL'si 0,45 µm enjektör filtreden süzülerek vialden alınmıştır. Bu vialden 200 µL alınarak 800 µL MeOH ile seyreltilip Agilent 1260 serisi HPLC sistemi ile analizi yapılmıştır. Miktar tayini için, 1-25 µg/mL aralığında 5 nokta nobiletin kalibrasyon çözeltisi MeOH içerisinde hazırlanmıştır. HPLC analiz koşulları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC Analiz koşulları

HPLC Koşulları	
Kolon	Agilent Poroshell SB-C18 (3,0 mm x 100 mm x 2,7 µm)
Kolon fırını	35°C
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Analiz süresi	24 dk
Mobil faz A	%0,1 formik asitli su
Mobil faz B	Asetonitril
Akış	0.6 mL/dk
Akış programı	0 dk-10 %B
	2 dk-10 %B
	10 dk-70 %B
	11 dk-95 %B
	17 dk-95 %B
	17,1 dk-10 %B
	24 dk-10 %B
UV Dalgaboyu	280 nm, 40 Hz

*HPLC çalışmalarımız TÜBİTAK-2209 programı tarafından desteklenen “*Citrus aurantium* L. Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Analiz Çalışmaları” başlıklı projemiz dahilinde yapılmıştır.

3.3. *In vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

Cirtus türlerinin farklı ekstre ve fraksiyonlarının ve aktif alt fraksiyondan izole edilen bileşiklerin meme kanserinde sitotoksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla, östrojen pozitif olan MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi uygulanmıştır. Aktif ekstre, fraksiyonlar ve bileşikler için MCF-7 ile elde edilen sonuçlar, sağlıklı insan meme hücresi MCF-10A ile karşılaştırılarak, etkinin seçiciliği de belirlenmiştir. Seçicilik indeksi (SI), test edilen bir bileşiğin normal ve kanser hücreleri arasındaki seçiciliğini gösteren bir indeks olup SI değerleri > 1 olan test bileşikler, kanser hücrelerine kanserli olmayan hücrelerden daha fazla toksik etki yarattığını göstermekte ve bu durum klinik olarak da istenmektedir (Badisa ve diğerleri, 2009). SI değeri, “ $SI = (\text{normal hücrelerin } IC_{50} \text{ değeri}) / (\text{kanser hücrelerinin } IC_{50} \text{ değeri})$ ” denklemi kullanılarak elde edilmiştir. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan MTT yönteminde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir (Van Meerloo, Kaspers ve Cloos, 2011).

3.3.1. Kültür şartları

MCF-7 hücreleri (ATCC) %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren DMEM besiyerinde, MCF-10A hücreleri ise 20 ng/mL epidermal büyüme faktörü, 500 ng/mL hidrokortizon, 10 µg/mL insülin, %10 FBS, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenen DMEM/Ham F12 ortamında 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde flasklarda kültüre edilmiştir. Bütün deneylerde büyüme fazındaki hücreler kullanılmıştır. Hücreler yeterli confluent düzeyine ulaştığında, hücreler deneye alınmadan önce tripan mavisi metodu ile canlı hücre sayımı yapılmıştır ve mililitredeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.3.2. Sitotoksosite protokolü

MTT yönteminde 96 çukurlu plakalarda her bir çukura 5000 hücre ekilmiştir. Hücre yoğunluğu %70-80 olduktan sonra hücrelerin besi yeri fenol kırmızısı içermeyen besi yeri ile değiştirilmiş, deney tasarımına göre artan konsantrasyonlarda ekstre, fraksiyon, alt

fraksiyon veya izole edilen bileşiklerin uygulamaları yapılmıştır. Doz seçimi Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) antikanser ilaç tarama programına göre seçilmiş olup bitkisel ekstre ve fraksiyonlarda 100 µg/mL en yüksek konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Boyd, 1997). Umut verici antikanser maddelerin izole bileşikler için IC₅₀ değerinin ≤ 4 µg / mL olması dikkate alınarak ise, izole bileşiklerde en yüksek konsantrasyon 20 µg/mL olarak planlanmıştır (Suffness, 1990). Deney tasarımına sadece hücreler ve besi yeri içeren (negatif kontrol) ve çözücüyü de içeren (çözücü kontrol) gruplar da eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak tamoksifen kullanılmıştır. Bu hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler yıkanarak, her bir çukura 200 µL taze besiyeri ve 50 µL 1 g/L konsantrasyondaki MTT çözeltisi eklenmiştir. Ardından hücreler 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası çukurlardaki karışım uzaklaştırılmış ve her çukura 160 µL DMSO ilave edilmiştir. Formazan kristallerinin çözülmesi için çalkalayıcıda 10 dakika bekletilmiştir. Plaka okuyucuda 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Sitotoksik aktivite deneyi her örnek için 3 kez, her seferinde en az ikili tekrarlar olarak çalışılmış ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Numunelerin sağlıklı hücrelerde yaptığı hasarı belirlemek amacı ile MCF-10A hücre hattı üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiş ve seçicilik indeksi hesaplanmıştır. MCF-10A (ATCC) hücre hattı temin edilmiş ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sağlıklı hücre olması nedeni ile, hücrenin kültür ortamı rutin ortamlardan farklı olarak çeşitli büyüme faktörlerini de içermiştir. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) : F12 besiyeri içinde %20 fetal bovine serum (FBS), %1 antibiyotik, 10 µg/mL insan insülini, 20 ng/mL epidermal büyüme faktörü (hEGF), 500 ng/mL hidrokortizon ile kültüre edilen hücreler uygun büyüme paterni göstermiştir.

3.3.3. Mikroskopta hücre morfolojisinin değerlendirilmesi

Hücreler ekildikten ve test maddeleri uygulandıktan sonra hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler faz kontrast mikroskop ile düzenli olarak kontrol edilmiştir.

3.4. *In silico* Biyolojik Aktivite Tahmin Çalışmaları

İzole edilmiş ve yapısı aydınlatılmış bileşikler, bilgisayar tabanlı biyolojik aktivite değerlendirmesi ile antikanser aktiviteleri açısından analiz edilmiştir. Bu amaçla PASS

(Prediction of Activity Spectra for Substances) programı kullanılmıştır (Filimonov ve diğerleri, 2014). Bu yazılım, organik ilaç benzeri bir molekülün genel biyolojik potansiyelini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Molekülün 3500'den fazla aktivite türü için tahminini yaparak belirli aktif bileşik sınıflarına ait olma olasılığını belirlemektedir. Çalışmada hedeflenen antikanser etkide rol oynayabilecek biyolojik aktiviteler temel alınarak ilgili biyolojik aktivite için aktif olma olasılıkları (Pa) belirlenmiştir. Etki sıralamasında (Pa-Pi) değerleri dikkate alınarak sıralama yapılmıştır. Tanımlanan bileşikler PASS yazılımına basitleştirilmiş moleküler girdi hattı giriş sistemi kullanılarak girilmiştir. Bu yazılım, ilgili bileşiğin araştırılan aktiviteyi taşıma olasılığını tahmin etmesinin yanı sıra *in vivo* etkisi gösterilmiş bileşiğin “yeni ilaç molekülü” olma özelliğini de göstermektedir. *In silico* analizlerde PASS biyolojik aktivite programının yanı sıra mutajenite son noktasına yönelik olarak yaygın kullanımı bulunan, VEGA QSAR Mutajenite konsensüs modeli, ToxTree (SAR) mutajenite modeli ve ToxRead (Read-across) yaklaşımları ile mutajenik aktivite değerlendirmeleri de yapılmıştır.

3.5. *In vivo* Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.5.1. Deney hayvanları

Araştırmada 21 günlük 40-50 g ağırlığında inbred Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, 21-24°C sıcaklık, %45-55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan bakım odalarında barındırılmıştır. Çalışma için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik izin alındı (karar no: 2020/04).

3.5.2. Deney hayvanlarında tümör indüksiyonu ve uygulanan tedaviler

Deney hayvanlarına 1 mL %0,9 NaCl içerisinde çözünmüş N-metil-N-nitrozoüre (NMU) 50 mg/kg tek doz, intraperitoneal (*i.p.*) yolla uygulanarak östrojen pozitif meme tümörü modeli oluşturulmuştur (Belobrajdic ve McIntosh, 2000). Kontrol grubunda 6 hayvan, diğer grupların her birinde 8 hayvan olacak şekilde Çizelge 3.5'te belirtildiği gibi rastgele 7 gruba ayrılmıştır.

Sham grubundaki hayvanlar sağlıklı sıçanlar olup, herhangi bir tedavi ve/veya NMU uygulanmamıştır. Kontrol grubundaki sıçanlarda tümör modeli oluşturulmuş ancak herhangi bir tedavi protokolü uygulanmayıp, test materyallerinin hazırlanmasında taşıyıcı olarak kullanılan %0,5 CMC çözeltisi dahilen (*p.o.*) uygulanmıştır. Referans grubuna ait sıçanlara kemoterapötik etkinliği bilinen tamoksifen 10 mg/kg dozda; *C. aurantium* meyve kabuklarının EtOAc ekstresi 500 mg/kg dozda; bu ekstreden elde edilen fraksiyon, alt fraksiyon ve bileşik gruplarına ise *in vitro* deneylerde en etkili bulunanlar, sırasıyla SP FR.A+B, CASK-3 ve CAS-11 (nobiletin) doz verim hesabı yapılarak 8 hafta boyunca dahilen (*p.o.*) uygulanmıştır.

Çizelge 3.5. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

Grup adı	Uygulama
Sham	Hiçbir uygulamanın yapılmadığı grup
Kontrol	NMU 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) ile tümör indüksiyonu %0,5 Karboksimetil selüloz (CMC) sulu çözeltisi (<i>p.o.</i> , 8 hafta)
Referans	NMU 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) ile tümör indüksiyonu Tamoksifen (10 mg/kg, <i>p.o.</i> , 8 hafta)
Ekstre	NMU 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) ile tümör indüksiyonu <i>C. aurantium</i> meyve kabuklarının EtOAc ekstresi (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , 8 hafta)
SP FR.A+B	NMU 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) ile tümör indüksiyonu <i>In vitro</i> deneylerde en etkili bulunan fraksiyon (SP FR.A+B) (115,25 mg/kg, <i>p.o.</i> , 8 hafta)
CASK-3	NMU 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) ile tümör indüksiyonu <i>In vitro</i> deneylerde en etkili bulunan alt fraksiyon (CASK-3) (13,05 mg/kg, <i>p.o.</i> , 8 hafta)
Nobiletin	NMU 50 mg/kg (<i>i.p.</i>) ile tümör indüksiyonu <i>In vitro</i> deneylerde en etkili bulunan bileşik (nobiletin) (12,65 mg/kg, <i>p.o.</i> , 8 hafta)

In vivo deneylerde kullanılacak ekstre dozu (500 mg/kg) ve uygulama süresi (8 hafta) literatür bilgileri ışığında planlanmıştır (Jose, Amathi, Sathyamurthy ve Kumar, 2013; A. Kim, Im, Gu ve Ma, 2016; Malleshappa, Kumaran, Venkatarangaiah ve Parveen, 2018; Muhtadi, Azizah, Suhendi ve Yen, 2015). Fraksiyon (SP FR.A+B) ve alt fraksiyonun (CASK-3) elde edilen miktarlarının ekstre içerisinde bulunma yüzdeleri sırasıyla %23,05 ve %2,61 olarak; nobiletinin ise HPLC yöntemi kullanılarak ekstredeki miktarı $2,53 \pm 0,06$ olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, nobiletinin antitümör etkisinin değerlendirildiği önceki çalışmalar da detaylı şekilde araştırılmış (Kohno ve diğerleri, 2001; Saruhan ve Dereli, 2016; Suzuki ve diğerleri, 2004; Tang ve diğerleri, 2011) ve çalışmalara, bileşiğin

deney hayvanlarına doz verim hesabı yapılarak uygulanması doğrultusunda devam edilmiştir. Fraksiyon, alt fraksiyon ve nobiletinin yüzde verimleri, test edilecek ekstre dozu (500 mg/kg) ile oranlanarak, deney hayvanlarına uygulanacak dozların sırasıyla 115,25 mg/kg; 13,05 mg/kg ve 12,65 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Ekstre, fraksiyon (SP FR.A+B) ve alt fraksiyonun (CASK-3) *in vivo* deneyler için gerekli olan miktarlarda elde edilebilmesi amacıyla, kurutulmuş kabuklarından (5900 g) miktar arttırma çalışması yapılmış, daha önce izlenen protokole birebir uymak ve her aşamda İTK kontrolü yapmak suretiyle, ekstre, fraksiyon ve alt fraksiyon tekrar elde edilmiştir. Nobiletinin *in vivo* deneylerde uygulanabilmesi amacıyla, ticari ürün satın alınarak deneylere devam edilmiştir.

3.5.3. *In vivo* deneysel prosedür

NMU uygulaması sonrası 6 çift meme bezi haftalık olarak muayene edilmiş, tümöral oluşumların varlığı inspeksiyon, palpasyon ile belirlenmiş ve tümör büyüklüğü 200 mm³ hacime ulaşan hayvanlarda tedavi protokolüne başlanmıştır. Tedavi protokolü başladıktan sonra hayvanların ağırlık değişimleri, tümör hacimleri ve genel sağlık kontrolleri haftalık olarak kontrol edilerek uygulamalara devam edilmiştir. Protokolün son günü tüm hayvanlar ksilazin (10 mg/kg/*i.p.*) ve ketamin (80 mg/kg/*i.p.*) derin genel anestezisi altında kalpten kan alınarak kurban edilmiş ve tüm meme dokuları diseksiyon yöntemi ile çıkarılarak biyokimyasal, immünohistokimyasal, rutin histopatolojik analizler ve gen analizleri için uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Tüm hayati organlar metastaz yönünden makroskopik olarak değerlendirilmiştir. Metastaz görülen organlarda da histopatolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.6. Biyokimyasal Analizler

Anestezi protokolünü takiben toraks açıldıktan sonra intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırılmış ve eppendorf tüplerine alınarak analizler yapılınca kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Bu amaçla, daha önceki çalışmalarda meme tümörü ile ilişki olduğu rapor edilmiş biyokimyasal parametrelerin (kanda interferon (IFN)-gama, yardımcı (CD4⁺) ve sitotoksik (CD8⁺) T hücreleri ve dokuda CXCL-9, CXCL-10 ve CXCL-11) düzeyleri belirlenmiştir (Cheng ve Lopez, 1998). Biyokimyasal analizler için türe spesifik uygun kitler tercih edilmiş (BT-lab, Cat.No: E0103Ra, E1911Ra, E0045Ra, E1935Ra, E1188Ra, E1186Ra) ve üretici firmanın

kullanım talimatlarına göre ELISA yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu doğrultuda, antikorlar ile önceden kaplanmış plakalardaki kuyucuklara numunelerde bulunan kemokinlerin, Streptavidin-HRP eklenmesiyle biotinlenmiş antikorlara bağlanması sağlanmış ve inkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Substrat çözeltisi eklenerek kemokin miktarıyla orantılı renk oluşumu sağlanmış, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle reaksiyon sonlandırılarak örneklerin absorbansları 450 nm’de ölçülmüştür.

3.7. Gen Ekspresyon Analizleri

Gen ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla alınan doku örneklerinden toplam RNA ve cDNA izolasyonu ve Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleri aşağıdaki prosedürler dâhilinde yapılmıştır.

3.7.1. Toplam RNA ekstraksiyonu

50 mg doku numunesi mikrosantrifüj tüpüne alınarak, zirkonyum boncuk varlığında 6 µL merkaptotanol ilavesiyle 600 µL LBD solüsyonu eklenmiştir. Numune ve tampon solüsyonu konulmuş tüpler Allsheng homojenizatör cihazında 30 sn boyunca 3200 rpm’de 2 defa homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi ardından 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 15 sn flash spin yapılarak süpernatant kısmı spin kolona aktarılmıştır. Spin kolon 8000 x g de 1 dk santrifüj yapılarak atık tüpü değiştirilmiştir. Kolona 500 µL WBD-1 solüsyonu eklenmiş ve 8000 x g de 1 dk santrifüj yapılarak atık tüpü değiştirilmiştir. İşleme, kolona 500 µL WBD-2 solüsyonu eklenerek 8000 x g de 1 dk santrifüj edilerek devam edilmiştir. Atık tüp yenisi ile değiştirilerek bu adım tekrarlanmıştır. Kolon temiz 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılacak üzerine 50 µL EBD solüsyonu eklenmiş ve elüsyon işlemi tamamlanmıştır. Elde edilen toplam RNA kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.7.2. Nükleik asit ölçümleri

Thermo NanoDrop Microvolume Spectrophotometer cihazı kullanılarak numunelerin RNA ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Cihazda nükleik asit sekmesi seçilerek ölçüm birimi RNA-40 olarak ayarlanmıştır. Körlleme için elüsyon tamponu eklenmiştir. Körlleme ardından

numunelerin nükleik asit ölçümleri her bir numune için 2 µL olacak şekilde ölçülmeye devam edilmiştir. Ölçüm sonrasında cDNA işlemleri için her bir numune 250 ng/µL olacak şekilde sabitlenmiştir.

3.7.3. Revers transkriptaz işlemi

RNA ekstraksiyonları tamamlanarak 250 ng/µL sabitlenen numuneler degradesyonun önüne geçmek için buz üzerine alınmıştır. Revers transkripsiyon işlemi için Sensifast cDNA kit protokolüne uygun olarak toplam RNA 1 µL, 5x transAMP buffer 4 µL, revers transkriptaz 1 µL ve ddH₂O 14 µL olacak şekilde toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. cDNA karışımı Abi Veriti 96 (Thermo, ABD) cihazında transkripsiyon koşulları 25°C 10 dk, 42°C 15 dk ve revers transkripsiyon enzimi inhibe etmek için 85°C 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. Real time PCR mRNA gen ekspresyon analizleri

Numunelerden elde edilen cDNAların her bir gen bölgesi için PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. PCR koşullarında gen bölgelerinin tasarımlarından dolayı bağlanma sıcaklıkları değişiklik gösterebilir. cDNA'ların PCR işlemleri için 1 µL cDNA, 2x SensiFAST SYBR[®] No-ROX Mix, her bir gen bölgesi için forward primer (10 µM) 1 µL, revers primer (10 µM) 1 µL ve su 7 µL olacak şekilde toplam 20 µL hacimde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Real time PCR amplifikasyon koşulları ilk denatürasyon 95°C 5 dk, 40 döngü 95°C 10 sn, 55°C (ER-alpha_ESR1, ER-beta_ESRRB, GM-CSF-CSF2); 61°C (PGR ve BAX); 63°C [(Anti-apoptotik protein (BCL2) ve ACTB)] 30 sn (real time okuma) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Cihaz Ct sonuçlarının normalizasyon işlemi ardından FC hesaplamaları yapılmıştır. Primer dizini Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Primer dizini

Hedef Gen	Forwarded primer (5'-Diziler-3')	Revers primer (5'-Diziler-3')
GM-CSF	GTGCTCTGGAGAACGAAA	CGTAGACCCTGCTTGTAT
Bax	TTTGCTACAGGGTTTCAT	GAGTCTGTATCCACATCA
Bcl2	GATGACTGAGTACCTGAA	AGGAGAAATCAAACAGAG
Östrojen α	GACAGGAATCAAGGTAAA	TACACTCCAGAATTAAGC
Östrojen β	CCAACTCAGATTCAATGT	GTTTCACACTGTAGAAGT
Progesteron	AATCCTGAATGAGCAGAG	ATTGTGTAAAGAAGAAGTAAGA
β-Actin	GAAGATCAAGATCATTGCTCCT	TGGAAGGTGGACAGTGAG

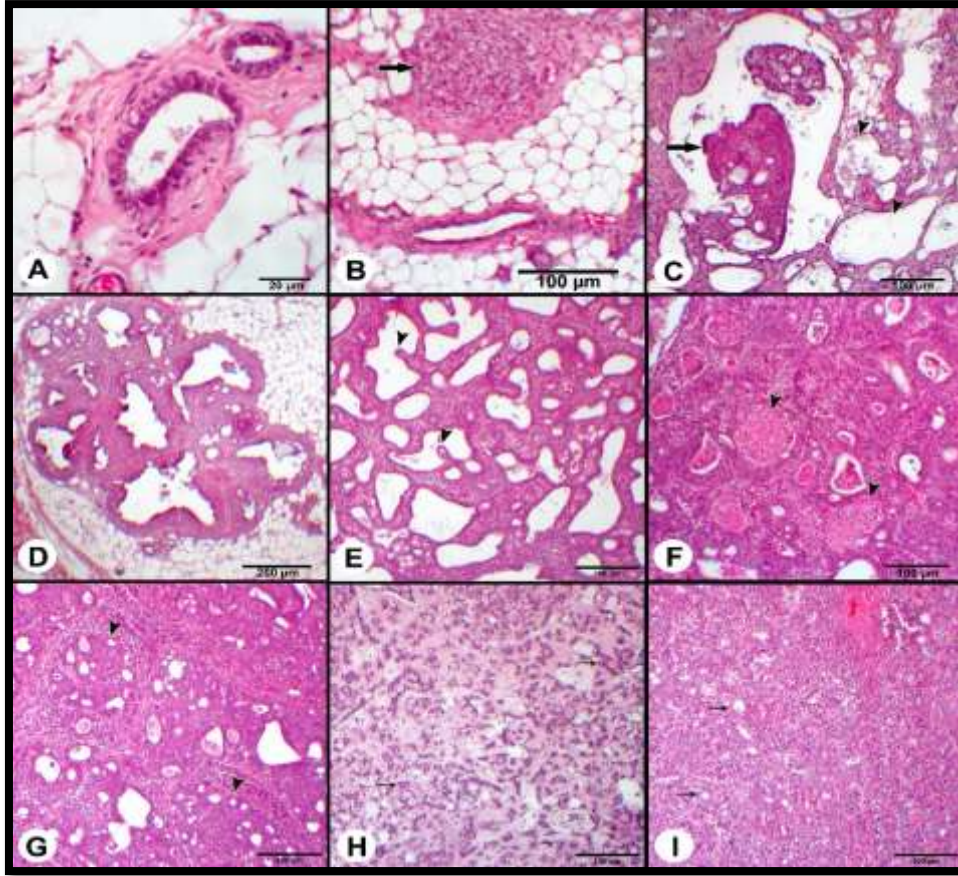
3.8. Histopatolojik Analizler

Sakrifiksasyonun ardından alınan meme bezleri ve tümöral dokular 48 saat süre %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlanmıştır. Parafin bloklardan alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler Hematoxylin Eosin (HE) yöntemleri ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenerek (Russo ve Russo, 2000) tarafından yapılan sisteme göre sınıflandırılmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Sıçan meme bezi tümörlerinin sınıflandırılması

I. Epitelyal neoplazmalar				
A. İyi huylu lezyonlar				
1. İntraduktal papillom				
2. Papiller kistadenom				
3. Adenom				
(a) Tubuler			(b) Laktasyon	
B. Kanser öncesi lezyonlar				
İntraduktal proliferasyon (IDP)				
C. Malign lezyonlar				
1. Noninvaziv- <i>in situ</i> -karsinom				
(a) Duktal papiller		(b) Duktal solid ve kribriform		(c) Duktal komedo
2. İnvaziv karsinom				
a) Papiller		(b) Kribriform		(c) Komedo
		(d) Tubuler		(e) Kistik Adenoid
II. Stromal neoplazmalar				
A. Benign: fibrom				
B. Malign: fibrosarkom				
III. Epitelyal-stromal neoplazmalar				
A. Benign: fibrom				
B. Malign: fibrosarkom				
IV. Neoplastik olmayan lezyonlar				
Kistik değişiklikler				
(a) Duktal			(b) Lobüler	

Ayrıca, histopatolojik sınıflandırılmada, göz önünde bulundurulmuş lezyon kriterleri Resim 3.4'de verildiği gibi değerlendirilmiştir.



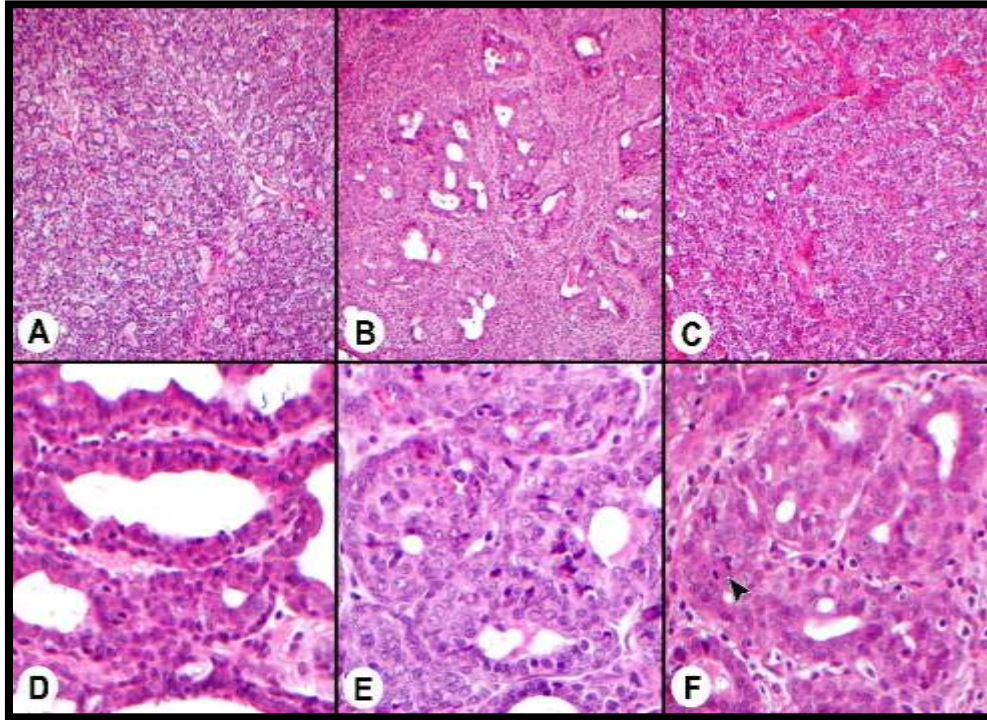
A. Duktus laktiferusun normal histolojik görünümü, **B.** Atipik duktal hiperplazi (ok), **C.** Papiller kist adenom (duktus epitelinde papiller hiperplazi (büyük ok) ve bezlerde kistik dilatasyon (ok başları)), **D.** Noninvaziv duktal karsinoma insitu, etrafı bağ doku ile sınırlandırılmış duktuslarda dilatasyon ve hiperplastik duktus epitelinin lümene doğru papiller tarzda gelişimi, **E.** İnvaziv papiller karsinom (ok başları: lümene doğru uzanan papiller oluşumlar), **F.** İnvaziv komedo karsinom (ok başları: tümör hücreleri merkezinde nekrotik odaklar), **G.** İnvaziv kribriform karsinom (ok başları: tümör adacıklarında hücre kordonlarının oluşturduğu boşluk tarzında elek benzeri yapılar), **H.** İnvaziv kistik adenoid karsinom (küçük oklar: geniş musin alanları arasında küçük, hiperkromatik nükleuslu hücre kümeleri), **I.** İnvaziv tubuler karsinom (küçük oklar: tubul formasyonları)

Resim 3.4. Histopatolojik sınıflandırmada dikkat edilen lezyon kriterleri

Ek olarak, malignite saptanan tümörler modifiye Scarff-Bloom-Richardson (SBR) Derecelendirme Sistemine göre (Çizelge 3.8 ve Resim 3.5) değerlendirilerek diferansiyasyon dereceleri belirlenmiştir (Bloom ve Richardson, 1957). Buna göre; tübul oluşumu, çekirdek boyutu ve mitotik figür 1-3 arası skorlanmış ve her kategori ayrı olarak hesaplanmıştır. Skor puanları toplamına göre tümörler; grade-1 (skor: 3-5), grade-2 (skor: 6-7), grade-3 (skor: 8-9) olarak derecelendirilmiştir. Mitotik figürlerin değerlendirilmesinde, mikroskopta 40'lık büyütmede rastgele 10 alanındaki mitotik figürler sayılmış ve SBR klasifikasyonuna göre 0-7 arası:1, 8-14 arası: 2, 15'ten fazla: 3 olarak skorlanmıştır.

Çizelge 3.8. SBR Derecelendirme Sistemi

Tübül Oluşumu	Puan
%75 ten daha fazla	1
%10-70 arasında	2
%10 dan daha az	3
Çekirdek Boyutu	Puan
Küçük Düzenli Çekirdek	1
Normal hücrelerden boy ve yapıda orta ölçekli farklılaşma (1,5-2 kat)	2
Belirgin farklılaşma (2 kattan fazla)	3
Mitotik Figür	Puan
0-7 arası	1
8 ile 14 arası	2
15 ya da daha fazla	3



Tübül oluşumu; A. %75 ten daha fazla; **B.** %10-70 arasında; **C.** %10 dan daha az; **Çekirdek Boyutu; D.** Küçük Düzenli Çekirdek; **E.** Normal hücrelerden 1,5-2 kat büyük; **F.** 2 kattan fazla çekirdekte büyüme, mitotik figür (ok başı) x 200 HE.

Resim 3.5. SBR Derecelendirme Sistemine göre değerlendirme kriterleri

3.9. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal analizler için Avidin-Biotin-Peroksidaz metodu kullanılmıştır (Chan, Lu, Merchant, Iglehart ve Miron, 2005). Parafin bloklardan alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler, ksilen ile deparafinize edildikten sonra dereceli alkol serileri içerisinde geçirilerek suyu giderilmiştir. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması için 0,01 M sodyum sitrat içerisinde 20 dakika inkübe edildikten sonra, fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için PBS ile hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit içerisinde 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Nonspesifik bağlanmalar %1 normal keçi serumunda 1 saat bekletilmiştir. Ardından kesitlere PBS'de değişik oranlarda dilüe edilen *östrojen (ER-α)* (Novus Bio, Cat no: NB100-81909), *progesteron* (Termo Fisher, Cat no: PA5-94983), *pansitokeratin* (Novus Bio, Cat no: NBP1-78278), *vimentin* (Thermo Fisher, Cat no: PA5-27231), *laminin* (Thermo Fisher, Cat no: PA1-16730), *E-kaderin* (Novus Bio, Cat no: NBP2-16258), *epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)* (Novus Bio, Cat no: NBP1-84815), *P-63* (Novus Bio, Cat no: NBP1-85571) ve *Ki-67* (Bioss, Cat no: BS-2130R) primer antikorlar ile 1 gece süre ile 4°C'de inkübe edilmiştir. Tekrar PBS'de yıkanan kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından dokular PBS ile yıkanarak ve streptavidin peroksidaz ile 10 dakika boyunca muamele edilmiştir. Renk ortaya çıkarıcı substrat olarak DAB (3,3'-diaminobenzidin) kullanılmıştır. Bu solüsyon kesitler üstüne uygulandıktan sonra renk değişikliği oluşmaya başladığı anda reaksiyon durdurularak, son aşamada ise kesitler Mayer Hematoksilen ile 2 dakika süre ile boyandıktan sonra musluk suyunda yıkanarak alkol ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile lamel kapatılarak ışık mikroskopunda uygun büyütmede incelenerek değerlendirilmiştir. Ki-67 dışında immunohistokimyasal boyanmaların değerlendirilmesi amacıyla immunreaktivitenin yaygınlığı (0.1: ≤ %25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturulmuştur (histoskor = yaygınlık x şiddet) (Pula ve diğerleri, 2013). Proliferasyon indeksi olarak kullanılan Ki-67 immun boyamanın değerlendirilmesinde ise her hayvana ait tümör kesitlerinde 200'lük büyütmede rastgele 5 farklı alanın fotoğrafı çekilerek ve çekirdeği koyu kahve renkte Ki-67 pozitif tümör hücreleri sayılarak proliferasyon indeksi hesaplanmıştır.

3.9.1. TUNEL boyama

Apoptozis tespiti için TUNEL ((Terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) dUTP çentik uç etiketleme)) boyama yöntemi kullanılmıştır (Pula ve diğerleri, 2013). Bu amaçla, TUNEL Apoptozis kiti kullanılmış ve üretici firmanın (Roche TUNEL Apoptozis kiti (*In situ* cell death detection kit; Roche Diagnostics, Cat No: 11 684 817 910) prosedürüne göre yapılmıştır. Kesitler deparafinizasyon, dehidrasyon ve rehidrasyon aşamalarının ardından 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. Kesitler H₂O₂ solüsyonunda 10 dakika bekletildikten sonra, 0,01 M sodyum sitrat tamponlu çözeltisinde 5 dakika orta, 1 dakika yüksek olmak üzere mikrodalgada kaynatılmıştır. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanan dokuların etrafı immunopen ile çizilmiştir. Ardından kesitler %3'lük BSA (Bovine Serum Albumin) ile 20 dakika oda ısısında muamele edilmiştir. TUNEL mixture karışımı hazırlanarak kesitler 1 saat süre ile nemli karanlık ortamda 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile yıkanan kesitler %3'lük BSA'da 20 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Kesitler Converted-Pod solüsyonu ile 30 dakika muamele edilmiştir. PBS ile yıkanan kesitlere renk ortaya çıkarıcı substrat olarak AEC (3 amino-9-etilkarbazol) kromojende 5 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanan kesitler Mayer Hematoksilen ile 30 saniye boyandıktan sonra çeşme suyunda yıkanarak gliserin jel ile lamel kapatılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Her hayvana ait tümör kesitlerinde 200'lük büyütmede en yoğun boyanma gösteren 5 farklı alanın fotoğrafı çekilerek ve çekirdeği koyu kırmızı renkteki TUNEL pozitif tümör hücrelerinin yüzdesi belirlenerek apoptotik indeks hesaplanmıştır (Pula ve diğerleri, 2013). Daha sonra apoptotik hücre indeksi ve histoskor değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel açıdan değerlendirilme yapılmıştır.

3.10. İstatistiksel Analiz

Bulgular ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak hesaplanmıştır. Test ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar, ANOVA, Students-Newman-Keuls *post-hoc* testlerinin Tek yönlü analizi, GraphPad Prism 8 Yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

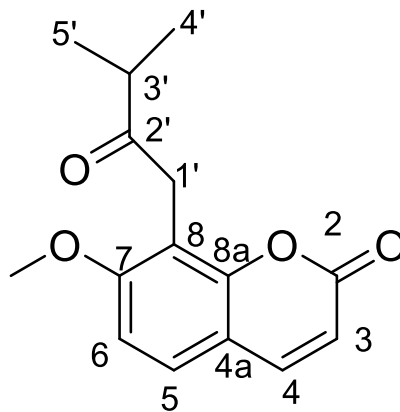
4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

4.1.1. İzolasyon çalışmaları

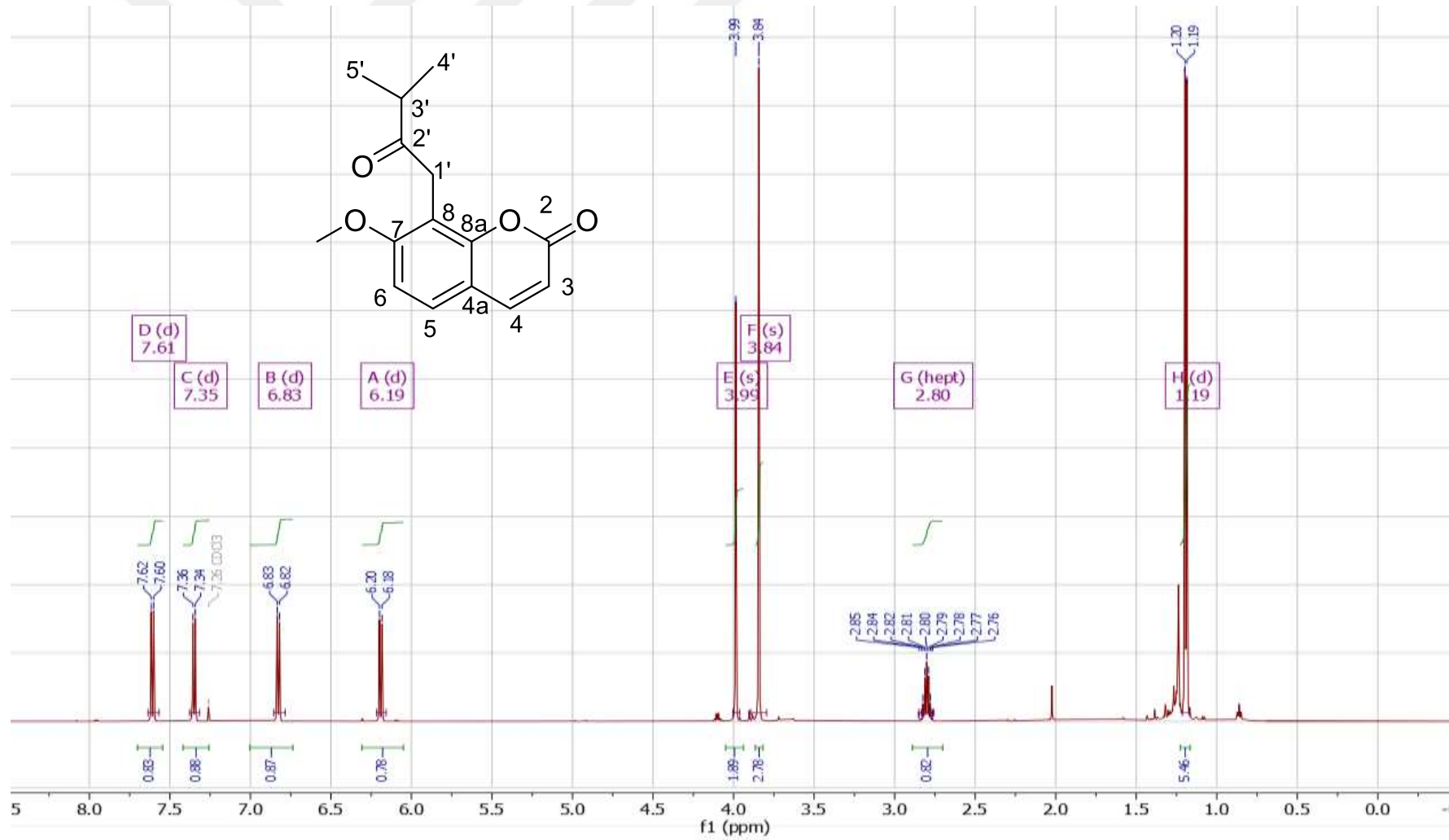
In vitro sitotoksik aktivite sonuçlarına göre, en yüksek etki gösteren CASK-3 alt fraksiyonu üzerinde saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna göre, CASK-3'ten tekrarlayan kromatografik yöntemlerle, 1 adet kumarin; izomeranzin (**CAS 5**) (Imai, Kinoshita ve Sankawa, 1989), 3 adet metoksilli flavonoit; 3-metoksi nobiletin (**CAS 10**) (Ito, 1998), nobiletin (**CAS 11**) (Uckoo, 2011) ve tangeretin (**CAS 12**) (Uckoo, Jayaparakasha ve Patil, 2011) izole edilerek yapıları 1D, 2D NMR yöntemleriyle karakterize edilmiş ve literatür datalarıyla doğrulanmıştır. Metoksilli flavonoit türevleri olan CAS 10, CAS 11 ve CAS 12'nin özellikle A halkasında yer alan 6 ve 8 numaralı karbonların kimyasal kayma değerleri, HMBC spektrumu yardımıyla metil gruplarının etkileştiği karbonlar dikkate alınarak atfedilmiştir. Bu değerler, sonrasında ilgili literatür verileriyle de doğrulanmıştır. Bileşiklere ait proton ve karbon 1D ve 2D NMR ve MS verileri, Çizelge 4.1-4.4 ve Şekil 4.1-4.20'de sunulmuştur.

İzomeranzin (CAS 5)

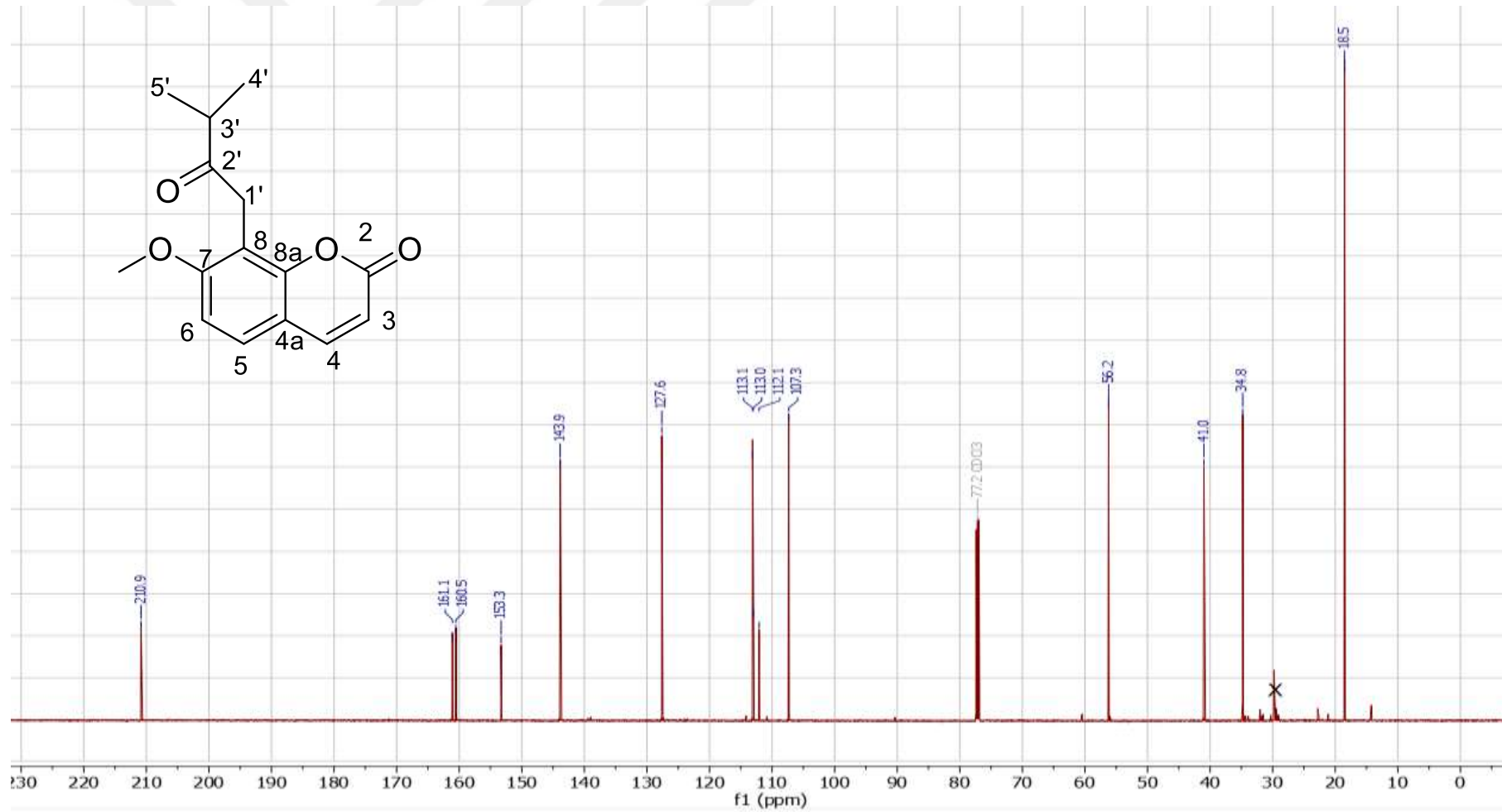


Çizelge 4.1. CAS 5 bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CDCl_3 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H : 600 MHz)

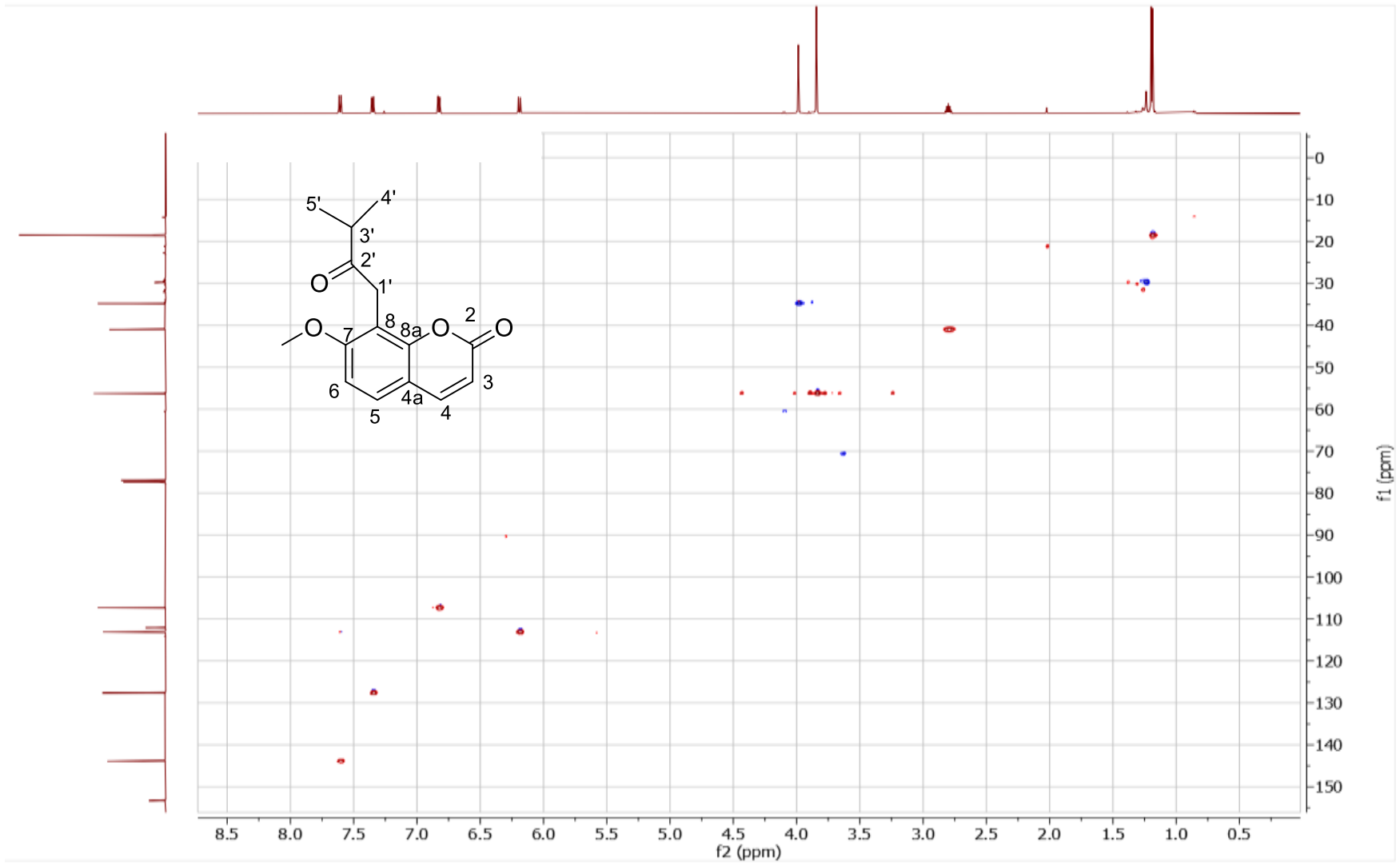
C No	C/H	C (δ in ppm)	H (δ in ppm, J in Hz)
2	C	161,1	
3	CH	143,9	6,19 (d, $J = 9.5$)
4	CH	113,1	7,61 (d, $J = 9.4$)
4a	C	112,1	
5	CH	127,6	7,35 (d, $J = 8.6$)
6	CH	107,3	6,83 (d, $J = 8.6$)
7	C	160,5	
8	C	113,0	
8a	C	153,3	
1'	CH_2	34,8	3,99 (s)
2'	C	210,9	
3'	CH	41,0	2,80 (hept, $J = 6.9$)
4'	CH_3	18,5	
5'	CH_3	18,5	1,19 (d, $J = 7.0$)
OMe		56,2	3,84 (s)



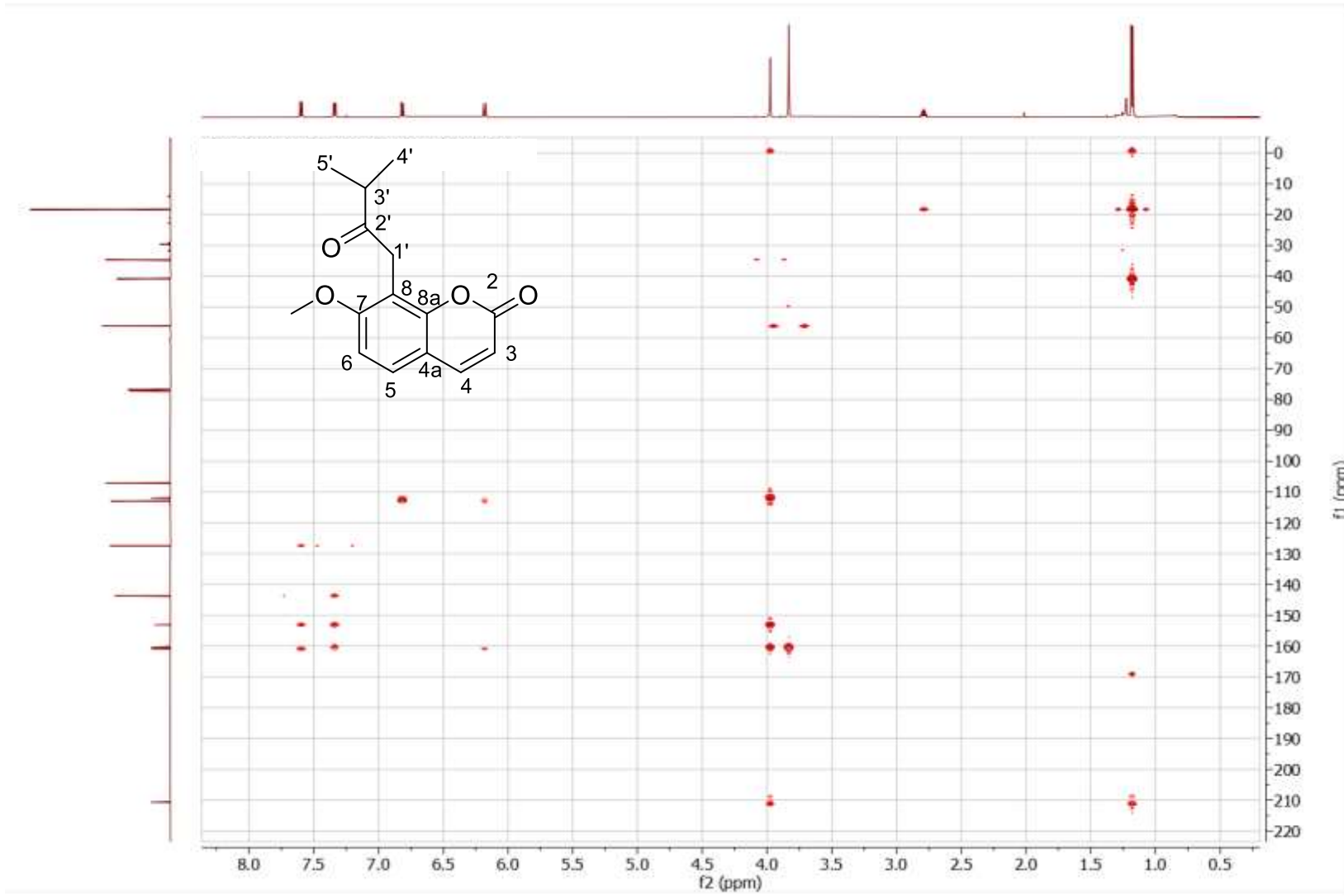
Şekil 4.1. CAS 5 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl_3)



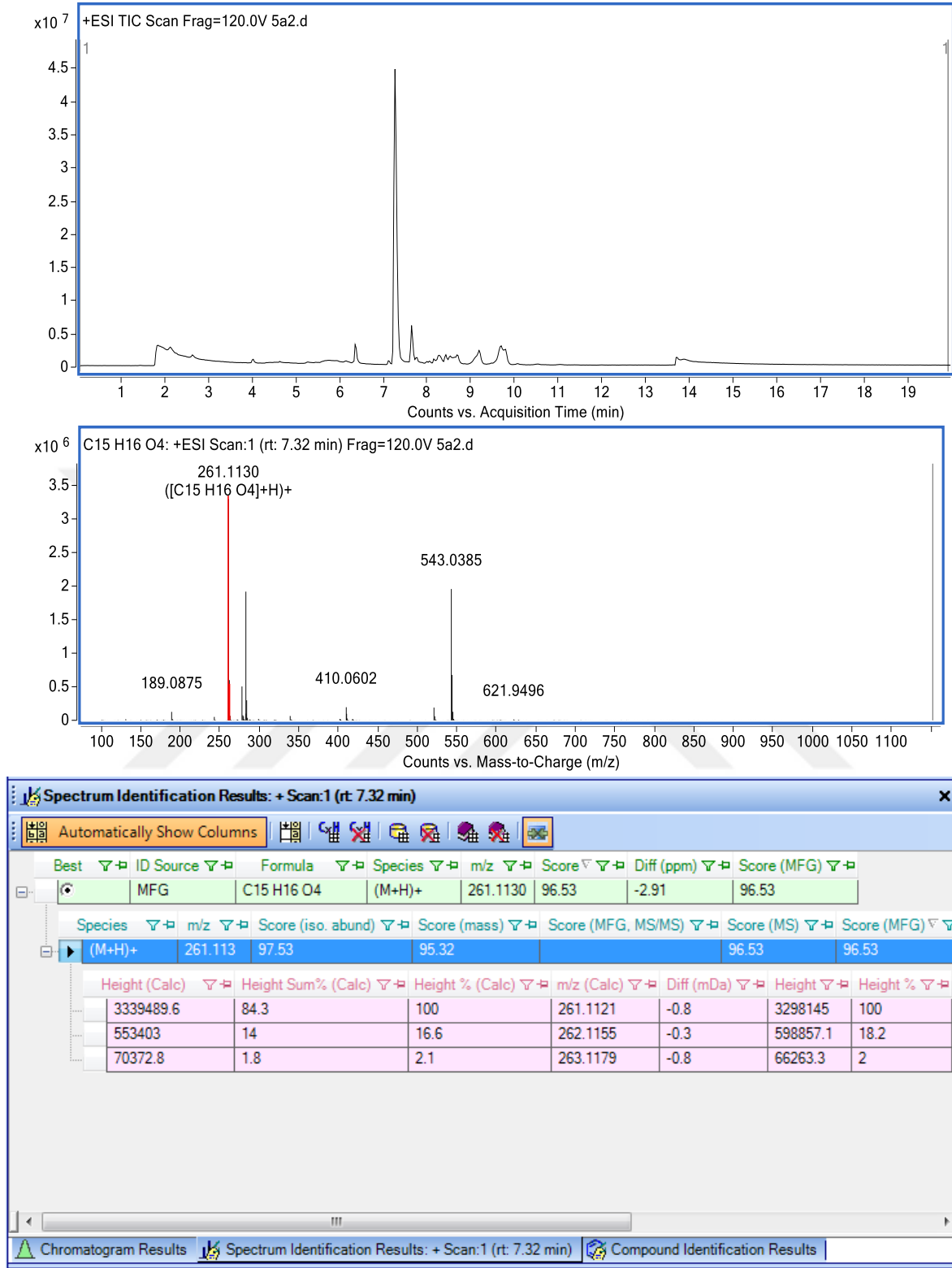
Şekil 4.2. CAS 5 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl₃)



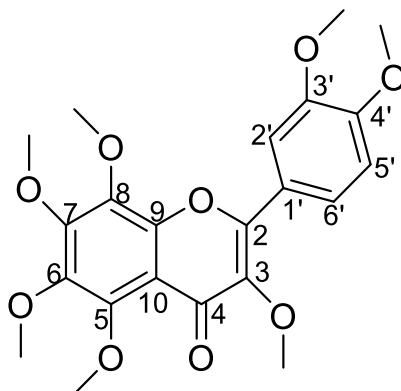
Şekil 4.3. CAS 5 bileşiğinin Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) spektrumu



Şekil 4.4. CAS 5 bileşiğinin HMBC spektrumu

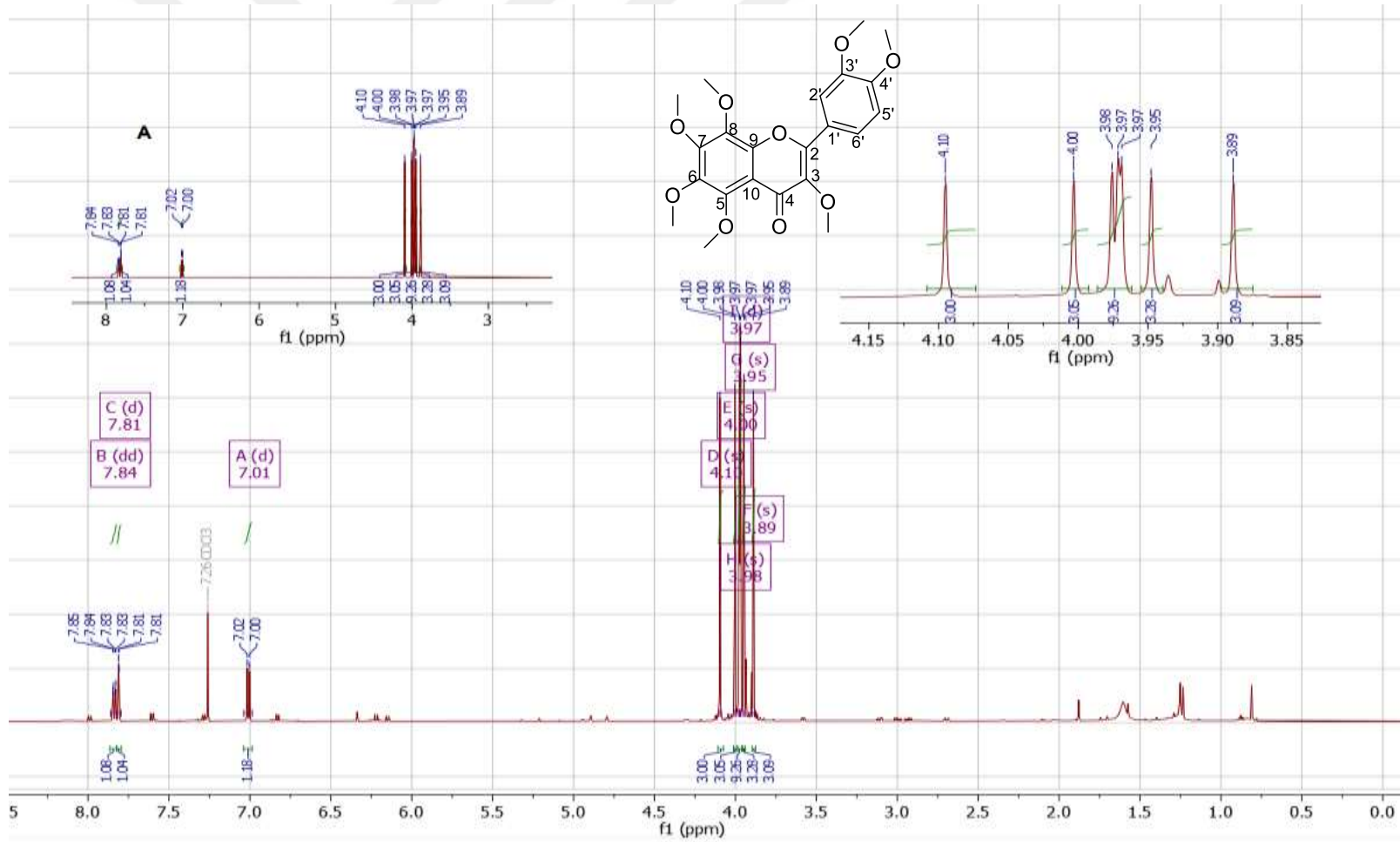


Şekil 4.5. CAS 5 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (m/z 261,1130) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu

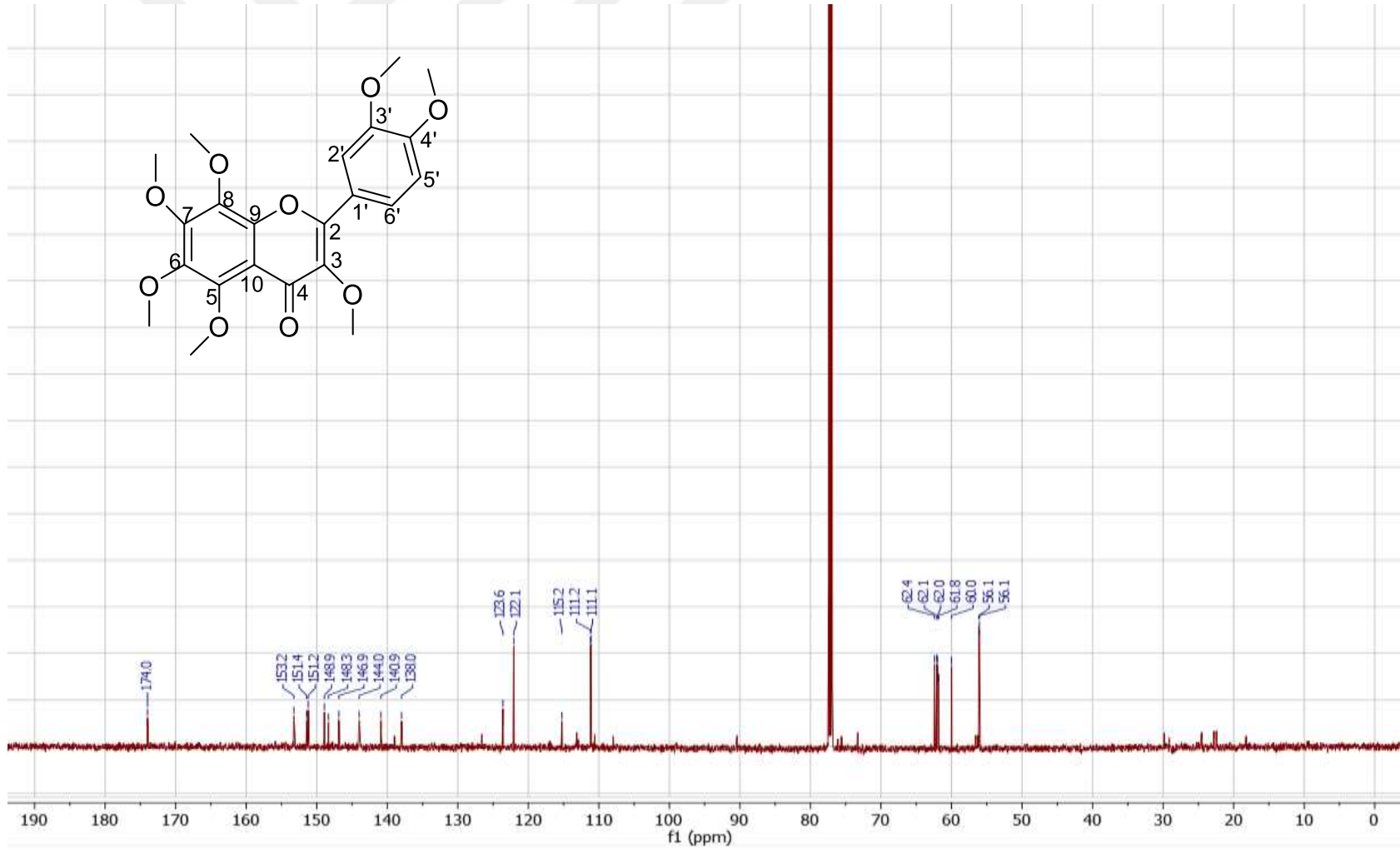
3-Metoksi nobiletin (CAS 10)

Çizelge 4.2. CAS 10 bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CDCl_3 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H : 600 MHz)

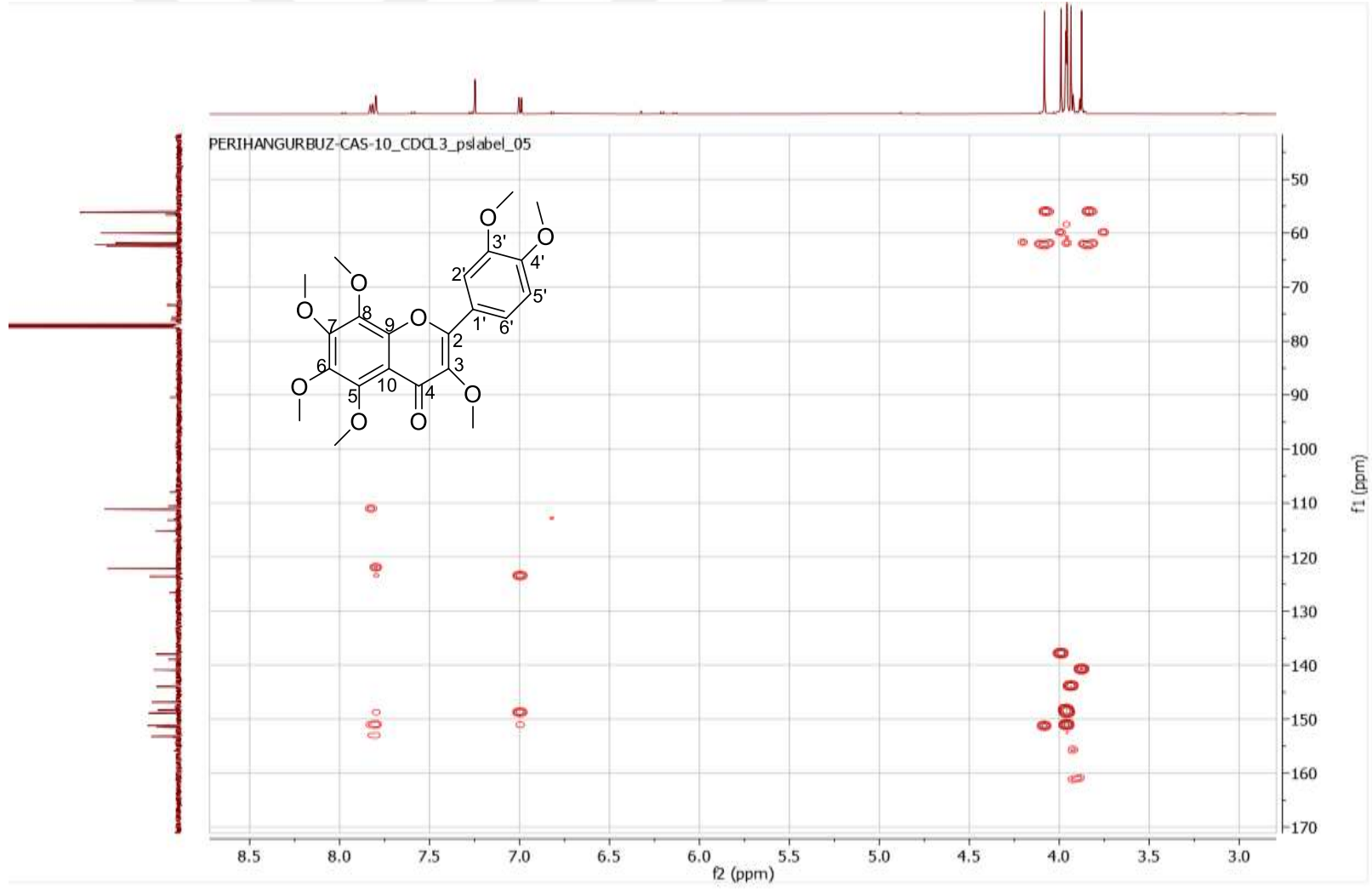
C No	C/H	C (δ in ppm)	H (δ in ppm, J in Hz)
2	C	153,2	
3	C	140,9	
4	C	174,0	
5	C	144,0	
6	C	138,0	
7	C	151,4	
8	C	148,3	
9	C	146,9	
10	C	115,2	
1'	C	123,6	
2'	CH	111,1	7,81 (d, $J = 2.1$)
3'	C	148,9	
4'	C	151,2	
5'	CH	111,2	7,01 (d, $J = 8.5$)
6'	CH	122,1	7,84 (dd, $J = 8.5, 2.0$)
3-OMe		60,0	3,89 (s)
5-OMe		62,4	3,98 (s)
6-OMe		62,1	4,00 (s)
7-OMe		62,0	4,10 (s)
8-OMe		61,8	3,95 (s)
3'-OMe		56,1	3,97 (s)
4'-OMe		56,1	3,97 (s)



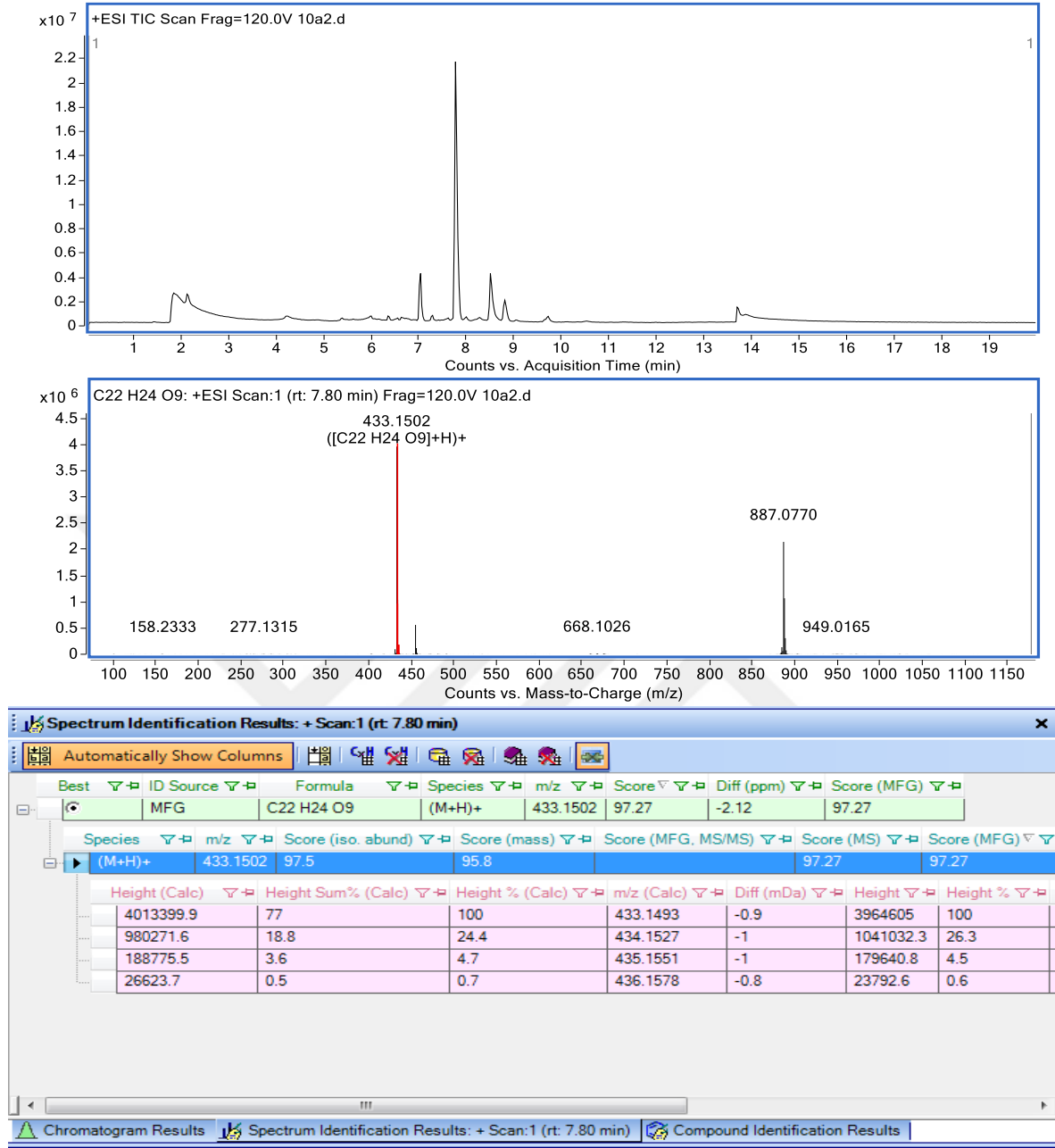
Şekil 4.6. CAS 10 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl_3), A: CAS 10 bileşiğinin M-Nova (14.2.1-27684) programında safsızlıklar ve çözücü sinyali çıkarıldıktan sonraki spektrumu



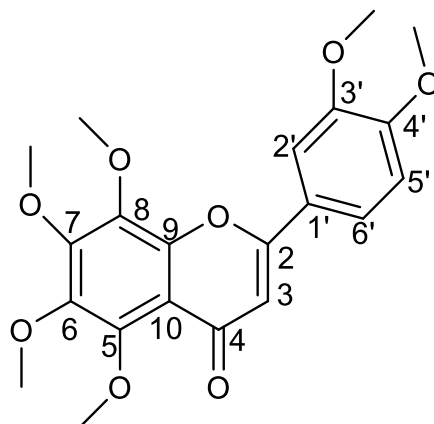
Şekil 4.7. CAS 10 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl_3)



Şekil 4.9. CAS 10 bileşiğinin HMBC spektrumu

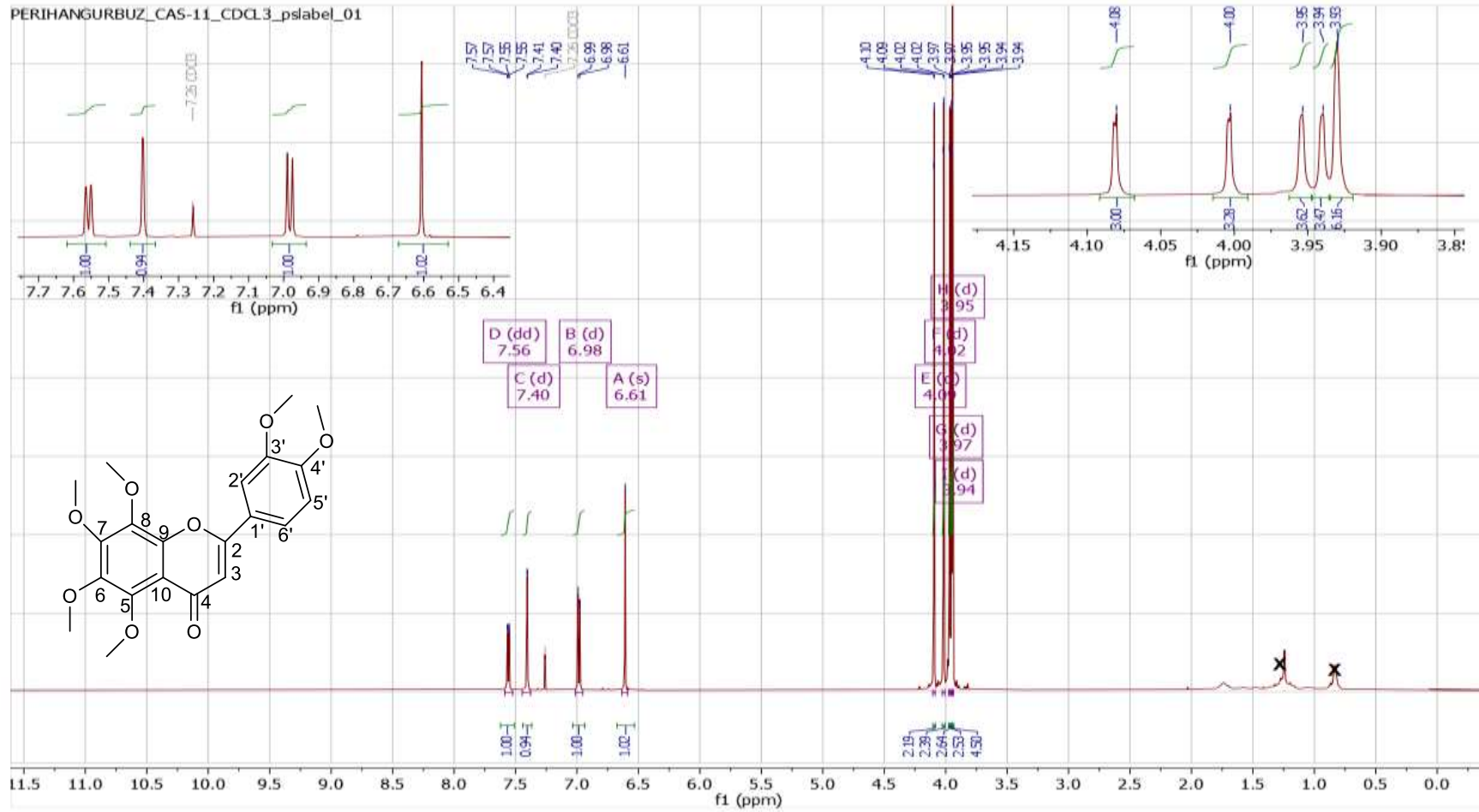


Şekil 4.10. CAS 10 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (m/z 433,1502) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu

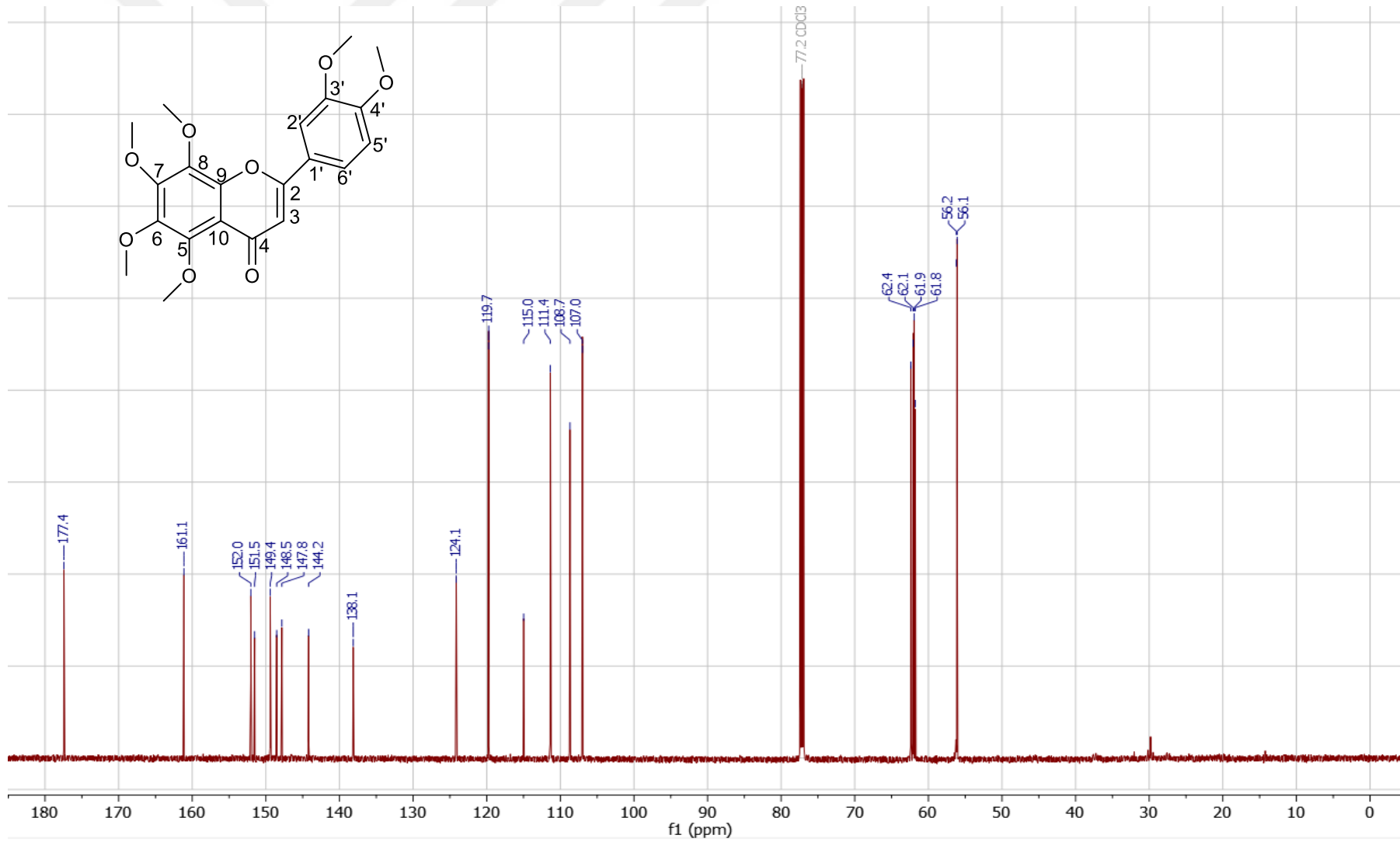
Nobiletin (CAS 11)

Çizelge 4.3. CAS 11 bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CDCl_3 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H : 600 MHz)

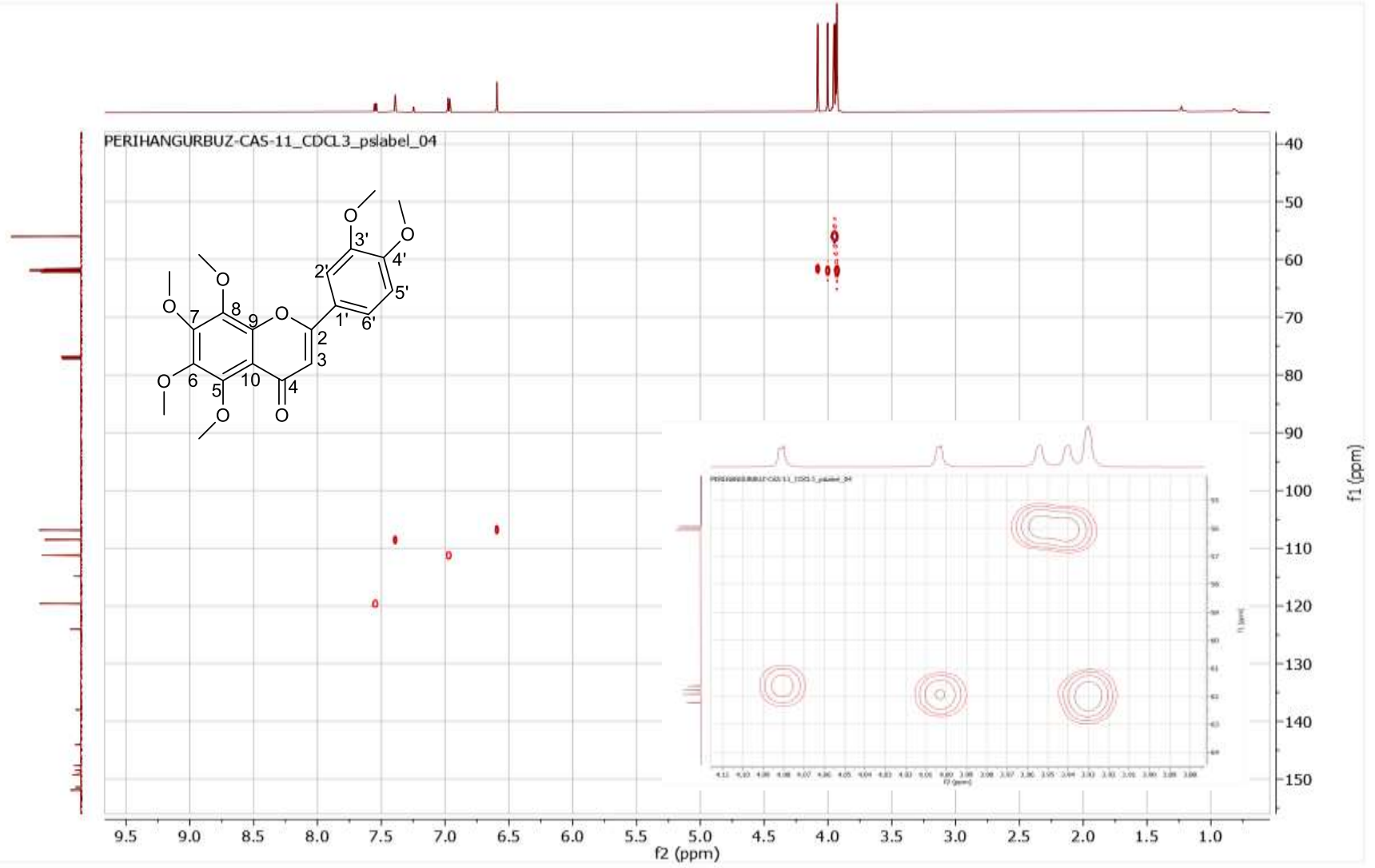
C No	C/H	C (δ in ppm)	H (δ in ppm, J in Hz)
2	C	161,1	
3	CH	107,0	6,61 (br s)
4	C	177,4	
5	C	144,2	
6	C	138,1	
7	C	151,5	
8	C	148,5	
9	C	147,8	
10	C	115,0	
1'	C	124,1	
2'	CH	108,7	7,40 (d, $J = 2.2$)
3'	C	149,4	
4'	C	152,0	
5'	CH	111,4	6,98 (d, $J = 8.5$)
6'	CH	119,7	7,56 (dd, $J = 8.4, 2.2$)
5-OMe		62,4	4,00 (s)
6-OMe		62,1	3,93 (s)
7-OMe		61,9	3,93 (s)
8-OMe		61,8	4,08 (s)
3'-OMe		56,2	3,94 (s)
4'-OMe		56,1	3,95 (s)



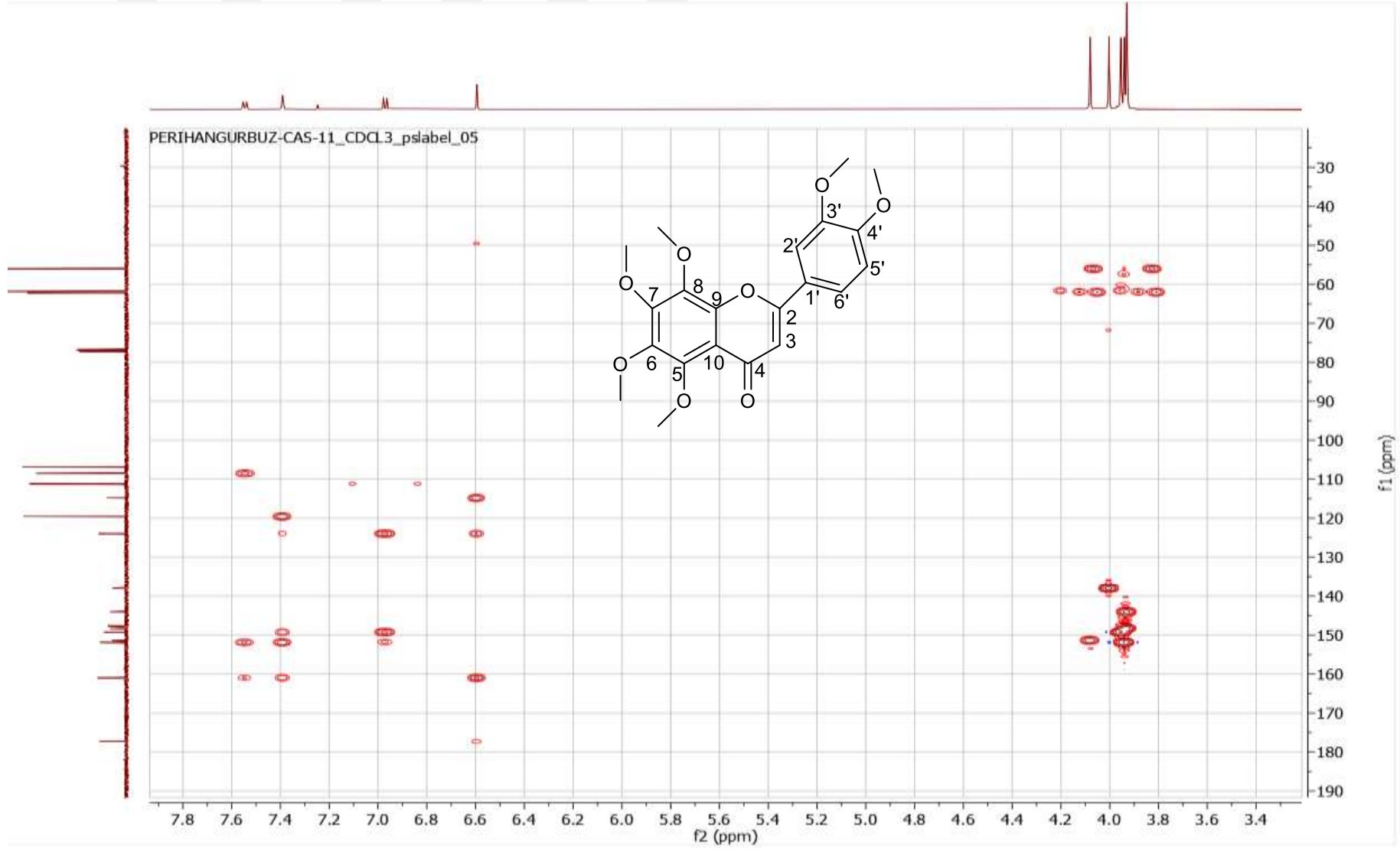
Şekil 4.11. CAS 11 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl_3)



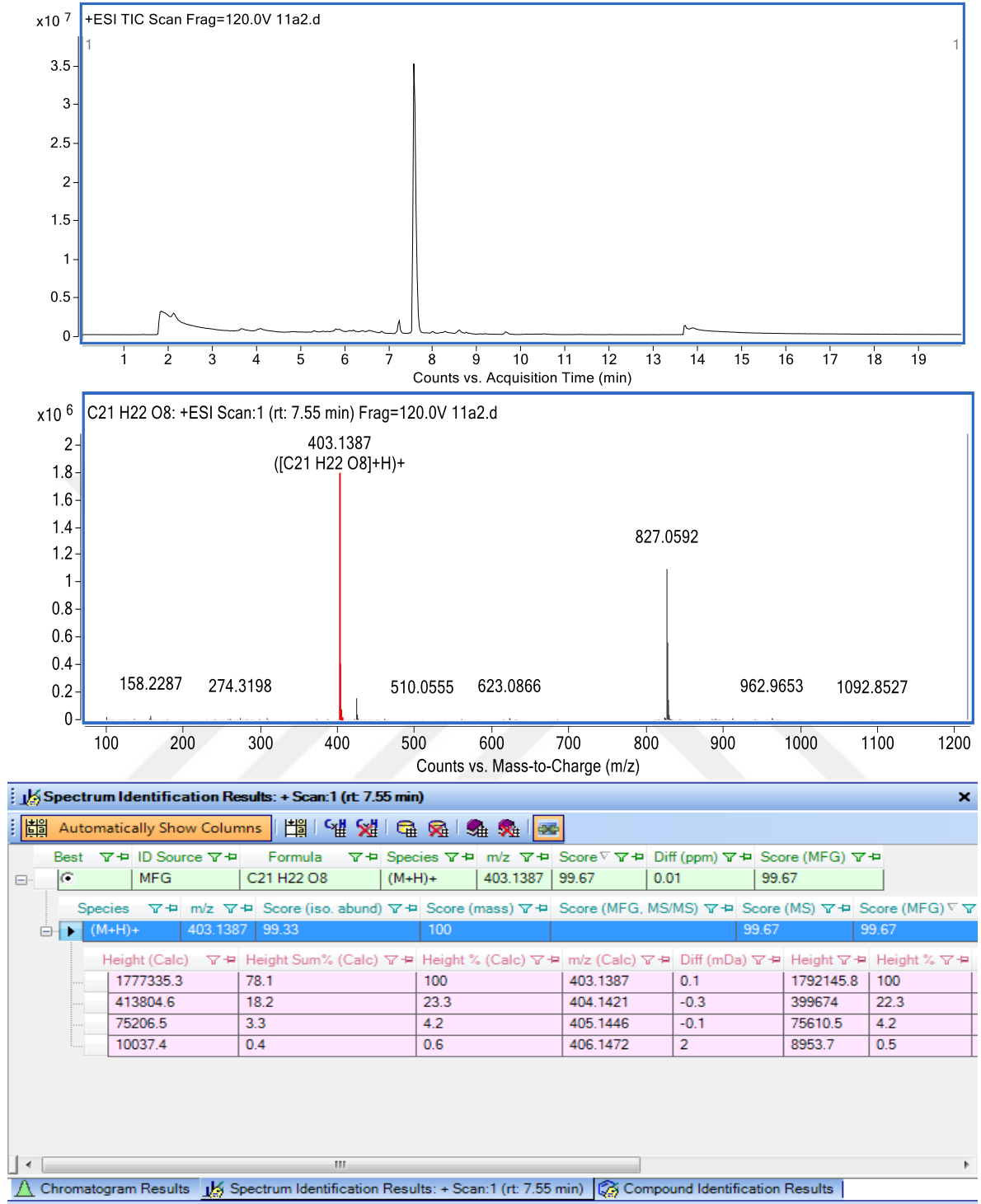
Şekil 4.12. CAS 11 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl_3)



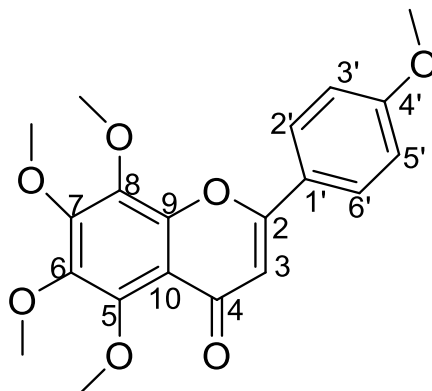
Şekil 4.13. CAS 11 bileşiğinin HSQC spektrumu



Şekil 4.14. CAS 11 bileşiğinin HMBC spektrumu

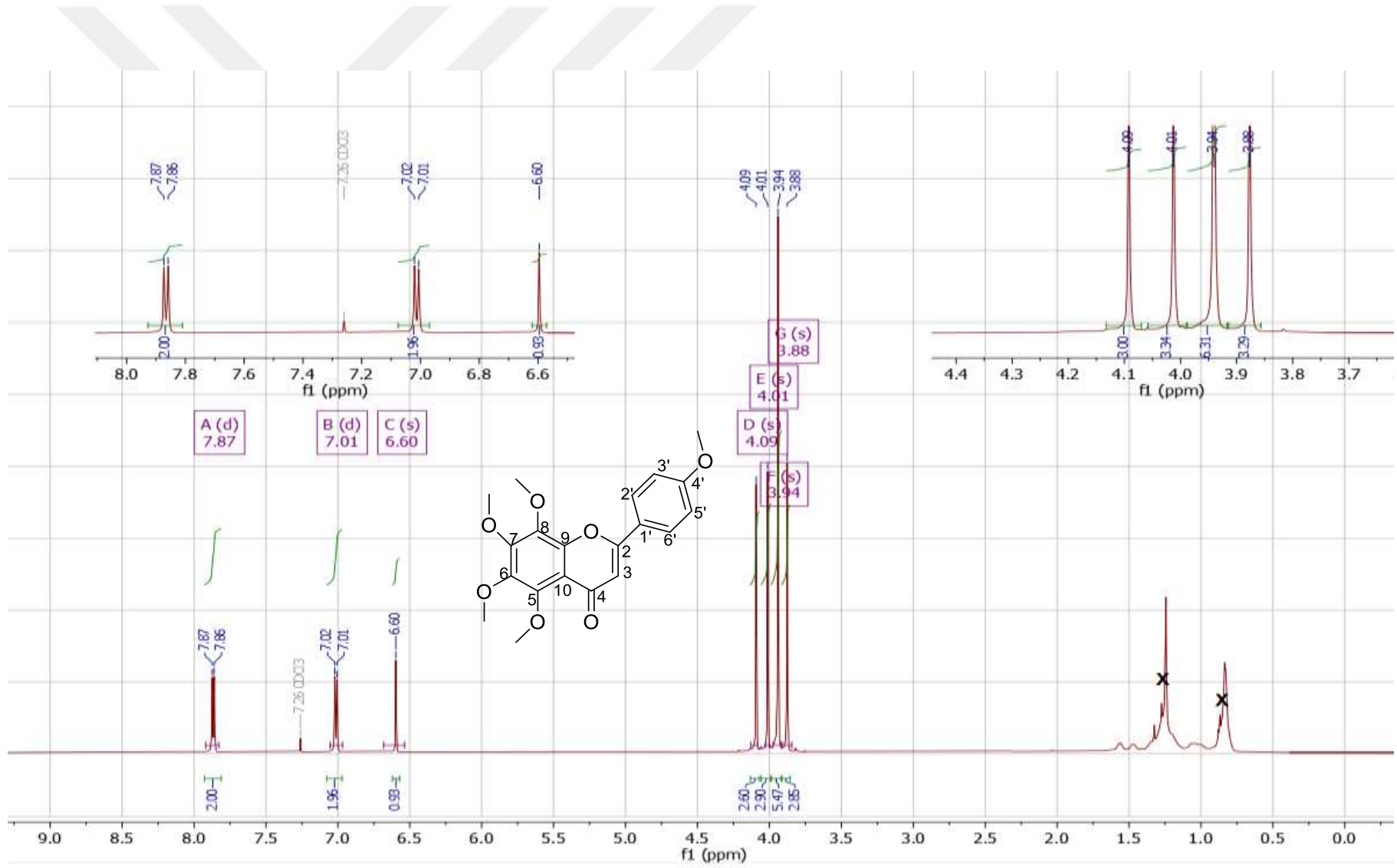


Şekil 4.15. CAS 11 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (m/z 403,1387) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu

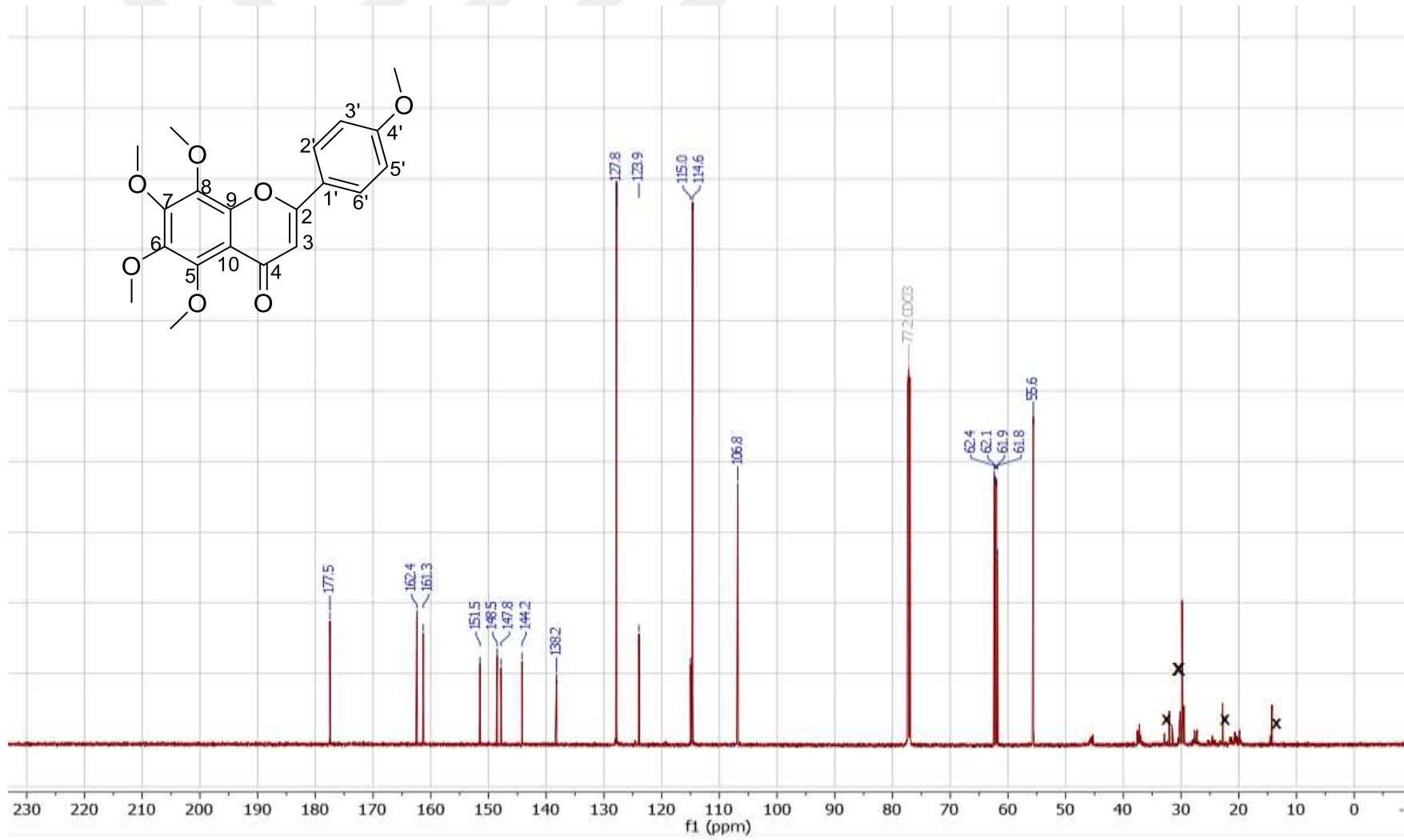
Tangeretin (CAS 12)

Çizelge 4.4. CAS 12 bileşiğinin ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CDCl_3 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H : 600 MHz)

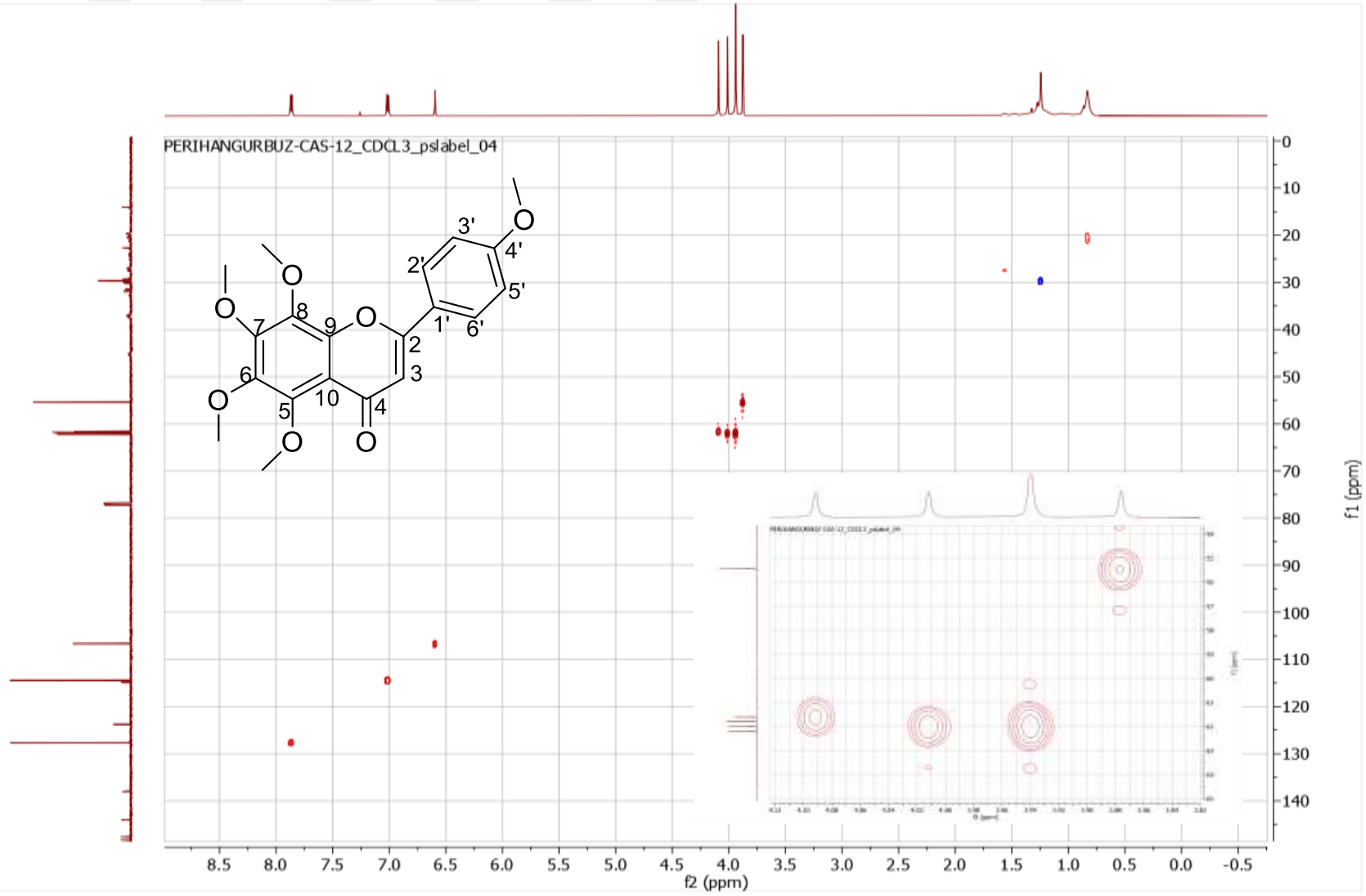
C No	C/H	C (δ in ppm)	H (δ in ppm, J in Hz)
2	C	161,3	
3	CH	106,8	6,60 (s)
4	C	177,5	
5	C	144,2	
6	C	138,2	
7	C	151,5	
8	C	148,5	
9	C	147,8	
10	C	115,0	
1'	C	123,9	
2'	CH	127,8	7,87 (d, $J = 8.6$)
3'	CH	114,6	7,01 (d, $J = 8.7$)
4'	C	162,4	
5'	CH	114,6	7,01 (d, $J = 8.7$)
6'	CH	127,8	7,87 (d, $J = 8.6$)
5-OMe		62,4	3,94 (s)
6-OMe		61,8	4,09 (s)
7-OMe		62,1	4,01 (s)
8-OMe		61,9	3,94 (s)
4'-OMe		55,6	3,88 (s)



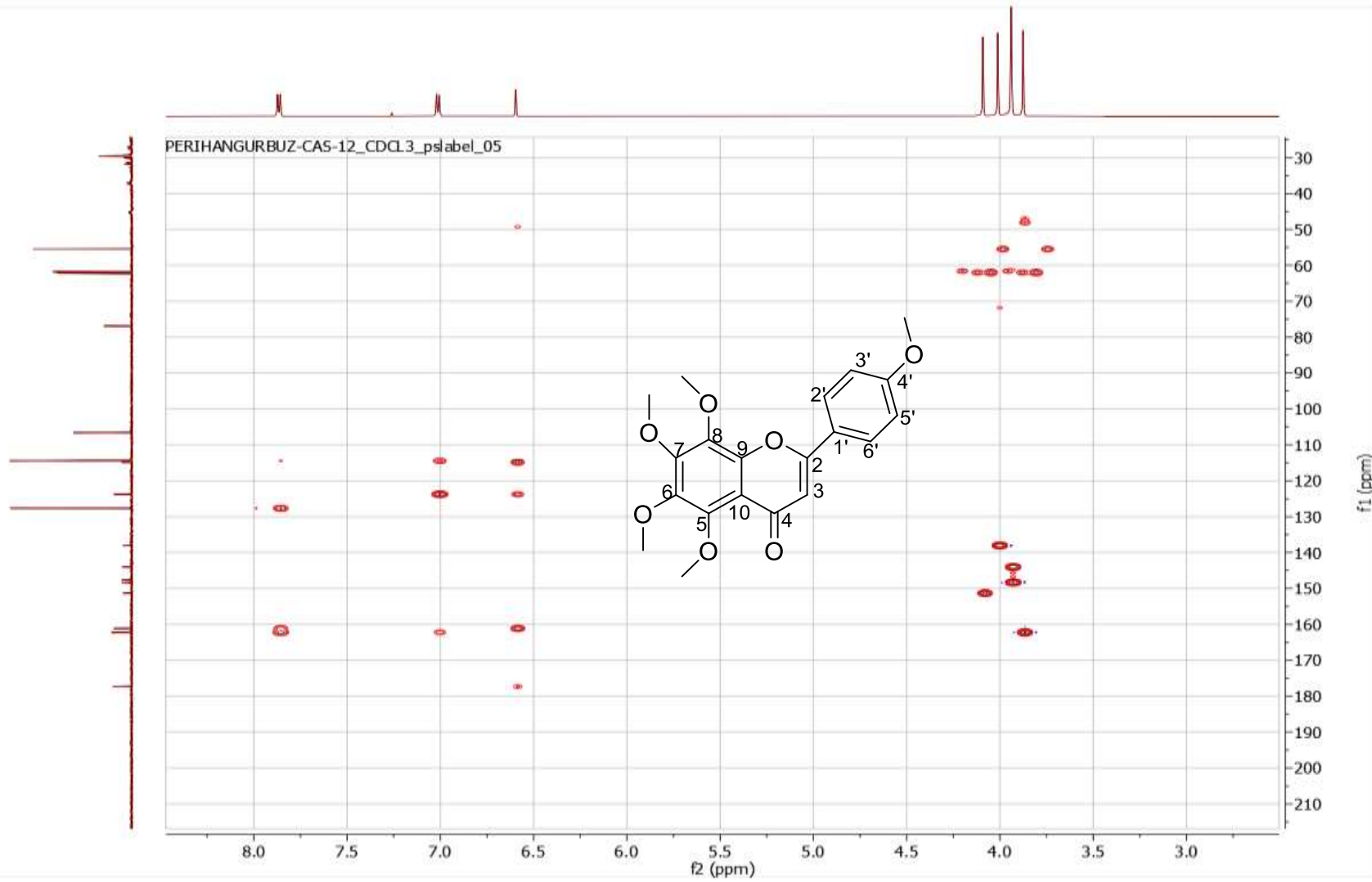
Şekil 4.16. CAS 12 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl_3)



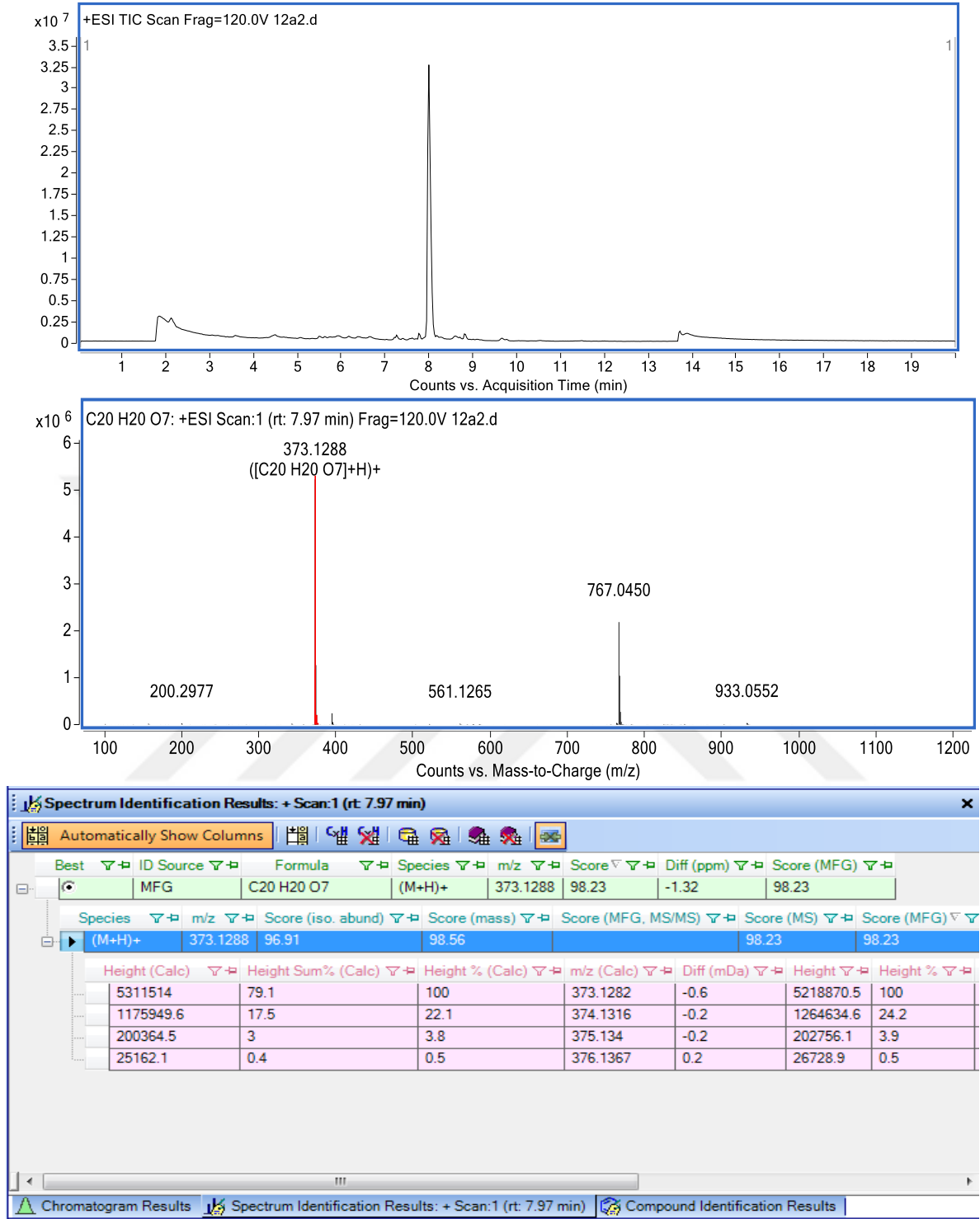
Şekil 4.17. CAS 12 bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu (150 MHz, CDCl₃)



Şekil 4.18. CAS 12 bileşiğinin HSQC spektrumu



Şekil 4.19. CAS 12 bileşiğinin HMBC spektrumu

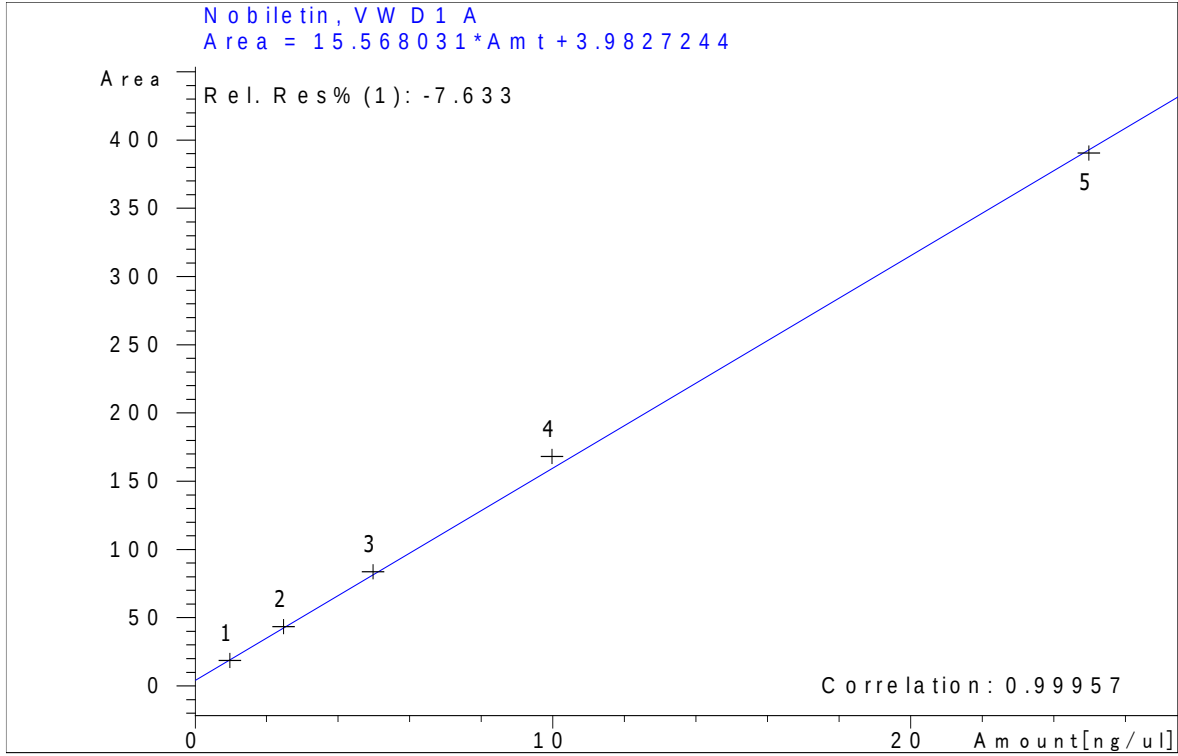


Şekil 4.20. CAS 12 bileşiğine ait +ESI Toplam iyon kromatogramı, ana iyonu (m/z 373,1288) gösterir spektrum ve kapalı formül eşleşme sonucu

4.1.2. HPLC ile nobiletin miktar tayini sonuçları

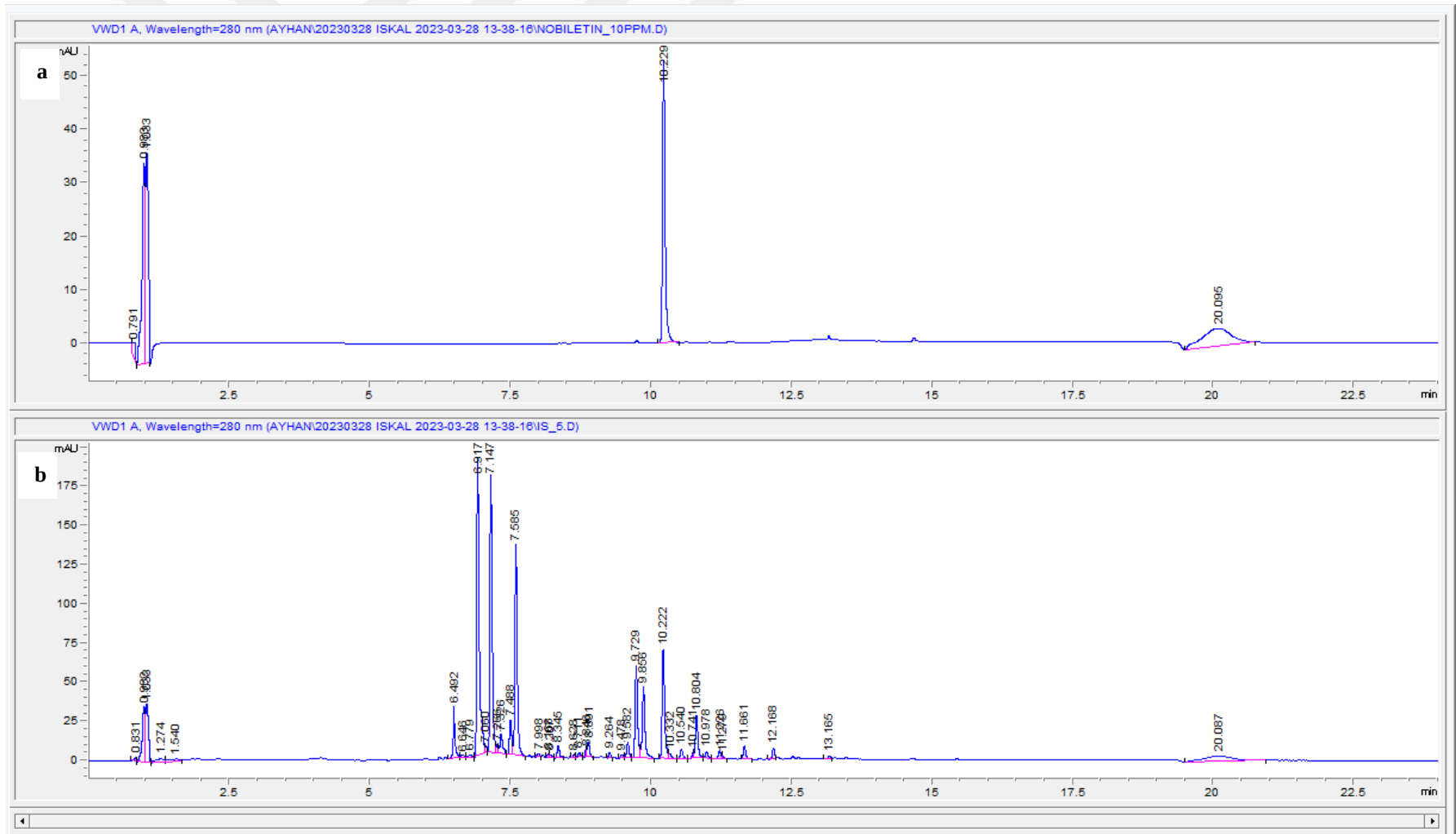
Nobiletin bileşiği ve CA EtOAc ekstresi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. En son uygulanan gradient metot ile numune içerisinde diğer bileşenler için kromatografik ayırım

sağlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 1-2.5-5-10-25 µg/mL derişim aralığında oluşturulmuştur, r^2 değeri 0.99957 olarak elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.21’de verilmiştir. Numune enjeksiyonu ile elde edilen sinyal (alan değeri) oluşturulan kalibrasyon denklemi ile değerlendirilmiştir. *C. aurantium*’un etil asetatlı kabuk ekstresi içerisinde nobiletin miktarı ağırlıkça $\%2,53 \pm 0,06$ olarak hesaplanmıştır.

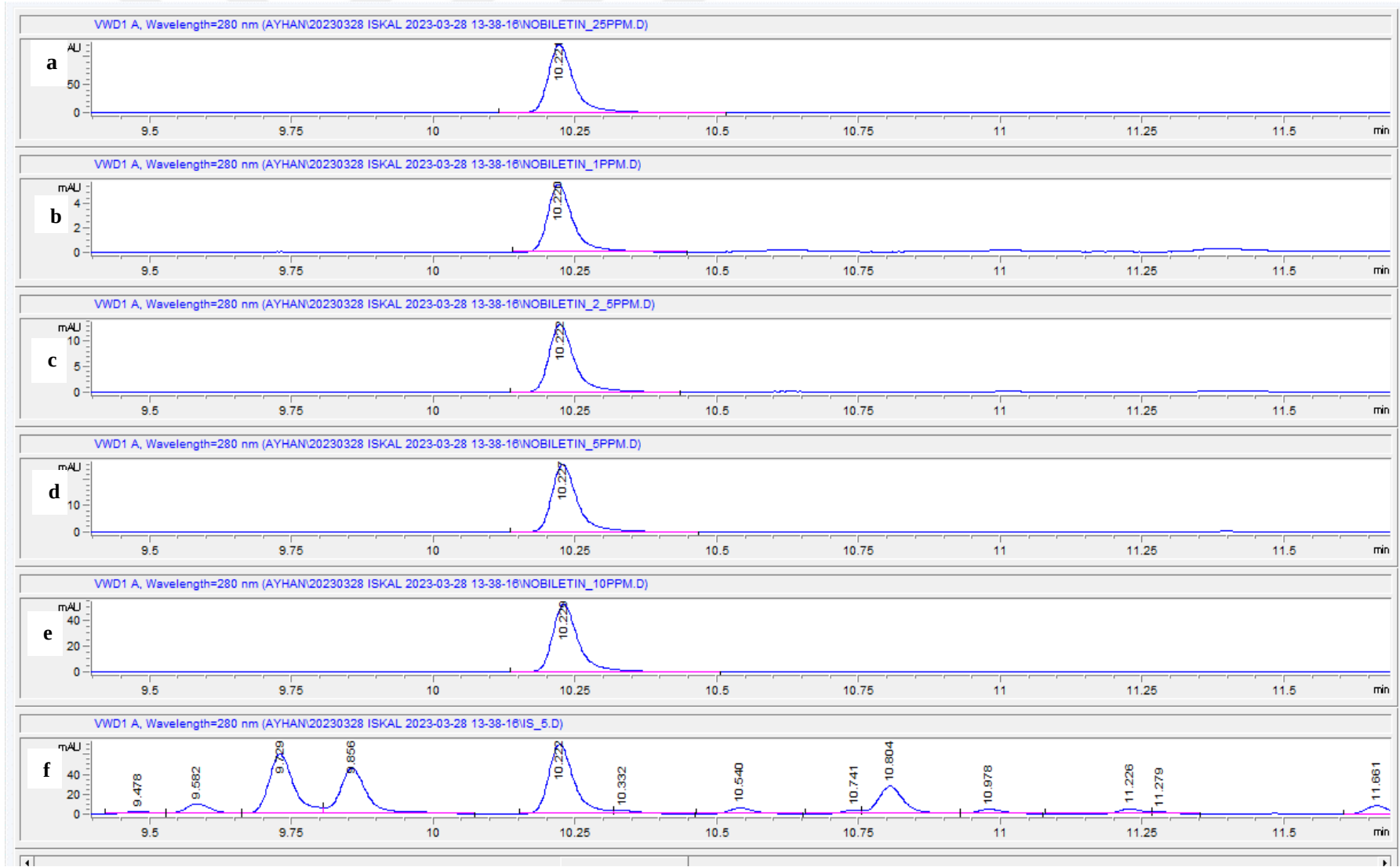


Şekil 4.21. Nobiletinin kalibrasyon eğrisi

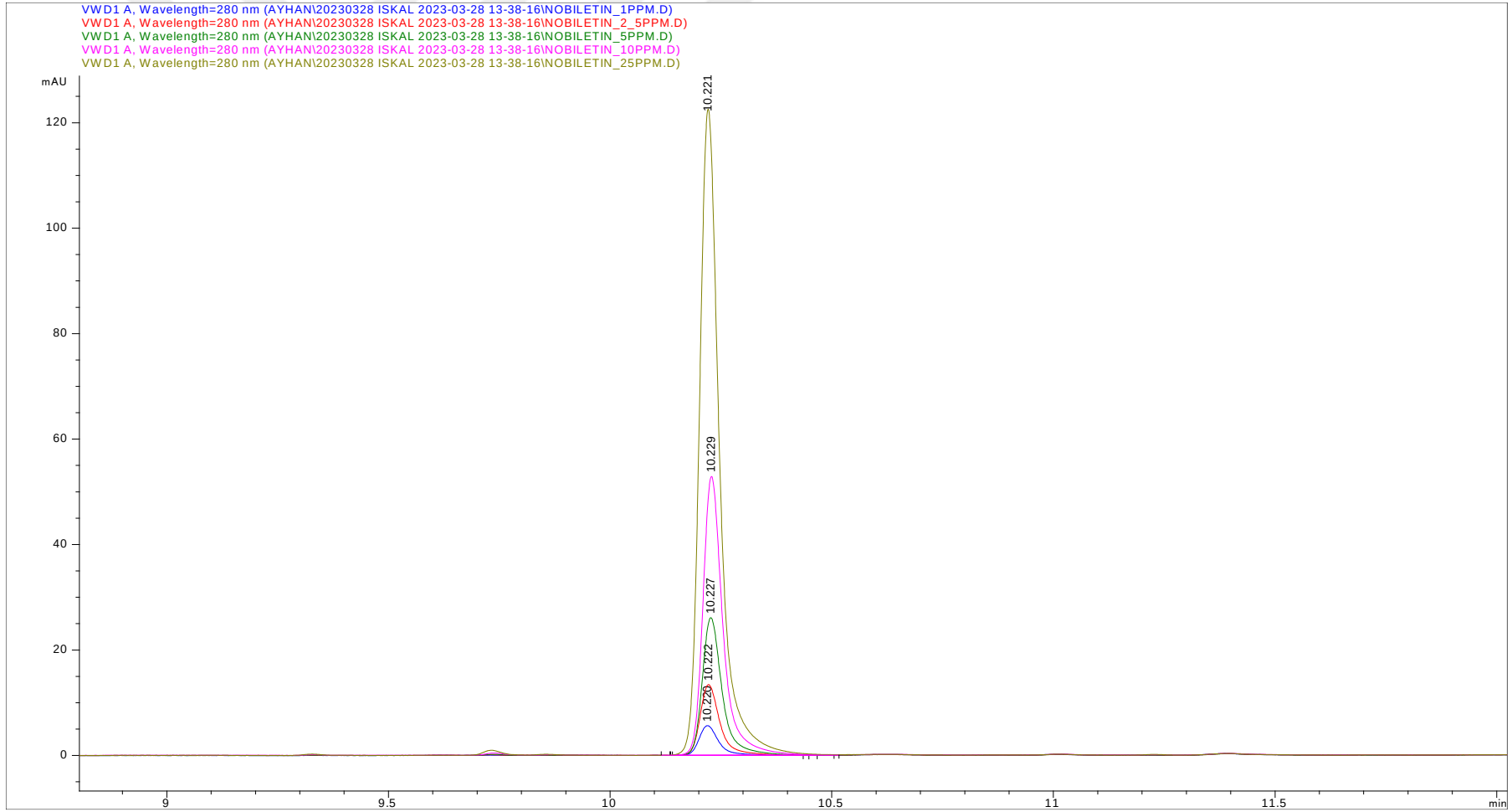
Numune içerisinde bulunan ve kromatografik girişim yapabilecek bileşikler ve nobiletine ait kromatogramlar Şekil 4.22 ve 4.24’te verilmiştir. Nobiletin alıkonma süresi 10,22 dk’dır.



Şekil 4.22. Nobiletin (a) ve CA EtOAc ekstresi (b) kromatogramları



Şekil 4.23. Nobiletinin madde kalibrasyon (a, b, c, d, e) ve CA EtOAc ekstresinin (f) kromatogramları



Şekil 4.24. Nobiletinin kalibrasyon enjeksiyonları, overlaid görünüm

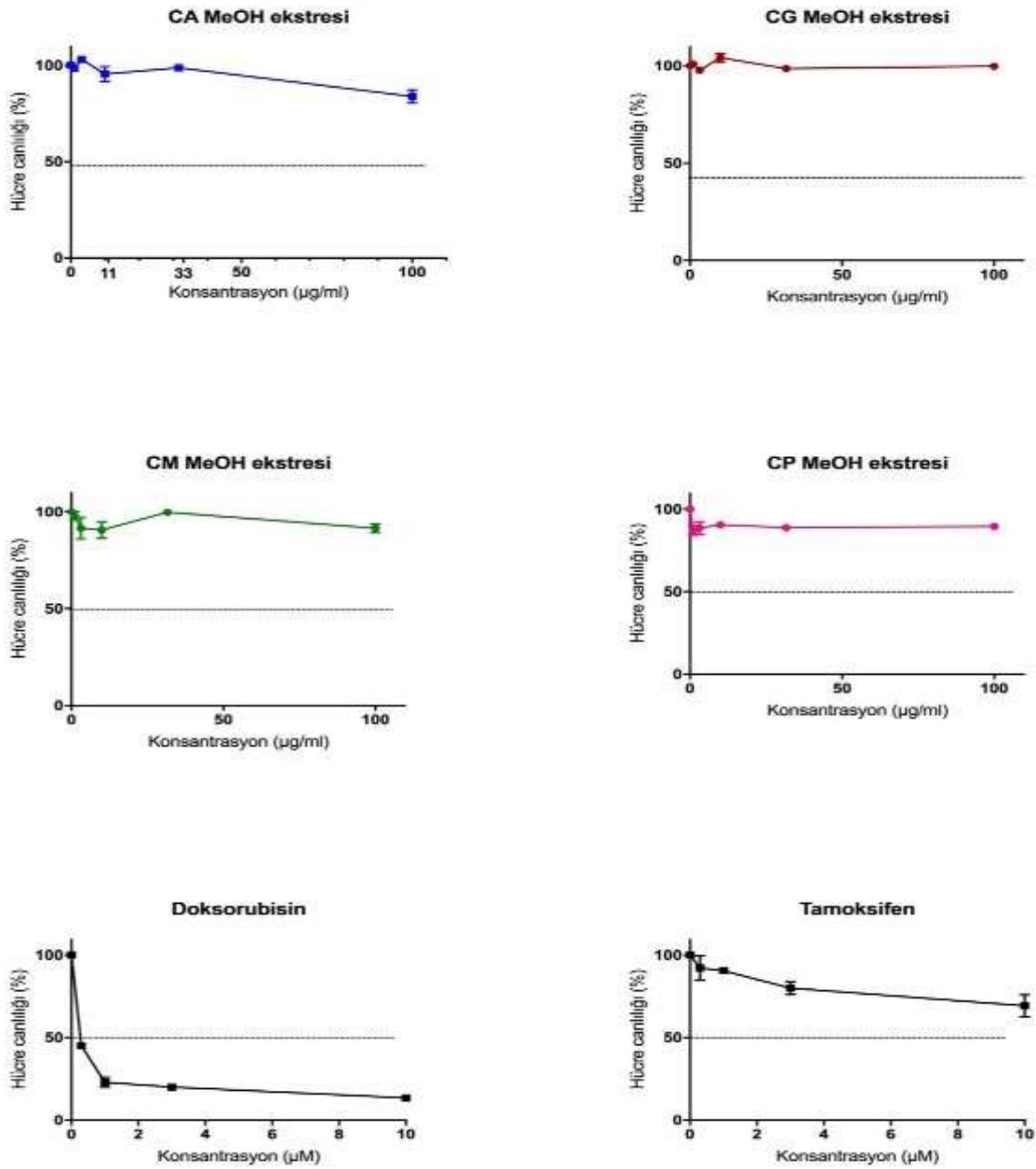
4.2. *In vitro* Sitotoksosite Çalışma Sonuçları

CA, CG, CM, CP MeOH ekstrelerinin tamoksifene karşı etkinliğinin karşılaştırıldığı sitotoksosite tayini yapılmıştır. MeOH ekstreleri sitotoksosite tayininde 5 dozda kullanılmıştır. Doz belirlemesi ABD Ulusal Kanseri Enstitüsü (NCI) antikanser ilaç tarama programına göre bitkisel ekstre ve fraksiyonlarda 100 µg/mL en yüksek konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin suda çözünürlük testi yapılarak en yüksek konsantrasyona ulaşma durumu onaylanmıştır. Dozlar 100-31,6-10-3,16 ve 1 µg/mL olarak oluşturulmuştur. CA, CG, CM ve CP'nin MeOH ekstrelerinin 100 µg/mL doza kadar 48 saat boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda doza bağlı olarak sitotoksik aktivitesi değerlendirildiğinde anlamlı bir aktivitenin olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Test edilen en yüksek dozda dahi hücre canlılığının devam etmesi nedeniyle araştırılan dozlarda IC₅₀ hesaplanamamış, sonuçlar % hücre canlılığı olarak ele alınmıştır (Şekil 4.25). Test sisteminin ilk kuruluşunda, MCF-7 hücrelerinde sitotoksik aktivite gösterdiği bilinen ve laboratuvarında tarihsel verisi bulunan doksorubisin kullanılarak deney sistemi optimize edilmiştir.

Çizelge 4.5. MeOH ekstrelerinin MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen yüzde hücre canlılığı sonuçları

Konsantrasyon (µg/mL)	Ekstrelerin % Hücre Canlılığı (Ortalama ± SH)			
	CA	CG	CM	CP
0	100	100	100	100
1	98,48 ± 0,98	100,84 ± 1,09	97,96 ± 2,15	87,10 ± 3,01
3,16	103,21 ± 0,82	97,71 ± 1,28	91,49 ± 5,48	88,55 ± 3,82
10	95,44 ± 3,85	104,10 ± 2,13	90,55 ± 4,32	90,45 ± 2,03
31,6	98,69 ± 1,78	98,53 ± 1,63	99,74 ± 1,94	88,75 ± 1,75
100	83,87 ± 3,46	99,78 ± 1,37	91,48 ± 2,06	89,47 ± 1,12

CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus grandis*; CM: *Citrus medica*; CP: *Citrus paradisi*



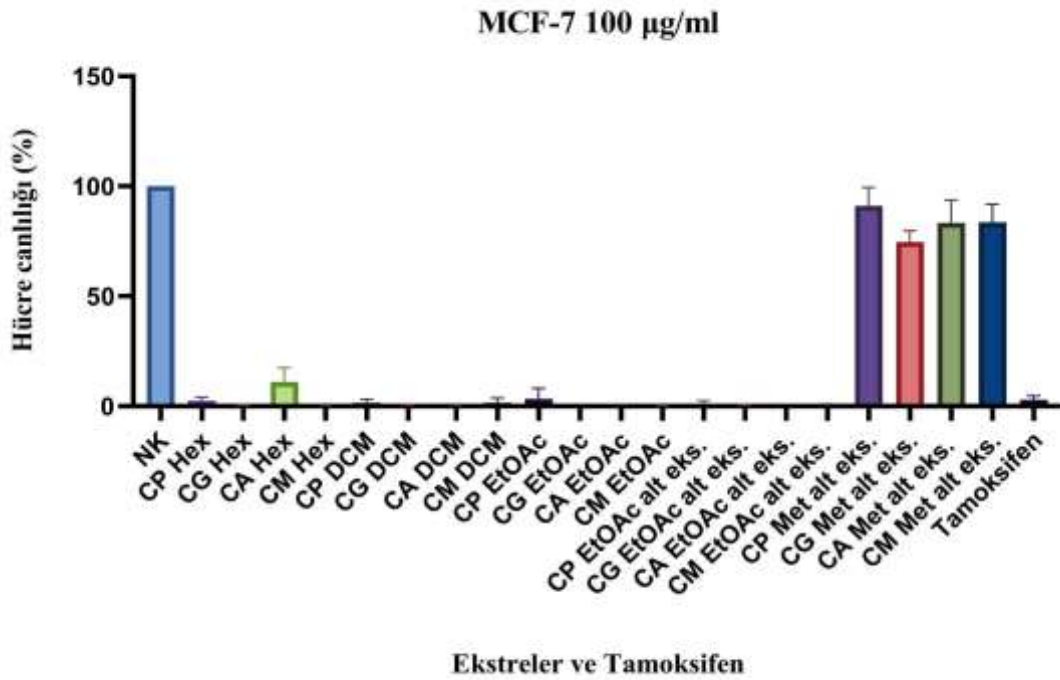
CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus grandis*; CM: *Citrus medica*; CP: *Citrus paradisi*

Şekil 4.25. *Citrus* türlerinin MeOH ekstrelerinin 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi

MeOH ekstrelerinin MCF-7 hücre hattında etkili bulunmaması nedeniyle, ekstraksiyon yönteminin değiştirilmesi yoluna gidilmiştir. Buna göre;

Bitkisel materyal, *n*-hekzandan başlanarak hem doğrudan hem de sekanslı bir şekilde artan polaritedeki çözücülerle ekstre edilerek, bu ekstrelerin sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Doğrudan bitkisel materyalin *n*-hekzan, DCM ve EtOAc ile hazırlanan

ham ekstreleri ile sekanslı bir şekilde *n*-hekzandan başlayarak, kalan bitki materyalinin EtOAc ve sonrasında MeOH ile ekstre edilerek hazırlanan alt ekstrelerinin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Öncelikle 4 türe ait toplam 20 ekstre en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL dozda 48 saat boyunca MCF-7 hücreleri ile muamele edilerek sitotoksik aktivite çalışması tek dozda çalışılmıştır (Şekil 4.26). Daha sonra etkileri yüksek bulunan ham ekstrelerin ve EtOAc alt ekstrelerinin doz cevap etkileri 5 dozda çalışılmış, sonuçlar Çizelge 4.6-4.7 ve Şekil 4.27-4.28’de sunulmuştur. MeOH alt ekstrelerinin sitotoksik etkileri yüksek olmadığından doz-cevap etkileri çalışılmamıştır.



Şekil 4.26. *Citrus* türlerinin ham ve alt ekstrelerinin 100 µg/mL konsantrasyonda 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi

Çizelge 4.6. *Citrus* türlerinin ham ekstrelerinin MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri (IC₅₀ değerleri)

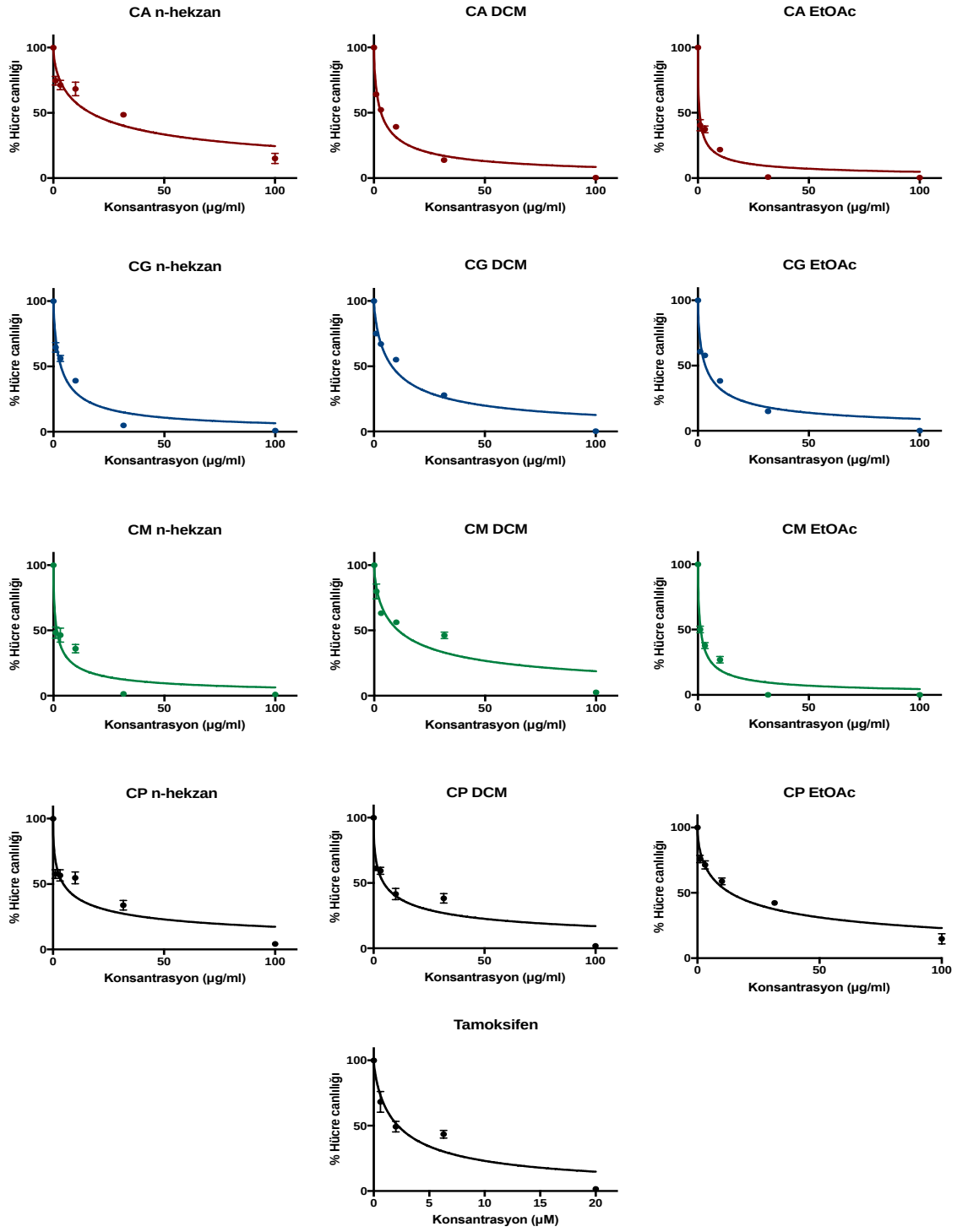
Gruplar	Ekstre tipi	IC ₅₀ ± SH
CA	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	16,80 ± 2,95 µg/mL
	DCM ham ekstresi	3,23 ± 0,29 µg/mL
	EtOAc ham ekstresi	0,77 ± 0,16 µg/mL
CG	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	3,42 ± 0,41 µg/mL
	DCM ham ekstresi	8,14 ± 0,80 µg/mL
	EtOAc ham ekstresi	3,34 ± 0,36 µg/mL
CM	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	1,56 ± 0,35 µg/mL
	DCM ham ekstresi	10,88 ± 1,68 µg/mL
	EtOAc ham ekstresi	1,26 ± 0,17 µg/mL
CP	<i>n</i> -Hekzan ham ekstresi	4,65 ± 1,12 µg/mL
	DCM ham ekstresi	4,58 ± 0,84 µg/mL
	EtOAc ham ekstresi	13,41 ± 1,59 µg/mL
Tamoksifen	-	2,18 ± 0,37 µM

CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus grandis*; CM: *Citrus medica*; CP: *Citrus paradisi*

Çizelge 4.7. *Citrus* türlerinin EtOAc alt ekstrelerinin MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri (IC₅₀ değerleri)

Ekstre tipi	Gruplar	IC ₅₀ ± SH
EtOAc alt ekstresi	CA	43,61 ± 4,42 µg/mL
	CG	7,81 ± 0,66 µg/mL
	CM	71,72 ± 18,16 µg/mL
	CP	23,85 ± 1,84 µg/mL
-	Tamoksifen	2,18 ± 1,84 µM

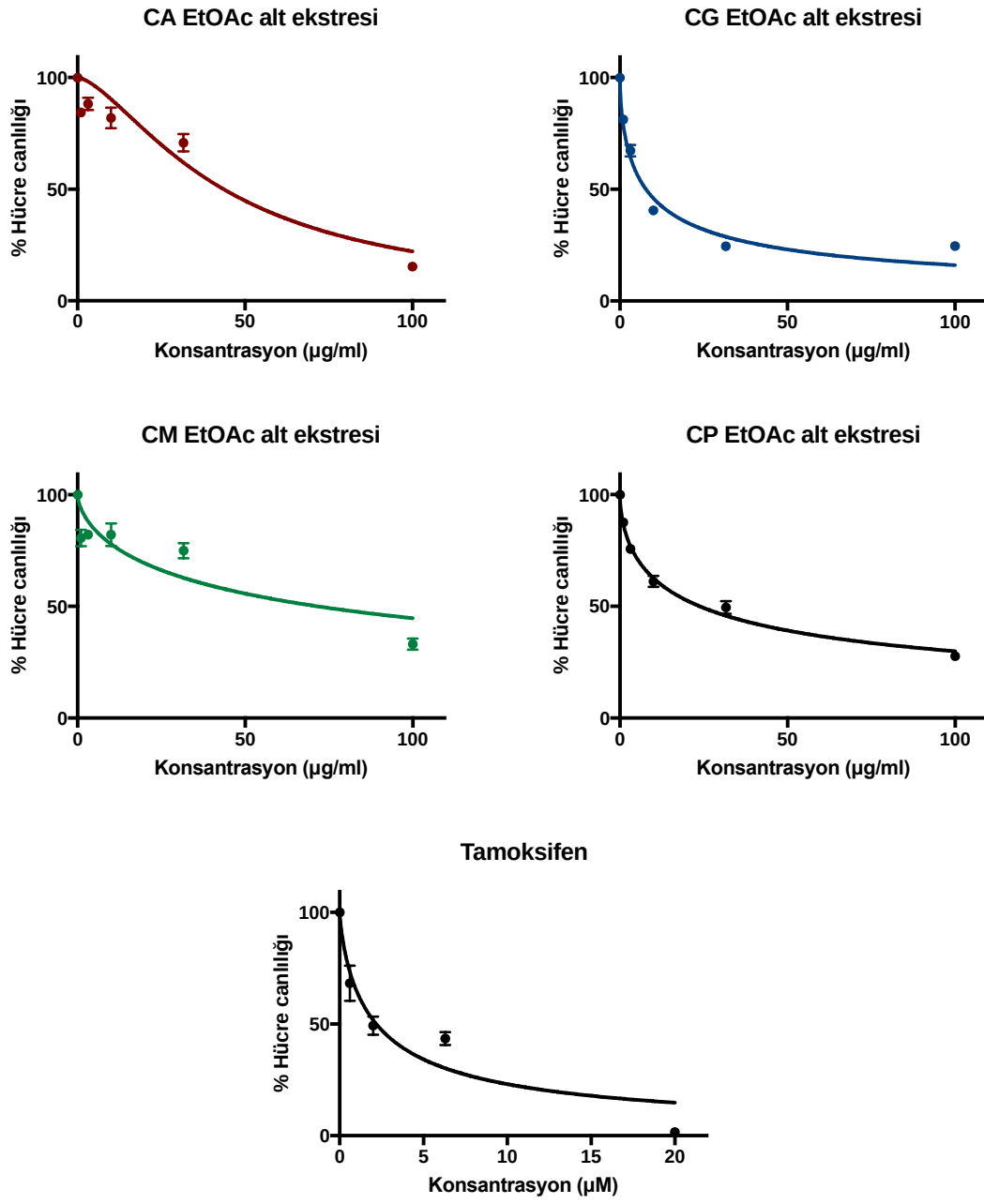
CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus grandis*; CM: *Citrus medica*; CP: *Citrus paradisi*



CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus grandis*; CM: *Citrus medica*; CP: *Citrus paradisi*

n-hekzan: *n*-hekzan ham ekstresi; DCM: Diklorometan ham ekstresi; EtOAc: Etil asetat ham ekstresi

Şekil 4.27. *Citrus* türlerinin ham ekstrelerinin 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi



CA: *Citrus aurantium*; CG: *Citrus grandis*; CM: *Citrus medica*; CP: *Citrus paradisi*

Şekil 4.28. *Citrus* türlerinin EtOAc alt ekstraktlarının 48 saatlik uygulamalarında MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi

Elde edilen bulgular neticesinde, aktivite sonuçları da göz önünde bulundurulduğunda, CA EtOAc ham ekstresinin en yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (IC_{50} : $0,768 \pm 0,16$ $\mu\text{g/mL}$). Meme kanseri hücrelerinde aktif olduğu belirlenen CA EtOAc ham ekstresinin sağlıklı meme hücrelerinde yapabileceği olası hasarı belirlemek amacı ile aynı ekstre MCF-10A hücre hattı üzerinde de uygulanmış, sitotoksik etkisi ve seçicilik indeksi hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada, CA EtOAc ham ekstresinin MCF-10A sağlıklı meme hücre hattında IC_{50} değerinin $30,07 \pm 1,62$ $\mu\text{g/mL}$ olduğu tespit edilmiştir. Deneyin pozitif kontrolü tamoksifene ait IC_{50} değeri ise $9,35 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. CA EtOAc ham ekstresinin MCF-7 hücre hattında IC_{50} değeri $0,768 \pm 0,16$ $\mu\text{g/mL}$ olduğundan seçicilik indeksi 39,15 olarak hesaplanmıştır. Bu değer ekstrenin kanserli hücreyi öldürürken normal hücrelere daha az hasar verdiğini, kanserli hücreyi seçme özelliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Fraksiyonlama çalışmalarına, sitotoksik etkili olmasının yanında, meyvelerin temin kolaylığı ve ekstraksiyon verimliliği açısından da avantajlı olan bu tür üzerinden devam edilmiştir.

Sitotoksik aktivite deneylerinde MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine, ilk aşamada kurulan SP LH-20 kolonundan alınan fraksiyonlar SP FR.A, SP FR.B ve SP FR.C kodlu fraksiyonlar 100; 31,6; 10; 3,2 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ dozlarda uygulanmıştır. Deneyler sırasında, elde edilen fraksiyonlarda çözünürlük problemi yaşanmamıştır. Sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil. 4.29'da verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, SP FR.A ve SP FR.B fraksiyonlarının MCF-7 hücrelerine en yüksek 100 $\mu\text{g/mL}$ dozlarda uygulandığında kontrole kıyasla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu (IC_{50} değerleri sırasıyla $50,20 \pm 8,450$ ve $52,47 \pm 9,46$), ancak SP FR.C fraksiyonunun en yüksek dozda dahi anlamlı bir sitotoksik aktivite göstermediği ($IC_{50} > 100$) tespit edilmiştir. CA EtOAc ekstresinin SP LH-20 kolon fraksiyonlarının MCF-10A hücre hattındaki sitotoksitesitesi değerlendirildiğinde ise, SP FR.A için IC_{50} $59,67 \pm 9,94$ $\mu\text{g/mL}$ iken diğer fraksiyonlarda test edilen konsantrasyonlarda sitotoksitesite gözlenmemiştir. Alt ekstrelerin meme hücrelerinde seçicilik indeksleri hesaplandığında SP FR.A'nın 1,19 olduğu bulunmuştur. SP FR.B'nin MCF-10A hücreleri üzerine IC_{50} değeri tam sayı olmadığından (>100 $\mu\text{g/mL}$) 100 varsayımı ile $>1,91$ olduğu hesaplanmıştır. SP FR.C için ise seçicilik indeksi hesaplanamamıştır. Hem SP FR.A hem de SP FR.B'nin seçicilik indeksinin 1'den büyük olması olumlu bir sonuçtur.

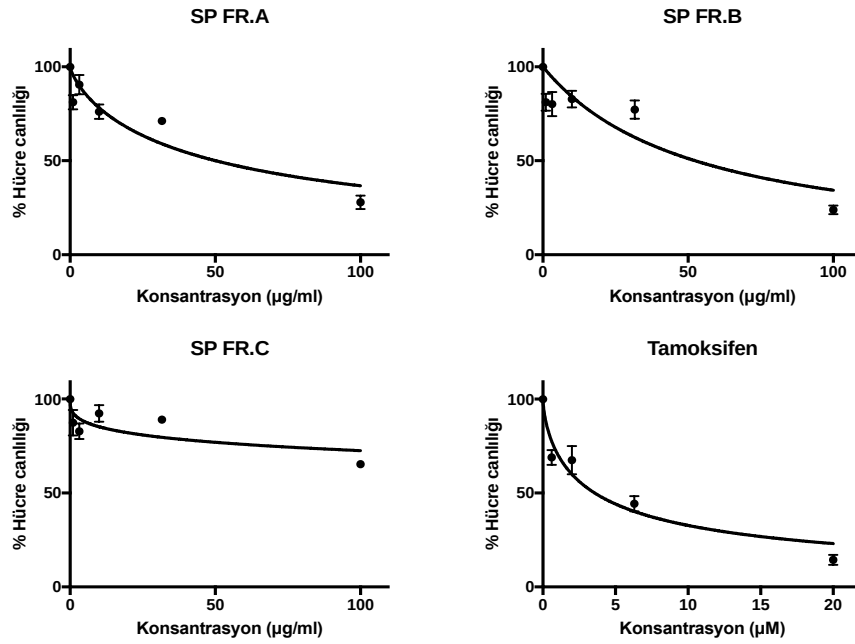
Bununla birlikte, 100 µg/mL dozda SP FR.A ve SP FR.B fraksiyonlarında MCF-7 hücrelerinde tespit edilen aktivite, daha düşük dozlara inildiğinde görülmediğinden, CA EtOAc ham ekstresinde görülen güçlü sitotoksik etkinin (IC_{50} : $0,768 \pm 0,16$) fraksiyonlama ile azaldığı sonucuna varılmıştır. Ham ekstrede bulunan bileşiklerin fraksiyonlama ile etkileri azaldığından, olası sinerjik etkinin kaybolduğu düşünülmüştür. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, izolasyon çalışmalarına, aktivite-yönlendirmeli olarak, fraksiyonlar arasında görece en yüksek aktivite gösteren fraksiyon üzerinde devam edilmiştir.

Çizelge 4.8. CA EtOAc ekstresinin SP LH-20 kolon fraksiyonlarının MCF-7 ve MCF-10A hücre hattındaki sitotoksik etkileri ve seçicilik indeksleri

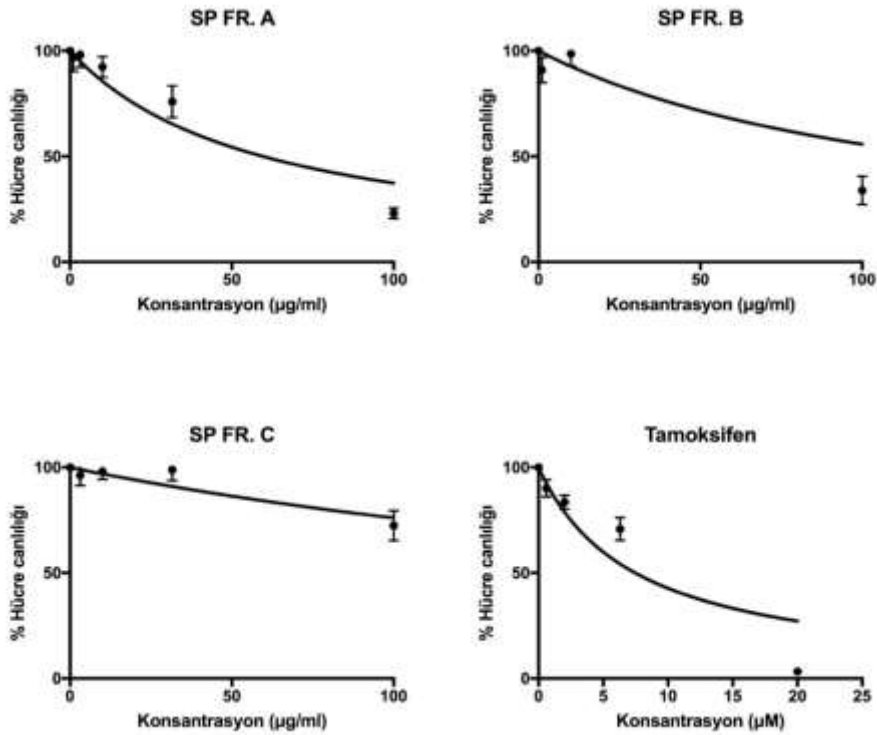
Fraksiyon	$IC_{50} \pm SH$ (MCF-7)	$IC_{50} \pm SH$ (MCF-10A)	Seçicilik indeksi
SP FR.A	$50,20 \pm 8,45$ µg/mL	$59,67 \pm 9,94$ µg/mL	1,19
SP FR.B	$52,47 \pm 9,46$ µg/mL	> 100 µg/mL	> 1,91
SP FR.C	> 100 µg/mL	> 100 µg/mL	-
Tamoksifen	$3,57 \pm 0,62$ µM	$7,47 \pm 1,30$ µM	2,09

SP: Sephadex LH-20; FR: Fraksiyon

A)



B)



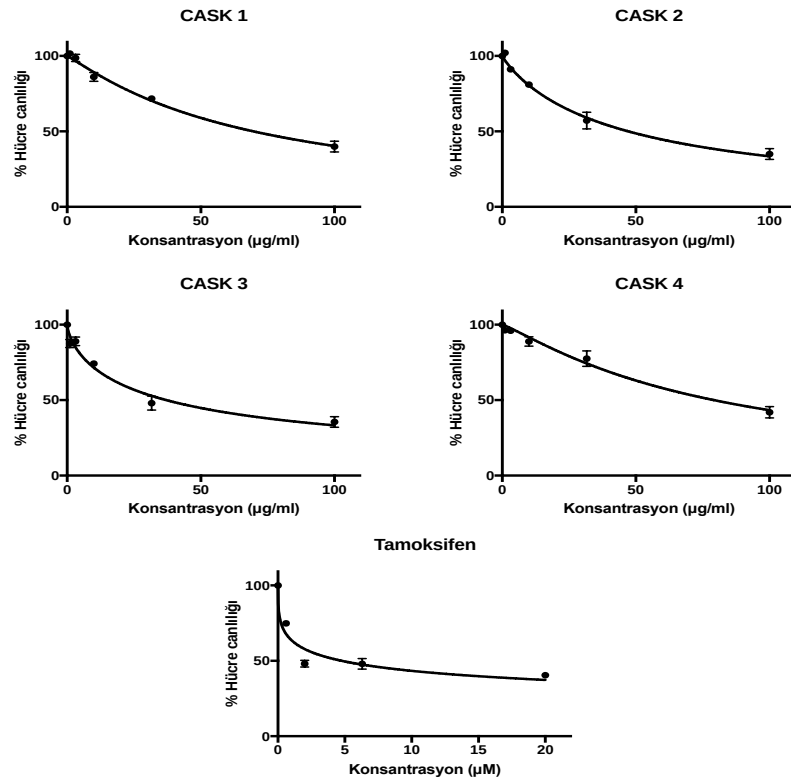
Şekil 4.29. CA EtOAc ekstresinin SP LH-20 kolon fraksiyonlarının A) MCF-7 ve B) MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri

SP LH-20 kolon fraksiyonlarından (SP FR.A + SP FR.B), silika jel kolon kullanılarak elde edilen alt fraksiyonlar (CASK 1-4), MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarına 48 saat süresince uygulanarak hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.30’da verilmiştir. En aktif fraksiyon olarak CASK 3 bulunmuştur. Alt fraksiyonların seçicilik indeksleri (SI) hesaplandığında, değerlerin birbirine yakın olduğu, CASK 1, 2, 3 ve 4 için sırasıyla 0,977; 0,917; 0,847 ve 1,099 olduğu belirlenmiştir. SI değerinin 1’in üzerinde olması istenmekle beraber, CASK 4’ün MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkisi diğer fraksiyonlara göre düşük bulunduğundan, MCF-7 hücre hattında en yüksek sitotoksik etki gösteren alt fraksiyon (CASK 3) üzerinden izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

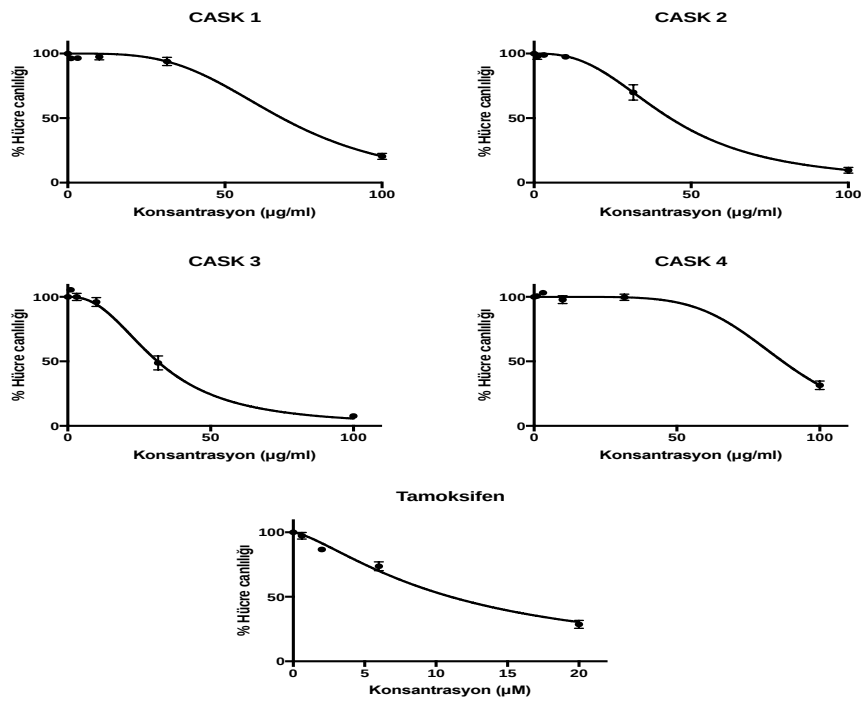
Çizelge 4.9. Silika jel kolon fraksiyonlarının (alt fraksiyonların) MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri ve seçicilik indeksleri

Alt fraksiyon	IC ₅₀ ± SH (MCF-7)	IC ₅₀ ± SH (MCF-10A)	Seçicilik indeksi
CASK 1	69,71 ± 4,66 µg/mL	68,15 ± 3,01 µg/mL	0,977
CASK 2	47,17 ± 4,17 µg/mL	43,30 ± 2,11 µg/mL	0,917
CASK 3	37,10 ± 4,26 µg/mL	31,43 ± 1,44 µg/mL	0,847
CASK 4	79,19 ± 7,10 µg/mL	87,02 ± 11,86 µg/mL	1,099
Tamoksifen	4,77 ± 0,90 µM	11,03 ± 0,63 µM	2,312

A)



B)



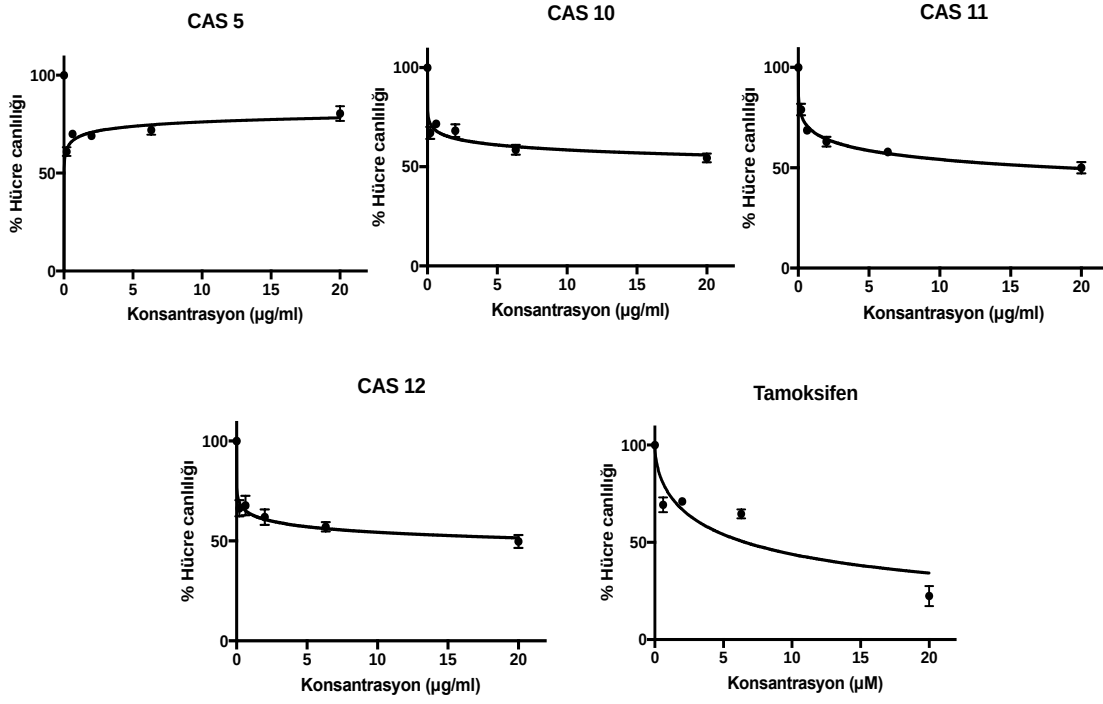
Şekil 4.30. Silika jel kolon fraksiyonlarının (alt fraksiyonların) MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri

CASK 3'ten izole edilen CAS 5 (izomeranzin), CAS 10 (3-metoksi nobiletin), CAS 11 (nobiletin) ve CAS 12 (tangeretin) kodlu bileşikler üzerinde MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarına karşı hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.31). MCF-7 hücrelerinde incelenen izole bileşikler içerisinde en aktif bileşiğin CAS 11 olduğu tespit edilmiştir. Diğer bileşikler test edilen konsantrasyonlarda belirgin sitotoksik aktivite göstermemiştir. İzole edilen bileşiklerin MCF-10A sağlıklı hücreleri üzerinde yapılan sitotoksik aktivite çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre, nobiletinin SI değerinin 1'in üzerinde olduğu anlaşılmaktadır. Bu veriler doğrultusunda, *in vivo* deneylerde etki değerlendirme çalışmaları için CAS 11 (nobiletin) bileşiği öne çıkmıştır.

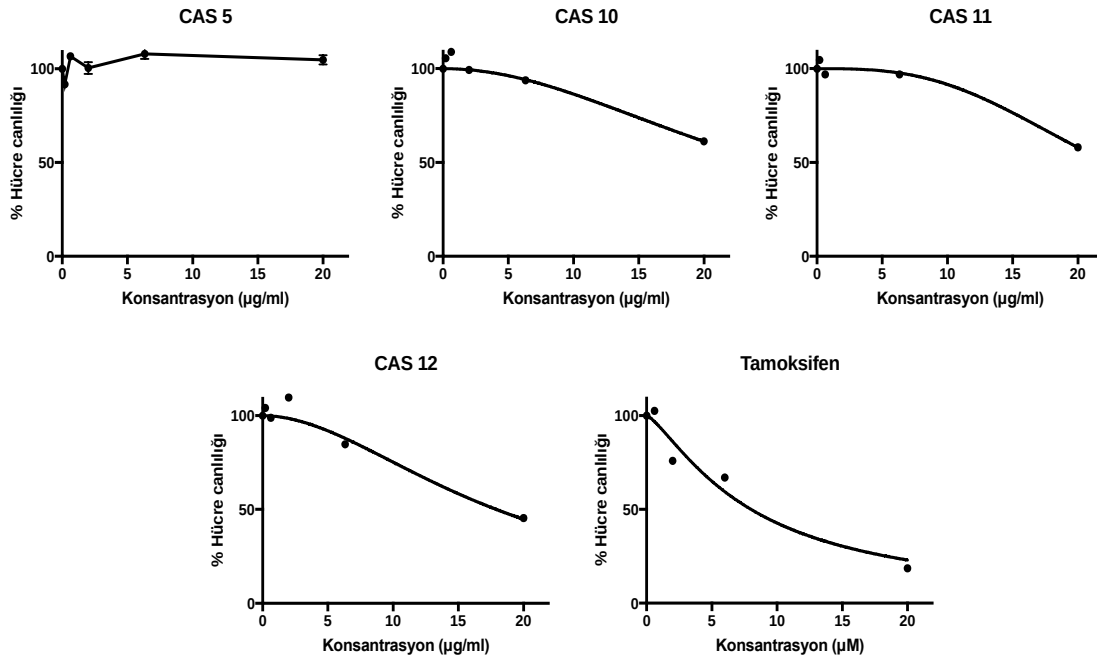
Çizelge 4.10. CASK 3'ten izole edilen bileşiklerin MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri ve seçicilik indeksleri

Bileşik	IC ₅₀ ± SH (MCF-7)	IC ₅₀ ± SH (MCF-10A)	Seçicilik indeksi
CAS 5	>20 µg/mL	>20 µg/mL	-
CAS 10	>20 µg/mL	>20 µg/mL	-
CAS 11	18,87 ± 4,73 µg/mL	>20 µg/mL	> 1,1
CAS 12	>20 µg/mL	17,92 ± 1,21 µg/mL	< 0,9
Tamoksifen	6,56 ± 1,36 µM	8,00 ± 0,73 µM	1,22

A)



B)



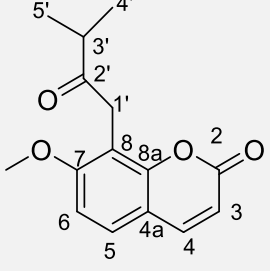
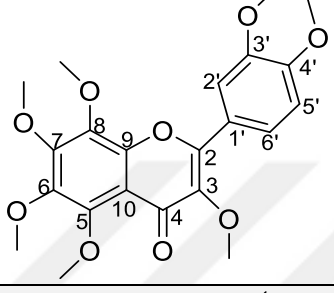
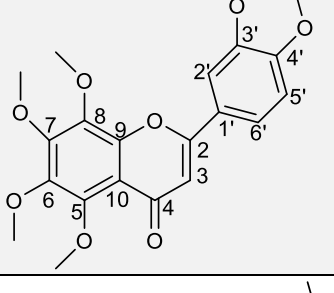
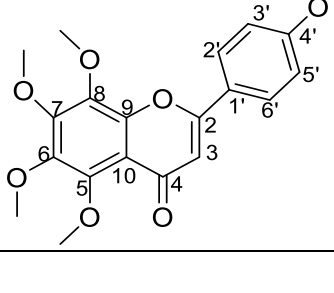
Şekil 4.31. CASK 3'ten izole edilen bileşiklerin MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri

4.3. *In silico* Biyolojik Çalışma Sonuçları

Aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ve izolasyon çalışmaları sonucunda dört tane bileşik izole edilerek kimyasal yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşikler izomeranzin (CAS 5), 3-metoksi nobiletin (CAS 10), nobiletin (CAS 11) ve tangeretin (CAS 12)'dir. Bileşiklerin yapı-aktivite ilişkisi analizleri ile antikanser aktiviteye yönelik tahmin sonuçlarının elde edilmesi ve mevcut *in vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen sonuçlar için destekleyici veri sağlanması amaçlanmıştır.

Bilgisayar tabanlı biyolojik aktivite değerlendirmesi ile öncelikli olarak antikanser aktivitesi açısından olasılık değerlendirmesi yapılmakla birlikte, ilgili kimyasallara ait biyolojik aktivite açısından mevcut veritabanı temel alınarak, en yüksek olasılıkla görülebilecek üç aktivite bilgisi de verilmiştir. Bu amaçla PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) programı kullanılmıştır (Filimonov ve diğerleri, 2014). Bu yazılım, organik ilaç benzeri bir molekülün genel biyolojik potansiyelini değerlendirmek için tasarlanmış olup 4000'den fazla aktivite türü için tahmin yapmaktadır. Antikanser etkide rol oynayabilecek biyolojik aktiviteler temel alınarak ilgili biyolojik aktivite için molekülün aktif olma olasılıkları (Pa) belirlenmiştir. Pa olasılığı, tahmin edilen molekülün veri setindeki "aktifler" alt kümesinde en tipik olan moleküllerin yapılarıyla benzerliğini yansıtmaktadır. Analizler "Pa-Pi" (Pi: inaktif olma olasılığı) değerleri dikkate alınarak sıralanmıştır. Değerlerin 0,7'den büyük olması olasılık açısından daha anlamlıdır. Pa için 0,3 değerinin altı alınmamıştır. Bununla birlikte, sonuçların yorumlanması sırasında, olasılık tahmininde bileşiğin yazılımda düşük olasılıklı çıkması veri setinde benzer yapıda bileşiklerin olmadığını ve yeni bir molekül-aktivite keşfini de seçenekler arasında sunmaktadır. *In silico* analizlerde ayrıca CLC-Pred (hücre hattı sitotoksikite tahmincisi) yazılımı (v. 2.0) kullanılarak kanser hücre hatlarında bileşiklerin olası sitotoksik etkisinin tahmini gerçekleştirilmiştir (Lagunin ve diğerleri, 2018). Diğer taraftan, bu bileşiklerin mutajenite değerlendirmesi için yaygın kullanımı bulunan VEGA QSAR mutajenite konsensüs modeli (v.1.0.4), ToxTree (SAR) mutajenite modeli (v.3.1.0) ve ToxRead (0.25 Beta) (Read-across) yaklaşımları ile mutajenik aktivite değerlendirmeleri de yapılmıştır. Bileşikler yazılımlara basitleştirilmiş moleküler girdi hattı giriş sistemi (SMILES) kullanılarak girilmiştir. Bu bileşiklere ait kimyasal yapılar, Cas numaraları ve *in silico* analizlerde kullanılan SMILES bilgileri Çizelge 4.11'de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. *In silico* analizleri yapılan bileşiklerin bilgileri

Bileşik adı	Cas No	Kimyasal yapı	SMILES
İzomeranzin	1088-17-1		<chem>CC(C)C(=O)CC1=C(C=CC2=C1OC(=O)C=C2)OC</chem>
3-Metoksi nobiletin	1178-24-1		<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(O2)C(=C(C(=C3OC)OC)OC)OC)OC)OC</chem>
Nobiletin	478-01-3		<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(O2)C(=C(C(=C3OC)OC)OC)OC)OC</chem>
Tangeretin	481-53-8		<chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(O2)C(=C(C(=C3OC)OC)OC)OC</chem>

Yapısı aydınlatılmış bileşiklere ait antikanser aktiviteye yönelik tahmin sonuçları Çizelge 4.12’de gösterilmiştir. İzomeranzine ait antikanser aktiviteye yönelik tahmin sonuçlarına bakıldığında en yüksek 0,691 olasılıkla antineoplastik amaçlı kullanılabileceği hesaplanmıştır. Araştırılan dört bileşik arasında antikanser aktivite açısından en az sonuç veren bileşik izomeranzin olmuştur. Diğer üç bileşik antikanser aktivite açısından benzer sonuçlar vermiş, antineoplastik etki, apoptozis agonisti ve serbest radikal süpürücü etkiler açısından 0,7 olasılık değeri üzerinde aktivite tahmin edilmiştir.

PASS biyolojik aktivite analizlerinde antikanser aktiviteden bağımsız olarak veri seti temel alındığında en yüksek olasılıkla ilişkilendirilen aktiviteler; izomeranzin için kardiyovasküler analeptik (0,882–0,004), CYP2A11 substratı (0,854–0,003) ve CYP2C12 substratı (0,865–0,020) olarak bulunmuştur. 3-Metoksi nobiletin için klordekon redüktaz inhibitörü (0,942–0,003), membran bütünlüğü agonisti (0,923–0,003) ve HIF1A ekspresyon inhibitörü (0,910–0,005) olma olasılığı yüksektir. Nobiletin için en yüksek hesaplanmış aktiviteler sırasıyla, HIF1A ekspresyon inhibitörü (0,946–0,004), klordekon redüktaz inhibitörü (0,941–0,003) ve membran bütünlüğü agonisti (0,919–0,007)’dir. Tangeretin bileşiğinin de benzer şekilde klordekon redüktaz inhibitörü (0,945–0,003), HIF1A ekspresyon inhibitörü (0,942–0,004) ve membran bütünlüğü agonisti (0,937–0,004) olarak yüksek olasılıkla aktivite göstereceği hesaplanmıştır.

Çizelge 4.12. İzole edilen bileşiklerin antikanser aktivite ile ilişkili PASS ile hesaplanmış sonuçları

Bileşik	Pa - Pi	Biyolojik aktivite
İzomeranzin	0,691 - 0,028	Antineoplastik
	0,617 - 0,009	Meme kanserinde antineoplastik
	0,539 - 0,008	Serbest radikal süpürücü
	0,496 - 0,021	Antimetastatik
	0,471 - 0,046	Apoptoz agonisti
	0,376 - 0,025	Kemopreventif
	0,322 - 0,050	Antikarsinojenik
	0,325 - 0,072	Solid tümörlerde antineoplastik
3-Metoksi nobiletin	0,892 - 0,004	Apoptoz agonisti
	0,864 - 0,006	Antineoplastik
	0,704 - 0,004	Serbest radikal süpürücü
	0,665 - 0,007	Meme kanserinde antineoplastik
	0,656 - 0,006	Antilösemik
	0,613 - 0,004	Antioksidan
	0,583 - 0,009	Kolorektal kanserde antineoplastik
	0,581 - 0,011	Kemopreventif
	0,566 - 0,009	Kolon kanserinde antineoplastik
	0,531 - 0,007	Prostat kanseri tedavisi
	0,528 - 0,005	Küçük hücreli akciğer kanserinde antineoplastik
	0,534 - 0,012	Akciğer kanserinde antineoplastik
	0,528 - 0,017	Antikarsinojenik
	0,506 - 0,006	Melanomada antineoplastik
	0,538 - 0,040	Preneoplastik durumların tedavisi
	0,481 - 0,005	Serviks kanserinde antineoplastik
	0,479 - 0,005	Skuamöz hücreli karsinomada antineoplastik
	0,459 - 0,005	Karsinomada antineoplastik
	0,448 - 0,006	Beyin kanserinde antineoplastik
	0,434 - 0,026	Solid tümörlerde antineoplastik
Nobiletin	0,880 - 0,005	Apoptoz agonisti
	0,848 - 0,007	Antineoplastik
	0,742 - 0,003	Serbest radikal süpürücü
	0,698 - 0,005	Meme kanserinde antineoplastik
	0,641 - 0,008	Kemopreventif
	0,636 - 0,007	Antilösemik
	0,630 - 0,004	Antioksidan
	0,592 - 0,009	Kolorektal kanserde antineoplastik
	0,591 - 0,013	Antikarsinojenik
	0,577 - 0,009	Kolon kanserinde antineoplastik
	0,525 - 0,005	Melanomada antineoplastik
	0,491 - 0,005	Serviks kanserinde antineoplastik
	0,491 - 0,014	Akciğer kanserinde antineoplastik
	0,462 - 0,005	Skuamöz hücreli karsinomada antineoplastik
	0,458 - 0,005	Karsinomada antineoplastik
	0,441 - 0,006	Beyin kanserinde antineoplastik
	0,426 - 0,007	Küçük hücreli akciğer kanserinde antineoplastik
	0,423 - 0,010	Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde antineoplastik
	0,474 - 0,063	Preneoplastik durumların tedavisi
	0,380 - 0,007	Sarkomada antineoplastik
	0,385 - 0,012	Over kanserinde antineoplastik
	0,311 - 0,005	Uterus kanserinde antineoplastik

Çizelge 4.12. (devam) İzole edilen bileşiklerin antikanser aktivite ile ilişkili PASS ile hesaplanmış sonuçları

Tangeretin	0,888 – 0,004	Apoptoz agonisti
	0,824 – 0,009	Antineoplastik
	0,715 – 0,004	Serbest radikal süpürücü
	0,679 – 0,006	Meme kanserinde antineoplastik
	0,645 – 0,004	Antioksidan
	0,616 – 0,008	Antilösemik
	0,606 – 0,010	Kemopreventif
	0,531 – 0,011	Kolorektal kanserde antineoplastik
	0,517 – 0,011	Kolon kanserinde antineoplastik
	0,503 – 0,006	Melanomada antineoplastik
	0,489 – 0,011	Prostat kanseri tedavisi
	0,489 – 0,020	Antikarsinojenik
	0,457 – 0,006	Serviks kanserinde antineoplastik
	0,453 – 0,005	Beyin kanserinde antineoplastik
	0,460 – 0,016	Akciğer kanserinde antineoplastik
	0,448 – 0,005	Skuamöz hücreli karsinomada antineoplastik
	0,437 – 0,006	Karsinomada antineoplastik
	0,414 – 0,007	Küçük hücreli akciğer kanserinde antineoplastik
	0,447 – 0,074	Preneoplastik durumların tedavisi
	0,373 – 0,008	Sarkomada antineoplastik
	0,365 – 0,014	Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde antineoplastik
	0,364 – 0,013	Over kanserinde antineoplastik

CLC-Pred ile en yüksek olasılıkla sitotoksik aktivite gösterebilecek üç kanser hattı incelendiğinde, izomeranzin için en yüksek (0,646–0,007) T47D – meme karsinoma, daha sonra ise (0,375–0,078) NALM-yetişkin B akut lenfoblastik lösemi ve (0,357–0,060) HL-60 – promiyeloblast lösemi hücre hatlarında sitotoksik etki gösterebileceği hesaplanmıştır. 3-Metoksi nobiletin için en yüksek (0,356–0,009) CWR22R- prostat karsinoma epitelyal hücre hattı, (0,374–0,054) HL-60 – promiyeloblast lösemi hücre hattı ve (0,307–0,029) LS174T – kolon adenokarsinoma hücre hatlarında sitotoksik aktivite tahmini yapılmıştır. Nobiletin için en yüksek (0,332–0,017) CWR22R – prostat karsinoma epitelyal hücre hattı, (0,361–0,058) HL-60 – promiyeloblast lösemi hücre hattı ve (0,323–0,020) LS174T – kolon adenokarsinoma hücre hatlarında sitotoksik aktivite tahmini yapılmıştır. Çalışmamızda, MCF-7 hücre hattında sitotoksik aktivitesi en yüksek olan nobiletin bileşiğinin CDC-Pred analizi ile MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik aktivite tahmini “0,359–0,103” olarak belirlenmiştir. Tangeretin bileşiğinin en yüksek olasılıkla sitotoksik aktivite görülebilecek kanser hücre hatları tahminleri ise, (0,377–0,053) HL-60 – promiyeloblast lösemi hücre hattı, (0,325–0,020) CWR22R – prostat karsinoma epitelyal hücre hattı ve (0,321–0,026) AGS – gastrik adenokarsinomadır.

Çizelge 4.13. İzole bileşiklerin mutajenik aktivite değerlendirme sonuçları

Bileşik adı	ToxTree	Vega QSAR (skor)	ToxRead (skor)	Son Değerlendirme
İzomeranzin	+	+ (0,2)	+ (0,51)	Mutajenik
3-Metoksi nobiletin	+	- (0,45)	- (0,95)	Mutajenik değil
Nobiletin	-	- (0,5)	- (0,95)	Mutajenik değil
Tangeretin	-	- (0,35)	- (0,81)	Mutajenik değil

Mutajenik aktivite değerlendirmesinde ise (Çizelge 4.13), bilgi temelli ve istatistik temelli yaklaşımların çapraz okuma yaklaşımı ile desteklendiği analizde, izomeranzinin “mutajenik” olduğu bulunmuştur. ToxTree *in vitro* mutajenite modülünde bileşiğin “kumarinler ve furokumarinler” uyarıcı grubunu içerdiği belirlenmiştir. 3-Metoksi nobiletin bileşiğinde ToxTree yazılımı flavonoit yapı ile ilişkili yapısal uyarıcı vermesine karşın total değerlendirmede bileşiğin “mutajenik olmadığı” belirlenmiştir. Nobiletin ve tangeretin bileşikler de tüm yaklaşımlarda “mutajenik değil” olarak tahmin edilmiştir.

4.4. *In vivo* Biyolojik Aktivite Çalışma Sonuçları

Sıçanlara NMU uygulamasının ardından meme bezleri haftada bir kez muayene edilmiştir ve tümör büyüklüğü 200 mm³ hacime ulaşan hayvanlarda tedaviye başlanmıştır. *In vitro* sitotoksik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ve izolasyon çalışmaları doğrultusunda en aktif bulunan Ekstre (CA EtOAc), Fraksiyon (SP. FR.A+B), Alt fraksiyon (CASK-3) ve bileşik (Nobiletin) deney hayvanlarına uygulanmıştır. Tedavi uygulamaları başladıktan sonra hayvanların ağırlık değişimleri, tümör hacimleri ve genel sağlık kontrolleri haftalık olarak kontrol edilerek uygulamalara devam edilmiştir. Protokolün son günü tüm hayvanlar derin genel anestezi altında kalpten kan alınarak sakrifiye edilmiş ve tüm meme dokuları çıkarılarak biyokimyasal, immünohistokimyasal, rutin histopatolojik analizler ve gen analizleri için uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Tüm hayati organlar metastaz yönünden makroskobik olarak değerlendirilmiştir. Metastaz görülen organlarda da histopatolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Hayvan ağırlıkları ve tümör hacimleri

Her hafta tartılan hayvanların ağırlıkları ve ölçülen tümörlerinin hesaplanan hacimleri Çizelge 4.14 ve 4.15’te sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Hayvanların haftalık vücut ağırlık ölçümleri

H	Hayvan ağırlığı (g) ortalaması $\pm$ SH						
	Sham	Kontrol	Tamoksifen	Ekstre	SP FR.A+B	CASK-3	Nobiletin
1	141,33 $\pm$ 3,72	141,66 $\pm$ 3,89	146,16 $\pm$ 4,41	148,00 $\pm$ 5,20	152,50 $\pm$ 4,28	162,00 $\pm$ 5,07**	158,43 $\pm$ 3,01*
2	195,33 $\pm$ 2,33	189,13 $\pm$ 2,52	198,16 $\pm$ 4,82	194,00 $\pm$ 9,04	213,16 $\pm$ 4,34*	201,16 $\pm$ 10,24	195,57 $\pm$ 2,59
3	205,66 $\pm$ 1,99	192,43 $\pm$ 2,28	200,00 $\pm$ 4,29	198,17 $\pm$ 8,77	218,33 $\pm$ 2,70**	206,67 $\pm$ 10,38	201,0 $\pm$ 3,24
4	225,67 $\pm$ 3,21***	195,25 $\pm$ 0,82	207,83 $\pm$ 4,06	199,50 $\pm$ 10,20	224,67 $\pm$ 1,36**	213,00 $\pm$ 9,38	213,43 $\pm$ 2,49
5	250,67 $\pm$ 2,82***	195,88 $\pm$ 2,55	213,50 $\pm$ 5,37	203,50 $\pm$ 9,04	223,33 $\pm$ 2,85**	223,33 $\pm$ 9,78**	217,14 $\pm$ 3,99*
6	267,83 $\pm$ 2,97****	191,00 $\pm$ 3,29	218,17 $\pm$ 3,44**	210,00 $\pm$ 8,29	226,17 $\pm$ 3,84***	222,83 $\pm$ 10,28***	218,14 $\pm$ 3,92**
7	280,67 $\pm$ 2,43****	197,13 $\pm$ 2,61	222,67 $\pm$ 4,49**	212,50 $\pm$ 6,51	220,67 $\pm$ 3,73*	234,50 $\pm$ 9,98****	224,00 $\pm$ 4,29**
8	288,33 $\pm$ 3,62****	193,17 $\pm$ 1,94	223,50 $\pm$ 2,95**	217,83 $\pm$ 8,67*	226,00 $\pm$ 4,39***	227,33 $\pm$ 8,41***	227,00 $\pm$ 3,77***

Elde edilen bulgular, tabloda “Ortalama değer $\pm$ Standart hata (SH)” olarak verilmiştir. Grup değerleri Kontrol Grubu ile karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$; H: Hafta

Çizelge 4.14 ve 4.15’te sunulan, sırasıyla hayvan vücut ağırlığı ve tümör hacim verileri, tedavi protokolünün ilk haftasının son gününde başlayarak, takip eden sekizinci haftanın son gününde yapılan ölçümleri göstermektedir. Sham grubu hayvanlarına herhangi bir uygulama (deney indüksiyonu, tedavi vs.) yapılmadığından, ortalama haftalık ağırlık artışlarının normal seyrinde devam ettiği gözlenmiştir. Sıçanların vücut ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu hayvanlarının ortalama vücut ağırlıklarının ikinci haftanın sonundan sekizinci haftanın sonuna kadar, diğer tüm gruplardan düşük seyrettiği; kontrol grubu sonuçlarıyla kıyaslandığında, sekizinci haftanın sonunda ekstre grubunun ($p<0,05$); referans grubunun ($p<0,01$) fraksiyon, alt fraksiyon ve bileşik gruplarının ($p<0,001$) istatistiksel anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. Tümör oluşumu gözlenen sıçanlardaki ağırlık artışında azalmanın olması, bu azalmanın en yüksek oranda kontrol grubunda tespit edilmiş olması beklenen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Tümör hacminin hesaplanması için $V=0,5 \times (W^2 \times L)$ formülü kullanılmıştır (V: Tümör Büyüklüğü; W: Tümörün kısa kenarının uzunluğu; L: Tümörün uzun kenarının uzunluğu) (Jun ve diğerleri, 2020). Tümör oluşumunun, NMU uygulamasından ortalama 6 hafta sonra gerçekleştiği belirlenmiştir. Daha önce yapılan *in vivo* çalışmalarda da, kimyasal ajanlarla oluşturulan tümörlerin benzer zamanlarda oluşum gösterdiği rapor edildiğinden, çalışmalarımız daha önceki yapılan bu çalışmalara paralellik göstermiştir (Belobrajdic ve McIntosh, 2000; Tsubura ve diğerleri, 2011).

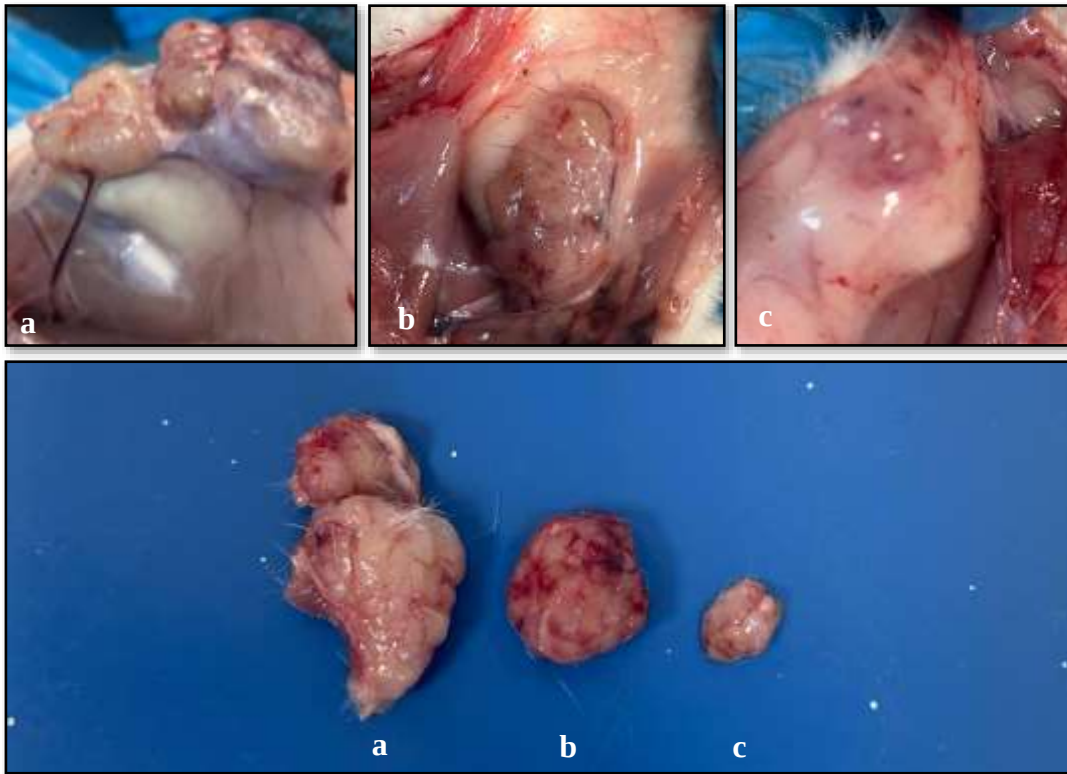


Çizelge 4.15. Ölçülen tümörlerin hesaplanan hacimleri

H	Tümör hacmi (mm ³) ortalaması ± SH						
	Sham	Kontrol	Tamoksifen	Ekstre	SP FR.A+B	CASK-3	Nobiletin
1	0,0±0,0****	1501,80±116,97	1068,21±157,85	1069,20±216,69	1550,67±111,16	1461,25±181,048	1146,97±39,28
2	0,0±0,0****	6076,13±1093,81	1879,64±182,23****	2286,08±657,49***	2103,55±484,14***	2088,80±452,61***	1483,95±466,93****
3	0,0±0,0****	14052,34±5863,90	1862,63±410,86***	1583,67±432,58***	2094,67±487,51***	1307,87±415,29***	1803,83±377,81***
4	0,0±0,0****	12481,50±1125,21	1695,31±155,55****	4145,75±837,95****	2802,08±320,49****	2463,98±210,62****	2886,84±265,28****
5	0,0±0,0***	13711,47±5315,21	1158,93±432,97***	4289,30±1113,29*	2885,43±1010,12**	2055,42±535,58**	3016,35±684,37**
6	0,0±0,0****	10695,97±983,87	1037,00±176,22****	1575,33±116,94****	2610,10±412,20****	2088,80±244,80****	2239,16±1192,09****
7	0,0±0,0****	10177,80±2044,76	1134,29±695,52****	4980,42±1593,81*	2601,04±687,09***	4711,00±1314,09*	2820,96±547,54***
8	0,0±0,0****	10688,18±2016,64	501,10±269,35****	2915,80±957,70****	4131,34±655,04***	4367,14±909,04***	2390,62±321,37****

Elde edilen bulgular, tabloda “Ortalama değer ± Standart hata (SH)” olarak verilmiştir. Grup değerleri Kontrol Grubu ile karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ H: Hafta

Tümör hacim sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu hayvanlarının ortalama tümör hacimlerinin ikinci haftanın sonundan sekizinci haftanın sonuna kadar, diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubundaki hayvanlara herhangi bir tedavi uygulanmadığından, tümör hacminin 8. haftanın sonunda yüksek bulunması ($10688,18 \pm 2016,64 \text{ mm}^3$) beklenen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Tüm hayvanlarda ölçülen tümör hacimlerinin zamana bağlı olarak artış veya azalış gösterdiği, grup içi varyasyonların da bazı ölçüm zamanlarında daha fazla olduğu gözlenmiştir. Tedavi sonrası haftalık tümör hacmi ölçümleri değerlendirildiğinde, referans grubundaki tümör hacimlerinin daha kontrollü seyrettiği; diğer gruplarda ise dalgalanmaların (artış veya azalış oranları) daha fazla olduğu görülmektedir. Ekstre grubunda, 7. haftanın sonundaki ölçüme kıyasla ($4980,42 \pm 1593,81 \text{ mm}^3$), 8. haftanın sonunda yapılan ölçümde tümör hacminde hızlı bir düşüş kaydedilmiştir ($2915,80 \pm 957,70 \text{ mm}^3$). Diğer taraftan, SP FR.A+B grubunda 2. haftadan 7. haftaya kadar kontrollü giden tümör hacmi ($2094,67 \pm 487,51$ - $2885,43 \pm 1010,12 \text{ mm}^3$ aralığında) 8. hafta sonunda artış göstermiştir ($4131,34 \pm 655,04$). Nobiletin grubu hayvanlarının tümör hacimleri 1. haftadan itibaren 8. haftaya kadar $1146,97 \pm 39,28 \text{ mm}^3$ - $3016,35 \pm 684,37 \text{ mm}^3$ arasında ölçülmüş, son hafta tümör hacmi ise $2390,62 \pm 321,37 \text{ mm}^3$ olarak hesaplanmıştır. Bu grupta en yüksek tümör hacmi 5. haftanın sonunda hesaplanmış; 6, 7, ve 8. haftalarda tümör hacimleri kontrollü seyretmiştir. Tedavi grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında, her haftanın ölçümleri için farklı oranlarda istatistiksel anlamlılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Sakrifikasyondan önce yapılan ölçümlerde (8. haftanın sonu) referans, ekstre ve nobiletin grupları için hesaplanan tümör hacimlerinin sırasıyla $501,10 \pm 269,35$; $2915,80 \pm 957,70$ ve $2390,62 \pm 321,37 \text{ mm}^3$ olduğu ve bu değerlerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu ($p < 0,0001$) tespit edilmiştir. Deney sonunda en iyi iyileşmeyi gösteren deney gruplarından ekstre ve nobiletin grupları için tüm haftalar bazında istatistiksel karşılaştırma yapılmış ancak iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). İyileşmenin en iyi olduğu nobiletin ile tedavi edilen grupta gözlenen tümör hacmi küçülmesinin; tedavi almayan kontrol grubu ve tamoksifen ile tedavi edilen referans grubuna kıyasla deney sonunda alınan fotoğraf görüntüsü Resim 4.1’de verilmiştir.



a. Kontrol grubu; b. Nobiletin grubu; c. Tamoksifen grubu

Resim 4.1. Deney sonunda hayvanlarda gözlenen tümör görüntü örnekleri

4.5. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Sakrifikasyon sonucunda alınan kan örneklerinin serumları ayrıştırılmış ve daha önceki çalışmalarda meme tümörü ile ilişki olduğu rapor edilmiş biyokimyasal parametrelerin ($CD4^+$ ve $CD8^+$, IFN-gamma) düzeyleri ölçülmüştür. Kan biyokimyasal analizleri türe spesifik kitler kullanılarak üretici firmanın kullanım talimatına göre yapılmıştır. Deney protokolü sonunda çıkarılan tümör gelişmiş meme dokularında CXCL-9, CXCL-10 ve CXCL-11 düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir (Cheng ve Lopez, 1998). Biyokimyasal analizlerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16 ve 4.17’de sunulmuştur.

Çizelge 4.16. Serum CD4⁺, CD8⁺ ve IFN-gamma düzeyleri

Grup adı	CD4 ⁺ (ng/mL)	CD8 ⁺ (ng/mL)	IFN-gamma (ng/L)
Sham	41,39±2,48	44,30±4,39	21,35±0,62*
Kontrol	50,81±3,09	65,96±9,69	29,79±5,03
Tamoksifen	49,57±2,72	59,17±4,95	20,38±1,34*
Ekstre	45,50±2,59	73,07±2,27	25,53±2,32
SP FR.A+B	32,61±6,32**	74,77±6,93	23,77±1,76
CASK-3	43,55±1,69	54,04±7,05	22,07±0,40
Nobiletin	37,47±3,43*	55,57±9,85	17,09±0,89**

Elde edilen bulgular, tabloda “Ortalama değer ± Standart hata (SH)” olarak verilmiştir. Grup değerleri Kontrol Grubu ile karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

Tümör gelişimi ve uygulanan tedavilerin bağışıklık hücrelerinin dinamikleri ve enflamasyon süreçlerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla, çalışmamızda, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri ve IFN-gamma’nın kandaki düzeylerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, tedavi gruplarında CD4⁺ ve CD8⁺ hücre düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğunu; meydana gelen azalmanın CD4⁺ düzeyi için SP FR.A+B ($32,61 \pm 6,32$; $p<0,01$) ve nobiletin ($37,47 \pm 3,43$, $p<0,05$) gruplarında, kontrol grubuna ($50,81 \pm 3,09$) kıyasla anlamlı olduğunu göstermiştir. Kan CD8⁺ seviyesinde tedavi uygulaması ile gözlenen azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Kan IFN-gamma seviyesinin, kontrol grubuna ($29,79 \pm 5,03$) kıyasla sham $21,35 \pm 0,62$, $p<0,05$; referans ($20,38 \pm 1,34$; $p<0,05$) ve nobiletin grubunda ($17,09 \pm 0,89$, $p<0,01$) anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. Doku CXCL seviyeleri

Grup adı	CXCL-9 (ng/L)	CXCL-10 (ng/L)	CXCL-11 (ng/L)
Sham	209,53 ± 24,68****	119,85 ± 10,22**	40,98 ± 9,63*
Kontrol	438,15 ± 52,04	211,06 ± 26,90	78,59 ± 10,97
Tamoksifen	250,40 ± 19,84**	136,25 ± 20,147*	74,59 ± 6,35
Ekstre	245,82 ± 41,03**	139,63 ± 19,49*	60,91 ± 9,45
SP FR.A+B	255,86 ± 35,18**	107,33 ± 9,95**	58,66 ± 6,12
CASK-3	257,89 ± 23,44**	103,57 ± 9,84****	55,96 ± 7,95
Nobiletin	169,84 ± 17,31****	114,81 ± 22,81**	42,78 ± 5,24*

Elde edilen bulgular, tabloda “Ortalama değer ± Standart hata (SH)” olarak verilmiştir. Grup değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

CXCL-9 ve CXCL-10 ve CXCL-11 düzeylerinin azalması tedavide istenen bir durumdur. Tedavi gruplarında, her üç kemokin düzeyinde de azalma saptanmıştır. CXCL-9 düzeylerinde tedavi gruplarında anlamlı düzeyde azalış olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$ ve nobiletin için $p<0,0001$). Doku CXCL-9 seviyesi değerlendirildiğinde tedavi gruplarında yine istatistiksel olarak anlamlı düşüş kaydedilmiştir; CXCL-11 düzeyleri için sadece nobiletin grubunda anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($42,78 \pm 5,24$; $p<0,05$).

4.6. Gen Ekspresyon Sonuçları

Çalışmamızda meme dokularında yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda (Çizelge 4.18) GM-CSF, östrojen α ve progesteron ekspresyonları kontrol grubuna göre, tedavi gruplarında azalmış, ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Diğer taraftan, östrojen β ekspresyonunun, referans ($1,45 \pm 0,29$; $p<0,001$), ekstre ($1,16 \pm 0,32$; $p<0,001$), SP FR.A+B ($1,40 \pm 0,18$; $p<0,01$), CASK-3 ($0,95 \pm 0,12$; $p<0,001$) ve nobiletin ($0,93 \pm 0,15$; $p<0,001$) gruplarında kontrol grubuna ($7,69 \pm 3,32$) kıyasla baskılandığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, referans ($1,31 \pm 0,38$; $p<0,001$) ekstre ($1,69 \pm 0,44$; $p<0,01$), SP FR.A+B ($0,95 \pm 0,50$; $p<0,0001$), CASK-3 ($1,41 \pm 0,33$; $p<0,001$) ve nobiletin ($1,09 \pm 0,19$; $p<0,0001$) gruplarında Bax geni ekspresyonunun kontrol grubuna ($3,90 \pm 0,56$) kıyasla baskılandığı, değerlerin sağlıklı sham grubuna yaklaştığı tespit edilmiştir. Bcl2 ekspresyonu ise kontrol grubuna kıyasla ($0,12 \pm 0,02$) nobiletin uygulanan grupta artmış ($0,91 \pm 0,13$; $p<0,0001$), sham grubuna yaklaşan bir değer göstermiştir. Diğer tedavi gruplarında ise referans ($0,23 \pm 0,12$) ve SP FR.A+B ($0,09 \pm 0,01$) grupları dışında, değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.18. Meme dokularında yapılan gen ekspresyon analizleri

Grup adı	GM-CSF	BAX	Bcl2	Östrojen α	Östrojen β	Progesteron
Sham	$0,89 \pm 0,12^*$	$0,93 \pm 0,13^{****}$	$1,09 \pm 0,17^{****}$	$0,95 \pm 0,24$	$0,91 \pm 0,12^{***}$	$1,00 \pm 0,22$
Kontrol	$2,70 \pm 0,49$	$3,90 \pm 0,56$	$0,12 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,29$	$7,69 \pm 3,32$	$2,42 \pm 0,74$
Tamoksifen	$1,76 \pm 0,53$	$1,31 \pm 0,38^{***}$	$0,23 \pm 0,12$	$0,86 \pm 0,19$	$1,45 \pm 0,29^{***}$	$1,07 \pm 0,38$
Ekstre	$1,38 \pm 0,25$	$1,69 \pm 0,44^{**}$	$0,11 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,32$	$1,16 \pm 0,32^{***}$	$0,95 \pm 0,29$
SP FR.A+B	$1,72 \pm 0,57$	$0,95 \pm 0,50^{****}$	$0,09 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,19$	$1,40 \pm 0,18^{**}$	$0,88 \pm 0,12$
CASK-3	$2,31 \pm 0,47$	$1,41 \pm 0,33^{***}$	$0,15 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,17$	$0,95 \pm 0,12^{***}$	$1,04 \pm 0,41$
Nobiletin	$1,19 \pm 0,19$	$1,09 \pm 0,19^{****}$	$0,91 \pm 0,13^{****}$	$0,89 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,15^{***}$	$1,43 \pm 0,55$

Elde edilen bulgular, tabloda "Ortalama değer $\pm$ Standart hata (SH)" olarak verilmiştir. Grup değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

4.7. Histopatoloji ve İmmunohistokimya Analizlerinin Sonuçları

Histolojik olarak tümörler Russo ve Russo, 2000 kriterleri dikkate alınarak sınıflandırılmıştır. Gruplarda tespit edilen malign lezyonların genellikle birden fazla hücre tipinden meydana geldiği gözlenmekle birlikte, karışıklığa yol açmamak için hücre grubunun daha yoğun olduğu tipe göre histolojik sınıflandırılma gerçekleştirilmiştir. Sham gruptaki hayvanlarda, meme bezlerinin normal histolojik görünümde olduğu gözlenmiştir. Kontrol, ekstre, SP FR.A+B, CASK-3 ve nobiletin gruplarındaki bazı hayvanlarda değişen histolojik tip ve sayıda meme bezinde adenokarsinoma ve karsinomaların olduğu belirlenmiştir. Referans grubunda ise, bir hayvanda invaziv adenokarsinom meydana geldiği tespit edilmiştir. İnceleme sonucunda Sham grubu hariç olmak üzere, deney gruplarında malign tümörlerin yüksek oranda meydana geldiği belirlenmiştir. Elde edilen kesitlerde, non invaziv duktal karsinoma *in situ*, invaziv papiller karsinom, invaziv tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, invaziv komedo karsinom ve invaziv kistik adenoid karsinoma saptanmıştır.

SBR derecelendirme sistemine göre gruplardaki malign tümörler kontrol grubunda 2 G-I, 3 G-II, 1 G-III; ekstre grubunda 5 G-I, 1 G II; SP FR.A+B grubunda 4 G-I, 1 G-II; CASK-3 grubunda 4 G-I, 1 G-II; nobiletin grubunda 6 G-I, 1 G-II ve referans grubunda 2 G-I, 1 adet G-II olarak değerlendirilmiştir. Bu durum genel olarak kontrol grubu dışındaki diğer gruplardaki malign tümörlerin iyi diferensiyasyona sahip olduğuna ancak kontrol grubunda oluşan malign tümörlerde diferensiyasyon kaybının meydana geldiği şeklinde yorumlanmıştır (Çizelge 4.19).

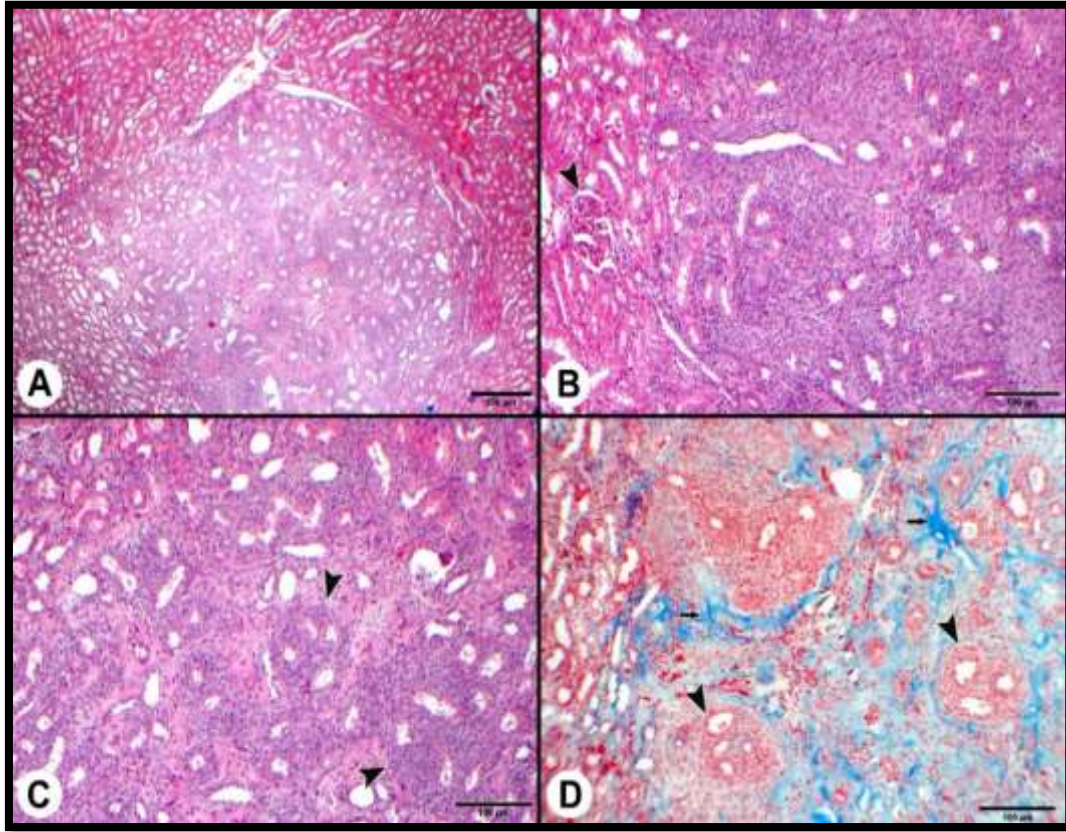
Çizelge 4.19. SBR derecelendirme sistemine göre gruplarda belirlenen grade düzeyleri

Derecelendirme	S	K	T	E	SP	C-3	N
Grade-I	-	2	2	5	4	4	6
Grade-II	-	3	1	1	1	1	1
Grade-III	-	1	-	-	-	-	-

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu

Metastaz yönünden böbrek dokuları incelendiğinde, sham ve kontrol grupları hariç, referans (1 hayvan), ekstre (1 hayvan), SP FR.A+B (1 hayvan), CASK-3 (1 hayvan) ve nobiletin (2

hayvan) gruplarına ait toplam 6 hayvanda böbrek dokusunda metastazların şekillendiği gözlenmiştir (Resim 4.2). Uterus ve ovaryum dokularında ise metastaza ilişkin bir bulguya rastlanmamıştır.



A. Böbreğin kortikomedullar bölgesinde sınırları belirsiz meme adenokarsinom metastaz odağı, **B.** Böbrek korteksinde hiperkromatik çekirdekli tubuler formasyonlar gösteren metastaz (sağ), gomerulus (ok başı) **C.** Tubular yapılar oluşturmuş tümör hücre grupları (ok başları), HE, **D.** Metastazlı tümör hücreleri arasında bağ doku oluşumları (oklar) arasında metastatik tubular formasyonlar (ok başları), MTC

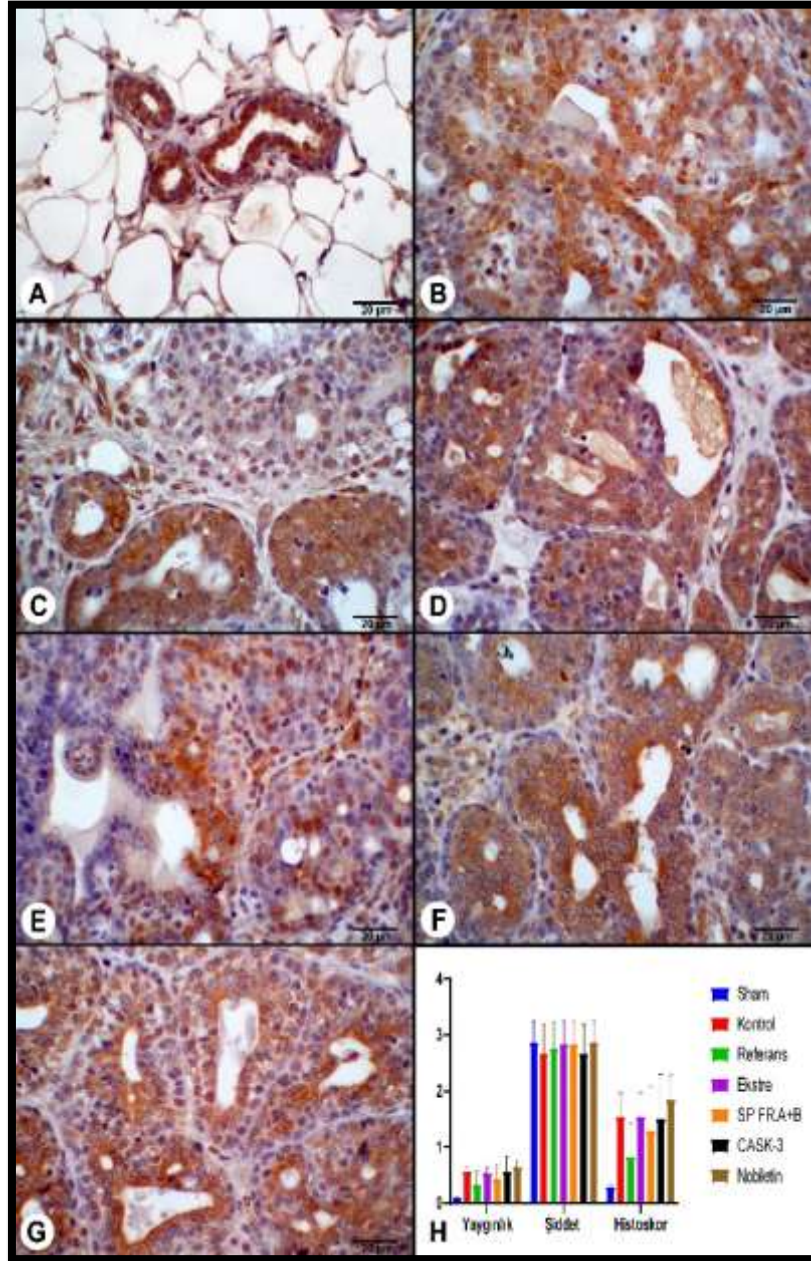
Resim 4.2. Böbrek dokusunda metastaz

İmmünohistokimyasal E-kaderin yaygınlık ve histoskorları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık ($p < 0,01$) saptanırken, şiddet bakımından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). E-kaderin yaygınlığı ve histoskorunun referans ve sham gruplarında diğer gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20). Aralarında farklılık olmamakla birlikte en yüksek histoskor değerinin nobiletin grubunda, daha sonra sırasıyla kontrol, ekstre, CASK-3 ve SP FR.A+B gruplarında olduğu belirlenmiştir (Resim 4.3).

Çizelge 4.20. E-kaderin immun boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	0,10 ± 0,00 ^c	0,57 ± 0,03 ^{ab}	0,33 ± 0,09 ^{bc}	0,53 ± 0,04 ^{ab}	0,43 ± 0,11 ^{ab}	0,57 ± 0,11 ^{ab}	0,64 ± 0,04 ^a
Şiddet	2,86 ± 0,14	2,67 ± 0,21	2,75 ± 0,16	2,83 ± 0,17	2,83 ± 0,17	2,67 ± 0,21	2,86 ± 0,14
Histoskor	0,29 ± 0,01 ^c	1,53 ± 0,18 ^{ab}	0,83 ± 0,21 ^{bc}	1,53 ± 0,18 ^{ab}	1,28 ± 0,33 ^{ab}	1,50 ± 0,33 ^{ab}	1,84 ± 0,17 ^a

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c} : Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p < 0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin H. E-kaderin boyamada yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

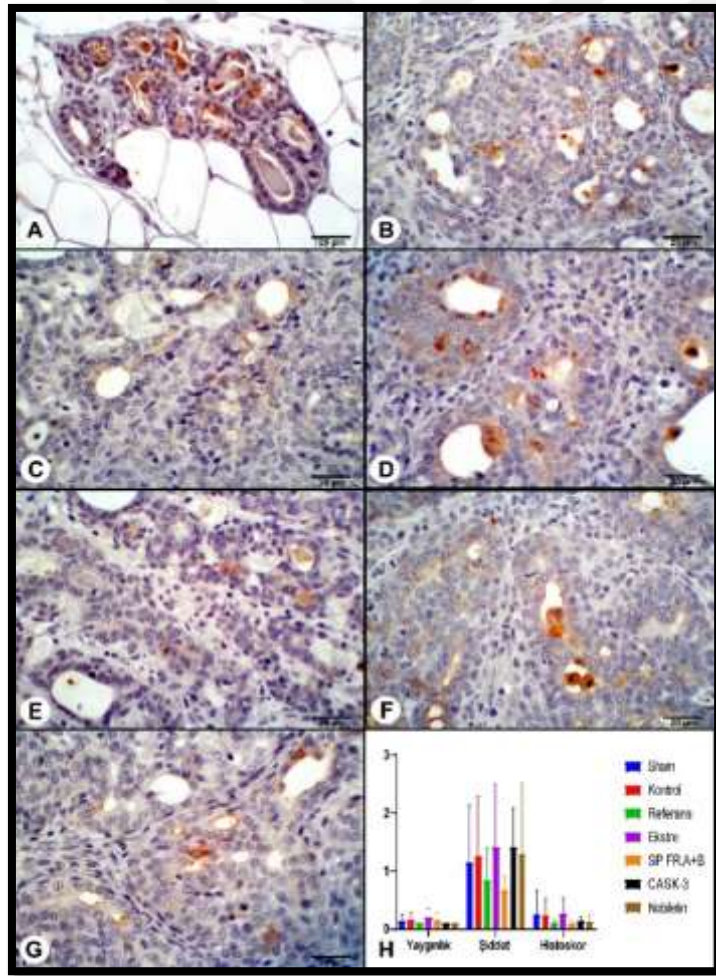
Resim 4.3. E-kaderin immunopozitifliği

İmmünohistokimyasal olarak EGFR boyama yaygınlık, şiddet ve histoskor bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). EGFR pozitifliğinin yaygınlığı en belirgin olarak ekstre grubunda, şiddet olarak ise ekstre ve CASK-3 gruplarında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.21 ve Resim 4.4).

Çizelge 4.21. EGFR immün boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	$0,14 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$
Şiddet	$1,14 \pm 0,37$	$1,25 \pm 0,42$	$1,06 \pm 0,22$	$1,42 \pm 0,44$	$0,67 \pm 0,11$	$1,42 \pm 0,27$	$1,29 \pm 0,46$
Histoskor	$0,24 \pm 0,16$	$0,23 \pm 0,12$	$0,11 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,05$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. EGFR immün boyamada yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

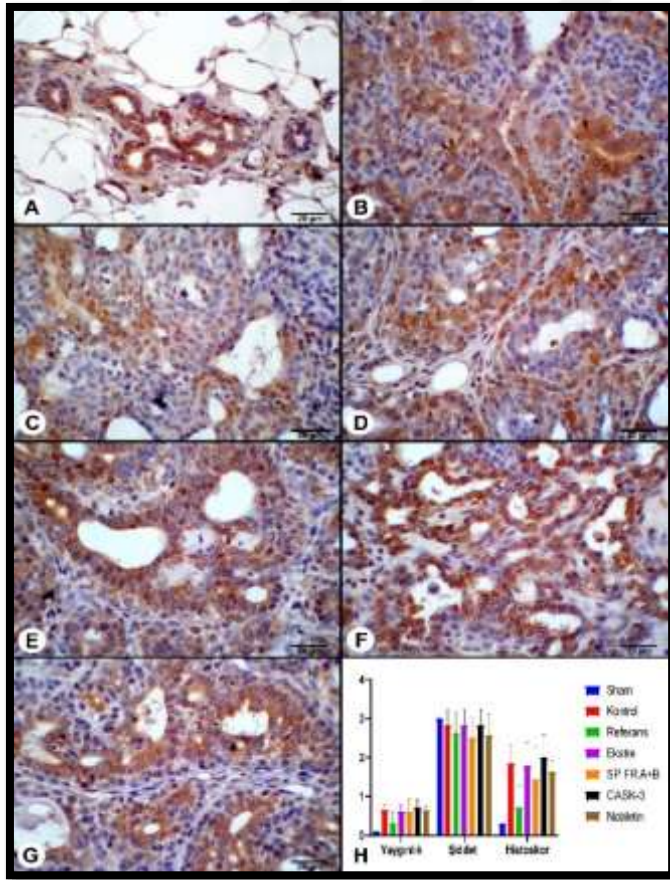
Resim 4.4. EGFR immünopozitifliği

İmmünohistokimyasal ER yaygınlık ve histoskorları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık ($p<0,001$) saptanırken, şiddet bakımından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). ER yaygınlığı ve histoskorunun referans ve sham gruplarında diğer gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.22 ve Resim 4.5). Anılan gruplar dışında, ER boyamanın tümör hücrelerinde yaklaşık %60-70 civarında olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.22. Östrojen immun boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	$0,10 \pm 0,00^c$	$0,65 \pm 0,05^{ab}$	$0,31 \pm 0,10^{bc}$	$0,62 \pm 0,07^{ab}$	$0,60 \pm 0,14^{ab}$	$0,72 \pm 0,09^a$	$0,64 \pm 0,04^{ab}$
Şiddet	$3,00 \pm 0,00$	$2,83 \pm 0,17$	$2,63 \pm 0,18$	$2,83 \pm 0,17$	$2,50 \pm 0,22$	$2,83 \pm 0,17$	$2,57 \pm 0,20$
Histoskor	$0,30 \pm 0,00^c$	$1,85 \pm 0,20^a$	$0,73 \pm 0,19^{bc}$	$1,78 \pm 0,25^a$	$1,43 \pm 0,35^{ab}$	$2,00 \pm 0,24^a$	$1,63 \pm 0,11^{ab}$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. ER pozitifliğinde yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

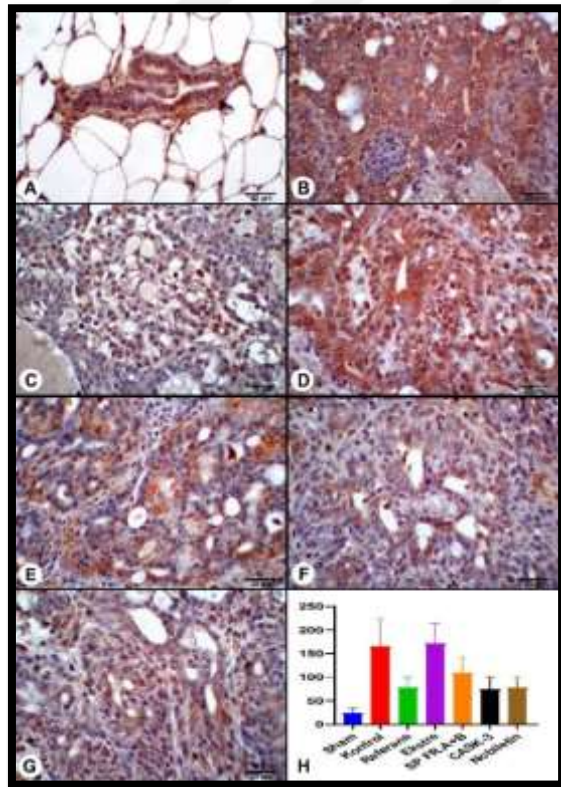
Resim 4.5. ER immunopozitifliği

Tümör hücrelerinde proliferasyonu ortaya koymak için yapılan Ki-67 immun boyamada en az hücre çoğalması gösteren grubun Sham grubu olduğu; en fazla hücre çoğalmasının ise kontrol ve ekstre gruplarında bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.23 ve Resim 4.6). Kontrol ve ekstre grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Bu gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı şekilde hücre proliferasyonunda azalma SP FR.A+B grubunda bulunmuştur. Aynı benzerlikteki azalma SP FR.A+B grup ile referans, CASK-3 ve nobiletin grupları arasında da tespit edilmiştir ($p<0,001$). Referans, CASK-3 ve nobiletin grupları arasında hücre çoğalmasının benzer olduğu izlenmiştir. Proliferasyon indeksi bakımından referans, CASK-3 ve nobiletin grupları ile sham grubu arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

Çizelge 4.23. Ki-67 immun boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Ki-67	$23,69 \pm 1,74^d$	$164,93 \pm 11,03^a$	$77,90 \pm 3,51^c$	$171,70 \pm 7,77^a$	$109,40 \pm 6,06^b$	$74,40 \pm 4,77^c$	$77,60 \pm 3,96^c$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c, d, e}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. Ki 67 boyamada yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

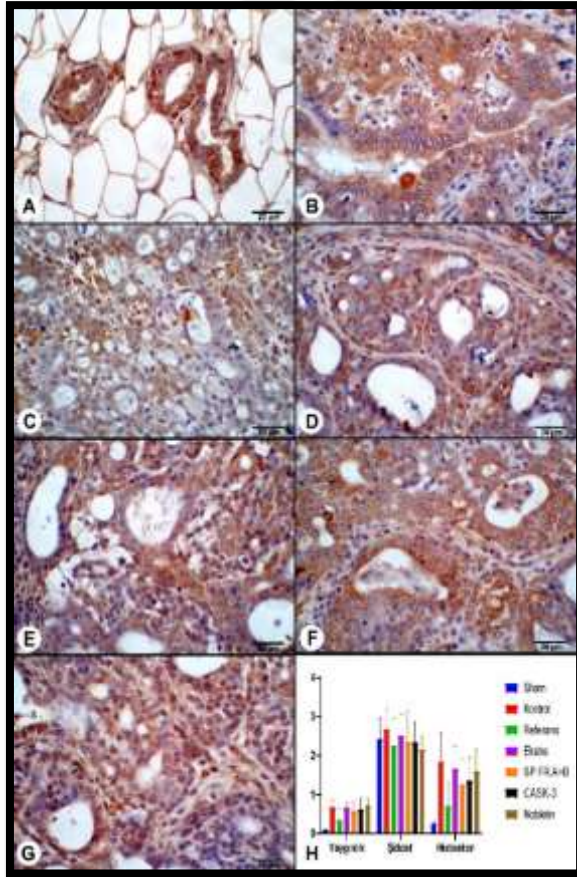
Resim 4.6. Ki 67 immunopozitifliği

İmmünohistokimyasal laminin yaygınlık ve histoskoru bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık ($p<0,001$) saptanırken, şiddet bakımından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Laminin yaygınlığı ve histoskorunun referans ve sham gruplarında diğer gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir. Aralarında farklılık olmamakla birlikte en yüksek histoskor değerinin Kontrol grubunda, daha sonra sırasıyla ekstre, nobiletin, CASK-3 ve SP FR.A+B gruplarında olduğu dikkati çekmiştir (Çizelge 4.24 ve Resim 4.7).

Çizelge 4.24. Laminin immün boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	$0,10 \pm 0,00^c$	$0,67 \pm 0,08^{ab}$	$0,34 \pm 0,11^{bc}$	$0,65 \pm 0,05^{ab}$	$0,57 \pm 0,11^{ab}$	$0,62 \pm 0,12^{ab}$	$0,73 \pm 0,06^a$
Şiddet	$2,43 \pm 0,20$	$2,67 \pm 0,21$	$2,25 \pm 0,25$	$2,50 \pm 0,22$	$2,33 \pm 0,33$	$2,33 \pm 0,21$	$2,14 \pm 0,14$
Histoskor	$0,24 \pm 0,02^c$	$1,83 \pm 0,31^a$	$0,70 \pm 0,22^{bc}$	$1,65 \pm 0,24^{ab}$	$1,25 \pm 0,27^{ab}$	$1,35 \pm 0,24^{ab}$	$1,59 \pm 0,21^{ab}$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c} : Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. Laminin boyamada belirlenen yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

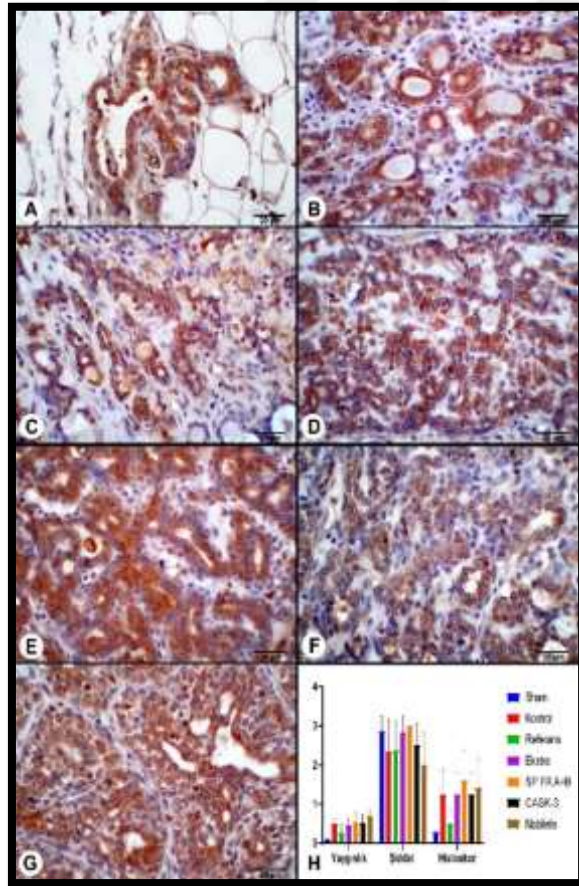
Resim 4.7. Laminin immunopozitifliği

Miyoeitel hücrelerini ortaya koymak için yapılan P-63 immun boyamada yaygınlık ve histoskor bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık ($p<0,001$) saptanırken, şiddet bakımından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). P-63 yaygınlığı ve histoskorunun Referans ve Sham gruplarında diğer gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir. Aralarında farklılık olmamakla birlikte en yüksek histoskor değerinin SP FR.A+B grubunda daha sonra sırasıyla nobiletin, ekstre, CASK-3 ve kontrol gruplarında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.25 ve Resim 4.8).

Çizelge 4.25. P-63 immun boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	$0,10 \pm 0,00^c$	$0,50 \pm 0,04^{ab}$	$0,26 \pm 0,08^{bc}$	$0,45 \pm 0,08^{ab}$	$0,53 \pm 0,11^{ab}$	$0,52 \pm 0,08^{ab}$	$0,69 \pm 0,06^a$
Şiddet	$2,86 \pm 0,14$	$2,33 \pm 0,33$	$2,38 \pm 0,26$	$2,83 \pm 0,17$	$3,00 \pm 0,00$	$2,50 \pm 0,22$	$2,00 \pm 0,31$
Histoskor	$0,29 \pm 0,01^c$	$1,23 \pm 0,26^{abc}$	$0,50 \pm 0,12^{bc}$	$1,25 \pm 0,22^{abc}$	$1,60 \pm 0,33^a$	$1,25 \pm 0,22^{abc}$	$1,41 \pm 0,28^{ab}$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. P-63 immun boyamada yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

Resim 4.8. P-63 immunopozitifliği

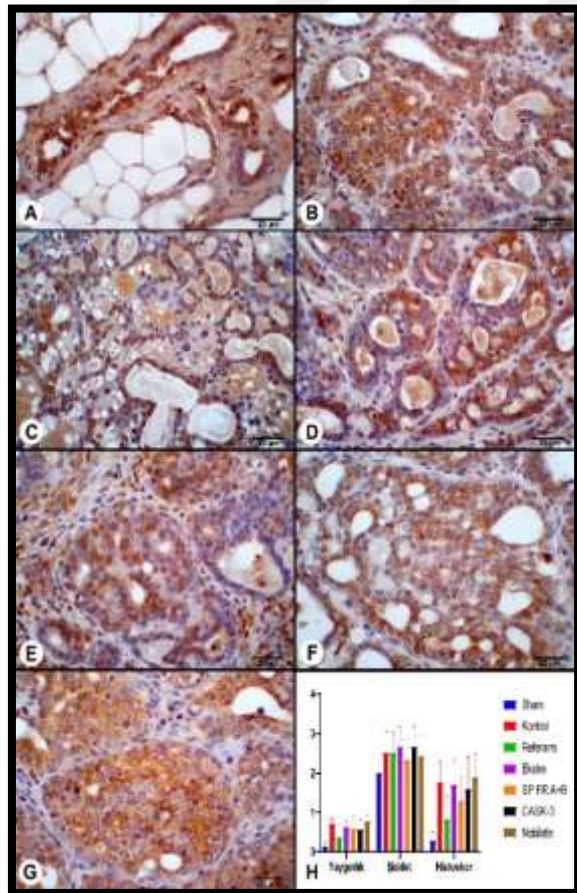
İmmünohistokimyasal pansitokeratin yaygınlık ve histoskorları bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık ($p<0,001$) saptanırken, pansitokeratin boyanma şiddeti bakımından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). En düşük pansitokeratin pozitifliğinin Referans ve Sham gruplarında olduğu belirlenmiştir. En yüksek histoskor nobiletin grubunda ardından kontrol, ekstre, CASK-3, SP FR.A+B ve referans gruplarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.26 ve Resim 4.9).

Çizelge 4.26. Pansitokeratin immün boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	$0,14 \pm 0,04^c$	$0,70 \pm 0,06^{ab}$	$0,36 \pm 0,11^{bc}$	$0,62 \pm 0,07^{ab}$	$0,58 \pm 0,12^{ab}$	$0,57 \pm 0,11^{ab}$	$0,77 \pm 0,06^a$
Şiddet	$2,00 \pm 0,00$	$2,50 \pm 0,22$	$2,50 \pm 0,19$	$2,67 \pm 0,21$	$2,33 \pm 0,21$	$2,67 \pm 0,21$	$2,43 \pm 0,20$
Histoskor	$0,29 \pm 0,09^c$	$1,75 \pm 0,22^{ab}$	$0,81 \pm 0,22^{bc}$	$1,68 \pm 0,26^{ab}$	$1,28 \pm 0,26^{abc}$	$1,58 \pm 0,34^{ab}$	$1,89 \pm 0,23^a$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu

^{a, b, c} : Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. Pansitokeratin yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

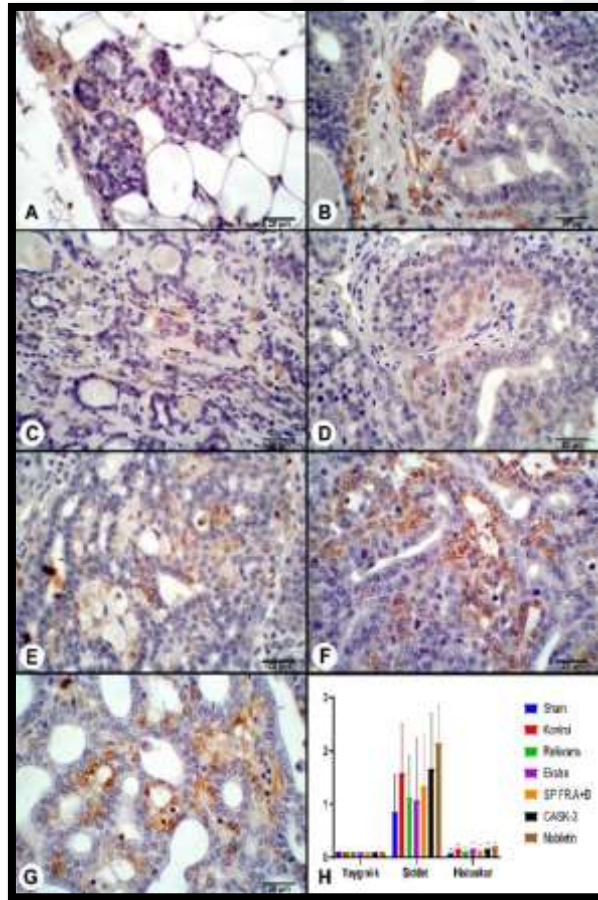
Resim 4.9. Pansitokeratin immünopozitifliği

İmmünohistokimyasal progesteron şiddet ve histoskor bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık ($p<0,05$) saptanırken, yaygınlık bakımından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Progesteron histoskorunun en düşük referans ve sham gruplarında olduğu belirlenmiştir. Aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamakla birlikte, en yüksek histoskor değerinin nobiletin grubunda olduğu, daha sonra sırasıyla ekstre, CASK-3, kontrol ve SP FR.A+B gruplarında olduğu dikkati çekmiştir (Çizelge 4.27 ve Resim 4.10).

Çizelge 4.27. Progesteron immün boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Şiddet	0,86 ± 0,26 ^b	1,58 ± 0,37 ^{ab}	0,87 ± 0,08 ^b	1,67 ± 0,40 ^{ab}	1,33 ± 0,40 ^{ab}	1,67 ± 0,42 ^{ab}	2,14 ± 0,26 ^a
Histoskor	0,09 ± 0,03 ^b	0,16 ± 0,04 ^{ab}	0,08 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,04 ^{ab}	0,13 ± 0,04 ^{ab}	0,17 ± 0,04 ^{ab}	0,21 ± 0,03 ^a

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. Progesteron yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

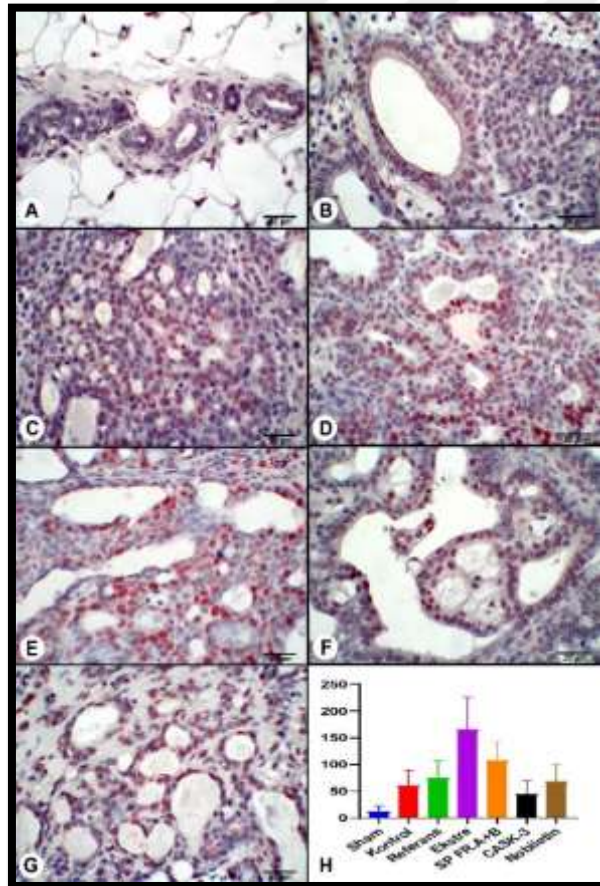
Resim 4.10. Progesteron immünopozitifliği

Tümör hücrelerinde apoptotik indeksi ortaya koymak için yapılan TUNEL boyamada tümör hücrelerinde apoptozisin en az sham grubunda; en fazla ekstre grubunda bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.28 ve Resim 4.11). Apoptozis sıralaması bakımından ekstre grubunu, istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmanın bulunduğu SP FR.A+B grubunun takip ettiği gözlenmiştir. Referans, kontrol ve nobiletin gruplarında ortalama apoptotik indeks değerlerinin benzer olduğu ($p>0,05$), bu değerlerin Ekstre ve SP FR.A+B gruplarının değerlerinden daha düşük, CASK-3 grubu değerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CASK-3 grubu ile Sham grubu arasında apoptozis sayısı bakımından anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.28. Ortalama apoptotik indeks değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Apoptotik İndeks	$12,66 \pm 1,64^e$	$61,00 \pm 5,22^{cd}$	$75,03 \pm 4,99^c$	$166,00 \pm 10,97^a$	$107,57 \pm 6,57^b$	$45,13 \pm 4,73^d$	$68,89 \pm 5,02^{cd}$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu; ^{a, b, c, d, e}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,001$)



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. TUNEL boyamada apoptotik indeks grafiği

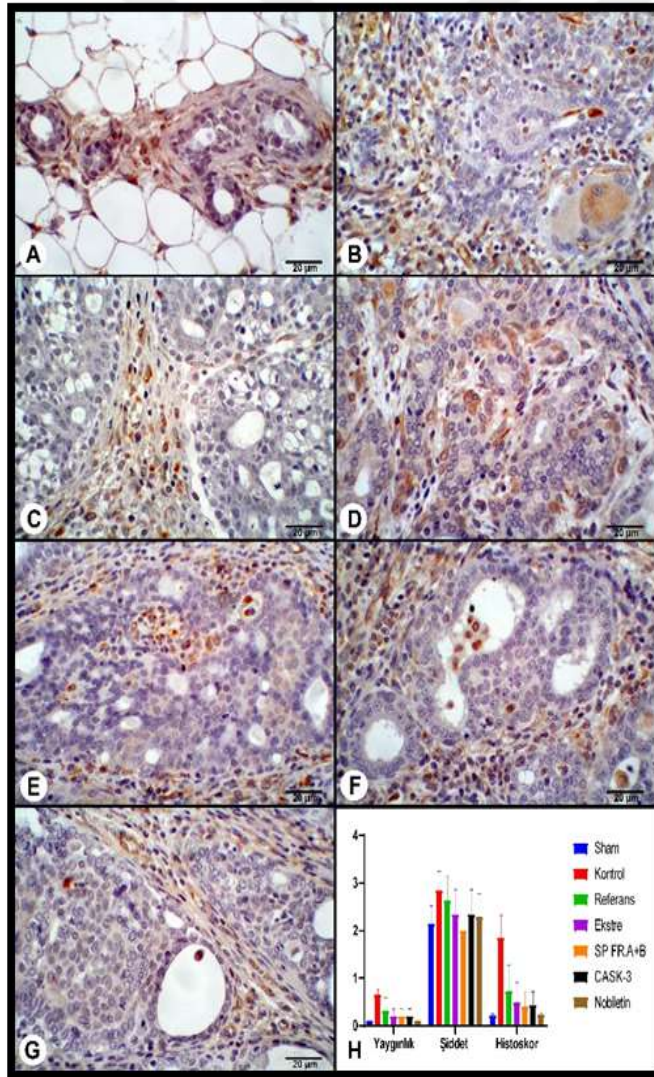
Resim 4.11. TUNEL immunopozitifliği

İmmünohistokimyasal olarak vimentin boyama yaygınlık, şiddet ve histoskor bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Vimentin pozitifliğinin yaygınlığı en belirgin olarak kontrol grubunda, şiddet olarak ise ekstre ve CASK-3 gruplarında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.29 ve Resim 4.12).

Çizelge 4.29. Vimentin immün boyama değerleri

	S	K	T	E	SP	C-3	N
Yaygınlık	$0,10 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,00$
Şiddet	$2,14 \pm 0,14$	$2,00 \pm 0,26$	$1,18 \pm 0,13$	$2,33 \pm 0,21$	$2,00 \pm 0,00$	$2,33 \pm 0,21$	$2,28 \pm 0,18$
Histoskor	$0,21 \pm 0,14$	$0,65 \pm 0,17$	$0,34 \pm 0,10$	$0,48 \pm 0,17$	$0,40 \pm 0,13$	$0,43 \pm 0,12$	$0,23 \pm 0,02$

S: Sham; K: Kontrol Grubu; T: Tamoksifen Grubu; E: Ekstre Grubu; SP: SP FR.A+B Grubu; C-3: CASK-3 Grubu; N: Nobiletin Grubu



A. Sham; B. Kontrol; C. Tamoksifen; D. Ekstre; E. SP FR.A+B; F. CASK-3; G. Nobiletin; H. Vimentin immün boyamada yaygınlık, şiddet ve histoskor grafiği

Resim 4.12. Vimentin immünopozitifliği



5. TARTIŞMA

Citrus meyveleri kumarinler, flavonoidler ve glikozitleri, uçucu yağ bileşikleri, limonoidler, B ve C vitaminleri, karotenoidler, mineraller ve diyet liflerince zengin bir içeriğe sahiptir. İnsan sağlığı için eşsiz bir kaynak niteliği taşımakta; antitümöral, kardiyoprotektif, serbest radikal süpürücü, bakterisidal ve antiviral etkileri nedeniyle nutrasötik, geleneksel bitkisel tıbbi ürün ve bitkisel ilaç olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır (Ezzati ve diğerleri, 2020; Flavia Cristina Fernandes Pimenta, Tavares, ve diğerleri, 2017). Etkiden sorumlu bileşik gruplarından flavonoidlerin ve uçucu bileşiklerin meyvenin kabuk kısmında (meyve ekzokarpı, flavedo) daha fazla miktarda bulunduğu, kumarin türevi bileşiklerin ise sadece bitkinin kabuk ve kök kısımlarında bulunduğu göz önünde bulundurularak (Favela-Hernández ve diğerleri, 2016), çalışmamızda turuncgil meyve kabuğu atıklarının katma değeri yüksek ürünler olarak değerlendirilme potansiyellerinin ortaya konulabilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, *in vitro* ve *in vivo* antitümör etkilere sahip olduğu bildirilen flavonoidler, kumarinler ve limonoidler gibi çeşitli sekonder metabolitleri içeren fakat üzerinde daha önce meme tümörüne karşı ayrıntılı ve karşılaştırmalı antikanser aktivite çalışması bulunmayan *Citrus* türlerinin meyve kabuklarının meme tümörü üzerindeki tedavi edici etkileri *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılmıştır. Farklı molekül iskeletlerine sahip potansiyel sitotoksik etkili bileşikleri bir arada bulundurması nedeniyle *Citrus aurantium* L. (turunç) (CA), *Citrus grandis* (L.) Osbeck (pomelo) (CG), *Citrus medica* L. (ağaç kavunu) (CM) ve *Citrus paradisi* Macfad. (greyfurt) (CP) bitkilerinin meyve kabuklarından hazırlanan ekstraların ve ekstralardan, *in vitro* (MCF-7 hücre hattı) sitotoksik aktivite-yönlendirmeli fraksiyonlama çalışmaları doğrultusunda elde edilen fraksiyonların ve sekonder metabolitlerin *in vivo* N-metil-N-nitrozoüre (NMU)-nedenli meme tümörü modeli üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışma kurgumuzda CA, CG, CM CP meyve kabuklarından MeOH ekstralarının hazırlanması, bu ekstraların sitotoksik aktivitelerinin araştırılması ve en yüksek aktiviteye sahip ekstrenin belirlenmesi, aktif ekstrenin uygun solvanlarla (*n*-hekzan, DCM, EtOAc, BuOH) sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılarak kalan su fazı da olmak üzere beş adet alt ekstreye ayrılması ve kromatografik yöntemler kullanılarak aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama prosedürü dahilinde fraksiyonlama ve izolasyon çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Ancak çalışmalarımız kapsamında, CA, CG, CM ve CP'nin MeOH

ekstrelerinin 100 µg/mL doza kadar 48 saat boyunca MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucunda doza bağlı olarak sitotoksik aktiviteleri değerlendirildiğinde, anlamlı bir aktivitenin olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, ekstraksiyon yöntemi değiştirilerek bitkisel materyallerden doğrudan *n*-hekzan, DCM ve EtOAc ham ekstreleri; bunlarla birlikte, *n*-hekzanlı ekstrelerin kalan bakiyeleri üzerinden sekanslı polarite artışı ile sırasıyla EtOAc ve MeOH ilavesi ile EtOAc ve MeOH alt ekstreleri hazırlanmıştır. Toplam 20 ekstre en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL dozda 48 saat boyunca MCF-7 hücreleri ile muamele edildiğinde, ham ekstrelerin (*n*-hekzan, DCM ve EtOAc ham ekstreleri) ve EtOAc alt ekstrelerinin sitotoksik aktivitelerinin yüksek olduğu ancak MeOH alt ekstrelerinin herhangi bir sitotoksik etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Aktif bulunan ham ve alt ekstrelerin (16 adet ekstre) doz-cevap etkileri 5 dozda çalışılmıştır. *Citrus* türlerinin kabuklarından hazırlanan MeOH'lü ham ekstrelerde sitotoksik etki görülmezken; *n*-hekzan, DCM ve EtOAc ham ekstrelerinde sitotoksik etkinin tespit edilmesi, görece daha nonpolar bileşiklerin (polimetoksili flavonoidler, kumarinler, terpenoidler, limonoidler vb.) polar bileşiklerden (basit flavonoidler ve flavonoid glikozitleri gibi) daha etkili olabileceklerini düşündürmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da, flavonoid ve kumarin aglikonları ve limonoid tipi bileşiklerin petrol eteri, benzen, kloroform, EtOAc ve aseton gibi nonpolar ekstrelerde bulunduğu rapor edilmiştir (G. K. Jayaprakasha, Brodbelt, Bhat ve Patil, 2006; Szewczyk ve Bogucka-Kocka, 2012). Çalışmamızda aktivitenin daha nonpolar ekstrelerde görülmesi, anılan bileşiklerin etkiden sorumlu olabileceklerini düşündürmüştür.

Hazırlanan ham ve alt ekstreler üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda, MCF-7 hücre hattındaki en yüksek sitotoksik etkinin CA EtOAc ham ekstresi tarafından sağlandığı belirlenmiştir. Bu nedenle, anılan ekstrenin sağlıklı hücre hattı MCF-10A üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve seçicilik indeksi 39 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, klinik yansıması açısından ekstrenin kayda değer derecede iyi bir seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda, CA EtOAc ham ekstresi üzerinde fraksiyonlama çalışmalarına başlanmıştır. İleri çalışmalara CA EtOAc ham ekstresi üzerinde devam etmek üzere, daha yüksek miktarda tartılan CA kabuklarından EtOAc ham ekstresi hazırlanmıştır. CA EtOAc ham ekstresinden, SP LH-20 kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak SP FR.A, SP FR.B ve SP FR.C olmak üzere 3 fraksiyon elde edilmiş ve fraksiyonlar üzerinde hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Fraksiyonların MCF-7 hücre hattı ile 48 saat muamele edilmesi sonucu MTT testi ile sitotoksik aktivite değerlendirmesi yapılmıştır. Sitotoksik aktivite bulgularına göre, SP FR.A ve SP FR.B'nin MCF-7 hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, SP FR.C'nin ise

diğer iki fraksiyondan daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En aktif fraksiyonların (SP FR.A ve SP FR.B) etkilerinin ham ekstreden düşük olduğu tespit edilse de, çalışma kurgusuna bağlı kalınarak, izolasyon çalışmalarına, aktivite-yönlendirmeli olarak, fraksiyonlar arasında görece en yüksek aktivite gösteren fraksiyon üzerinde devam edilmiştir. Fraksiyonlama neticesinde aktivitenin azalması, ekstredeki bileşiklerin olası sinerjik etkilerine bağlanabileceği gibi, her ne kadar elde edilen fraksiyonlarda çözünme problemi yaşanmamış olsa da, fenolik bileşiklerin alt fraksiyonlarda zenginleşmesine bağlı olarak oluşabilecek agregatların aktivite kaybına neden olabileceğini düşündürmüştür.

SP FR.A ve SP FR.B için sitotoksik aktivite sonuçları benzerlik gösterdiğinden, bu iki fraksiyon birleştirilmiş ve silika jel kullanılarak 4 alt fraksiyona ayrılmıştır (CASK 1-4). Alt fraksiyonların MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etki değerlendirme çalışmalarında, en yüksek sitotoksik aktivite gösteren CASK-3 alt fraksiyonundan kromatografik yöntemlerle izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. CASK-3'ün sitotoksik etkisi, bir önceki basamakta elde edilen SP FR.A ve SP FR.B fraksiyonlarından daha yüksek bulunmuştur. CASK-3'ten 1 adet kumarin; izomeranzin (CAS 5), 3 adet metoksilli flavonoit; 3-metoksi nobiletin (CAS 10), nobiletin (CAS 11) ve tangeretin (CAS 12) izole edilerek yapıları 1D, 2D NMR yöntemleriyle karakterize edilmiş ve elde edilen bulgular literatür bilgisiyle doğrulanmıştır (Imai ve diğerleri, 1989; Ito, Fujiwara, Koizumi ve Furukawa, 1998; Uckoo ve diğerleri, 2011). Daha önce yapılan çalışmalarda, *C. aurantium*'un meyvelerinden art arda ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen EtOAc ekstresinin HPLC analizinde, nobiletin, tangeretin, naringenin, naringin, hesperetin, hesperidin ve neohesperidin bileşikleri tespit edilmiştir (K. Liu ve diğerleri, 2016). Yine *C. aurantium* meyve kabuklarının sulu alkollü ekstrelerinde naringin, hesperidin, neohesperidin, diosmin, morin, kafeik asit, klorojenik asit, kumarik asit, elajik asit bileşikleri (Ana ve diğerleri, 2018); meyvelerinin sulu alkollü ekstrelerinde neohesperidin, sinefrin ve naringin bileşikleri belirlenmiştir (Yan ve diğerleri, 2021). *C. aurantium*'dan soğuk sıkma yöntemi ile elde edilen uçucu yağın uçucu olmayan fraksiyonunda kumarin ve polimetoksiflavon türevi bileşiklerin (meranzin hidrat, meranzin, izomeranzin, bergapten, epoksibergamottin hidrat, nobiletin, 3-metoksi nobiletin, tangeretin ve ostol) bulunduğu rapor edilmiştir (Anwar, Ahmed, Speciale, Cimino ve Saija, 2016). Meyvenin kabuğunda genellikle aglikonların varlığı göze çarpmaktadır (Suntar ve diğerleri, 2018). Çalışmamızda, *C. aurantium* meyve kabuklarının EtOAc ekstresinden izole ettiğimiz bileşiklerin (izomeranzin, 3-metoksi nobiletin, nobiletin, tangeretin) daha önce *C. aurantium* meyvelerinin çeşitli solvan

ekstrelerinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, çalışma sonuçlarımız, yukarıda belirtilen çalışmalarla uyum göstermiştir. Bununla birlikte, çalışmamızda etkisini değerlendirdiğimiz diğer *Citrus* türlerinin de (*Citrus grandis*, *C. medica* ve *C. paradisi*) *in vitro* deneylerde sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde bu türlerin de nobiletin içerdiği ile ilgili kayıtlar bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, nobiletin bileşiğini içeren *Citrus* türlerinin *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. medica*, *C. reticulate*, *C. sinensis*, *C. miaraya*, *C. depressa*, *C. mandalina*, *C. unshiu*, *C. arnica indica*, *C. reshni*, *C. tachibana*, *C. leiocarpa*, *C. tardiva*, *C. succosa*, *C. kinokuni*, *C. erythrosa*, *C. sunki* ve *C. deliciosa* olduğu rapor edilmiştir (Anmol ve diğerleri, 2021; Dadwal, Joshi ve Gupta, 2022; Itoh, Iwata ve Toda, 2016; Kohno ve diğerleri, 2001; Lee, Charles, Kung, Ho ve Huang, 2010; Murakami ve diğerleri, 2000; A. P. Singh, Kandpal, Sharma ve Chitme, 2021; Uckoo, Jayaprakasha, Vikram ve Patil, 2015; Uckoo ve diğerleri, 2011).

Umut vaat edici antikanser bileşikler için IC_{50} değerinin $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ olması dikkate alındığından, izole bileşiklerde en yüksek konsantrasyon $20 \mu\text{g/mL}$ olarak çalışılmıştır (Suffness, 1990). İzomeranzin, 3-metoksi nobiletin ve tangeretin bileşiklerinin uygulanan dozlarda MCF-7 hücre hattına karşı etkili bulunmadığı; tamoksifenle kıyaslandığında nobiletinin orta derecede sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kumarin yapısındaki bileşik olan izomeranzin ile flavonoit yapısındaki 3-metoksi nobiletin ve tangeretin bileşiklerinin MCF-7 hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri $20 \mu\text{g/mL}$ değerinin üzerinde kalmıştır. Dolayısıyla, metoksilli flavonoit bileşikleri arasında 3. pozisyonunda metoksi grubu taşımayan ancak 3' pozisyonunda metoksi grubu taşıyan nobiletin bileşiğinin aktif olduğu ortaya konulmuştur. İzole edilen bileşiklerin MCF-10A sağlıklı hücreleri üzerinde yapılan sitotoksik aktivite çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre, nobiletinin SI değerinin 1'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda, *in vivo* deneylerde etki değerlendirme çalışmaları için nobiletin bileşiği öne çıkmıştır. Çalışmamızda, *in vitro* aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmaları doğrultusunda, *C. aurantium*'un aktivitesinden nobiletin bileşiğinin büyük ölçüde sorumlu olduğu belirlenmiş olmakla birlikte, ekstrenin fraksiyonladıkça azalma gösteren aktivite profili, ekstredeki diğer sekonder metabolitlerin de aktiviteden kısmen sorumlu olabileceğini düşündürmüştür.

Yapılan bir *in vitro* çalışmada, *C. aurantium* flavonoitlerinin, hücre döngüsünün G2/M fazında durdurulmasını ve apoptozisi indüklediği, cdc2, cdc25c ve siklin B1 ekspresyonunu azalttığı ve p21WAF1/CIP1 ekspresyonunu arttırarak antitümör etki gösterdiği bildirilmiştir

(Nagappan ve diğerleri, 2014). *C. aurantium* bileşikleri üzerinde yapılan sitotoksik aktivite çalışmaları, nobiletin ve tangeretin bileşikleri ve bu bileşiklerin türevleri üzerinde yoğunlaşmış olup, çeşitli kanser hücre hatlarına karşı, hücre canlılığını azaltıcı etki ve özellikle meme, prostat, kolon, kolorektal kanserlerde antikanser aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Anwar ve diğerleri, 2016; C. Chen, Ono, Takeshima ve Nakano, 2014; Jianchu Chen ve diğerleri, 2015; Kisacam, 2023; Y.-C. Ko ve diğerleri, 2020; N. Li, Zhang, Jiang, Sun ve Yu, 2019; Mdkhana, Zaher, Abdin ve Omar, 2021; Meiyanto, Hermawan, Junedi, Fitriyanti ve Susidarti, 2011; J. Wang ve diğerleri, 2014; J. G. Wang, Jian, Li ve Zhang, 2021). Tangeretin ve nobiletinin JCS lösemi hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Mak ve diğerleri, 1996). Nobiletinin MCF-7 hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği (J. Liu ve diğerleri, 2018; Meiyanto ve diğerleri, 2011; J. Wang ve diğerleri, 2021) bununla birlikte, tangeretin MCF-7 hücre hattına karşı apoptotik etkisinin bulunmaması nedeniyle bu bileşiğin türevlerinin hazırlanması ile sitotoksik etkinin sağlanmasına yönelik çalışmaların yapıldığı görülmektedir (J. Wang ve diğerleri, 2014). Wu ve diğer araştırmacılar tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, nobiletinin T47D ve MCF-7 üzerinde invazyon ve migrasyonu önlediği, meme kanseri gelişimini inhibe ettiği, karaciğere metastazını önlediği bildirilmiştir (Y. Wu ve diğerleri, 2023). Bu bulgular, çalışmamızda en yüksek *in vitro* sitotoksik aktivite gösteren nobiletin bileşiği için elde edilen *in silico* verileri de desteklemektedir.

Literatürde izomeranzine ait az sayıda çalışma bulunmakta ve bu çalışmalar bileşiğin anti-enflamatuvar etkileri üzerinde yoğunlaşmaktadır (Kuo ve diğerleri, 2017; Ge Xu ve diğerleri, 2016). Çalışmamızın *in silico* aşamasında izomeranzinin “mutajenik” olduğu belirlenmiş olup, literatürde izomeranzinin mutajenik aktivitesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Nobiletin ve tangeretin bileşikleri ise *in silico* çalışmamızda “mutajenik değil” olarak tahmin edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Citrus* kabuklarından izole edilen flavonoit karışımının (nobiletin (%32,5), tangeretin (%14) ve 8 farklı flavonoit) mutajenite değerlendirmesi için Ames ve L5178Y tk+/- fare lenfoma hücrelerinde çalışılmış, metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda mutajenik aktivite göstermemiştir (Delaney ve diğerleri, 2002). Bununla birlikte, hem tangeretin hem de nobiletinin antimutajenik etkilerinin de deneysel olarak gösterilmesi (Calomme, Pieters, Vlietinck ve Berghe, 1996), bu metabolitlerin kanserde kemopreventif amaçlı kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Kimyasal ajan kullanılarak indüklenen *in vivo* kanser çalışmaları, kanser yapıcı kimyasalların hayvanlara uygulanmasından sonra tümörün oluşumunun beklenmesi ve sonraki aşamada tedavi süreçlerinin başlaması şeklinde ilerlemektedir. Bu nedenle, söz konusu süreç uzun süren ve deney hayvanlarının refahının sağlanması için özel çaba gerektiren koşulları içermektedir. Bu nedenle, 3R ilkesi gereği, çalışmamız, tüm test numunelerinin antitümöral etkilerinin *in vitro* aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ve izolasyon tekniği kullanılarak etkili bulunanların belirlenmesi (etkisiz olanların elenmesi) ve etki potansiyeli yüksek olanların etkilerinin *in vivo* deney modeli kullanılarak değerlendirilmesi şeklinde planlanmıştır. Bu doğrultuda, *in vitro* çalışmalarda en yüksek sitotoksik aktivite gösteren numuneler, (ekstre/fraksiyon/alt fraksiyon/bileşik) biyolojik etki tayinleri amacıyla *in vivo* çalışmalar için seçilmiştir.

In vivo deneylerde araştırılması planlanan ekstre dozlarının 500 mg/kg olacak şekilde başlanması ve 8 hafta boyunca sürdürülmesi literatür bilgileri ışığında planlanmıştır (Jose ve diğerleri, 2013; A. Kim ve diğerleri, 2016; Malleshappa ve diğerleri, 2018; Muhtadi ve diğerleri, 2015). Ekstreden hazırlanan fraksiyon, alt fraksiyon ve bileşik hayvanlara doz-verim hesabı yapılarak uygulanmıştır. Nobiletin bileşiğinin ekstredeki yüzde miktarının hesaplanması amacıyla HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada, izomeranzin, 3-metoksi nobiletin, nobiletin ve tangeretin bileşiklerinin ekstredeki miktarlarının sırasıyla %1,77, %0,67, %2,53, %0,92 olduğu belirlenmiştir. Nobiletinin ekstredeki verimi, ekstrenin etkili dozu (500 mg/kg) ile oranlandığında, hayvanlara uygulanacak doz 12,65 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, nobiletinin antitümör etkisinin değerlendirildiği önceki çalışmalar detaylı şekilde araştırılmıştır.

Nobiletinin deney hayvanlarındaki antikanser aktivite çalışmalarındaki etkili olabilecek doz aralığının belirlenmesi amacıyla literatür taraması yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, nobiletinin %0,01 ve %0,05 oranlarında sıçanların yemlerine karıştırılarak hayvanların oral beslenme ile nobiletin almalarının sağlandığı rapor edilmiştir (Kohno ve diğerleri, 2001; Suzuki ve diğerleri, 2004; Tang ve diğerleri, 2011). Bir sıçanın ortalama ağırlığının 300 g ve ortalama ağırlıkta bir sıçanın günlük 20 g yem tükettiği göz önünde bulundurulduğunda (Saruhan ve Dereli, 2016), nobiletinin antikanser aktivitesinin araştırıldığı çalışmalarda, sıçanlara uygulanan doz aralığının 6,67-33,33 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, nobiletinin *in vivo* antikanser aktivitesinin daha çok fareler üzerinde araştırıldığı belirlenmiş ve bu çalışmalar incelendiğinde, kullanılan dozların genel olarak 10 mg/kg ve 80 mg/kg

aralığında olduğu görülmüştür (Jianchu Chen ve diğerleri, 2015; S.-L. Feng ve diğerleri, 2020; E. Kim ve diğerleri, 2022; Minagawa ve diğerleri, 2001; Miyamoto, Yasui, Tanaka, Ohigashi ve Murakami, 2008; Y. Sun ve diğerleri, 2019; Uesato ve diğerleri, 2014; Wei ve diğerleri, 2019; X. Wu ve diğerleri, 2017). Bu dozlar (fare dozu); sıçan dozuna teorik olarak uyarlanırken yüzey alanına göre çevirme yapıldığından, sıçandaki etkili doz aralığının 5 mg/kg ve 40 mg/kg olacağı belirlenmiştir (sıçan dozu kat sayısı $\frac{1}{2}$ 'dir) (Janhavi, Divyashree, Sanjailal ve Muthukumar, 2022; Nair ve Jacob, 2016). Farelerde yapılmış olan *in vivo* çalışmalarda kullanılan etkili dozun, sıçan dozuna teorik olarak uyarlanarak hesaplamasıyla elde edilen bu doz aralığının (5 mg/kg ve 40 mg/kg), sıçanlarda yapılmış olan ve yukarıda bahsi geçen çalışmalardaki dozlara (6,667 mg/kg ve 33,333 mg/kg) uygulamada da benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bahsi geçen doz aralıklarında nobiletinin etkili olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, daha önce yapılan bu çalışmalar, bileşiğin deney hayvanlarına ekstredeki verimine oranlanarak, 12,65 mg/kg dozda, uygulanması konusunda bir karşıtlık oluşturmamış, aksine çalışma planımıza bağlı kalınarak çalışmalarımızın devam ettirilmesini desteklemiştir.

In vivo çalışmalarda, hayvan ağırlıkları ve tümör hacimleri haftalık ölçümlerle hesaplanmış, kontrol grubu hayvanlarındaki vücut ağırlıklarının düşük seyrettiği tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ağırlık artışlarının yüksek olmaması, ancak tedavi gruplarında hayvan ağırlıklarının daha yüksek olması ve bu değerlerin referans grubuna yaklaşık değerler göstermesi istenen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Tümör hacim sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu hayvanlarının ortalama tümör hacimlerinin diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubundaki hayvanlara herhangi bir tedavi uygulanmadığından, tümör hacminin 8. haftanın sonunda yüksek bulunması beklenen bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Tedavi gruplarında haftalık tümör hacmi ölçümleri değerlendirildiğinde, referans grubundaki tümör hacimlerinin daha kontrollü seyrettiği; diğer gruplarda ise dalgalanmaların daha fazla olduğu görülmüştür. Tedavi grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında, her haftanın ölçümleri için farklı oranlarda istatistiksel anlamlılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Sakrifikasyondan önce yapılan ölçümlerde (8. haftanın sonu) en düşük tümör hacimleri sırasıyla ekstre, nobiletin ve referans grupları için tespit edilmiş, bu değerlerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu belirlenmiştir. Deney sonunda en iyi iyileşmeyi gösteren deney gruplarından ekstre ve nobiletin grupları için tüm haftalar bazında istatistiksel karşılaştırma yapılmış ancak iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. İyileşmenin en iyi olduğu grubun nobiletin ile

tedavi edilen grup olduğu ortaya konulmuştur. *In vitro* sitotoksik etki sonuçlarına göre en potent grup ekstre grubu iken, *in vivo* çalışma sonucunda ekstreten izole edilen nobiletinin etkisinin tümör hacminin küçülmesinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Nobiletinin tümör hacmi üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği daha önceki çalışmalarda, kontrol grubuna kıyasla nobiletin uygulanan farelerde ovaryum tümörü (Jianchu Chen ve diğerleri, 2015), renal karsinom (Wei ve diğerleri, 2019), akciğer tümörü (Da, Liu, Zhan, Liu ve Wang, 2016; S.-L. Feng ve diğerleri, 2020; Y. Sun ve diğerleri, 2019) ve üçlü negatif meme tümörü (E. Kim ve diğerleri, 2022) boyutlarının kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda belirlenen nobiletin grubundaki hayvanların tümör hacmindeki azalma, yapılmış önceki çalışmalar ile paralellik göstermiş olup, nobiletinin tümör tipinden bağımsız olarak antitümör etkinliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda, bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında merkezi bir rol oynayan ve hücre aracılı bağışıklıktaki ana lenfositler olan $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre (Rad, Ajdary, Omranipour, Alimohammadian ve Hassan, 2015) düzeylerinin belirlenerek, test numunelerinin bu hücreler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. $CD4^+$ bağışıklık hücreleri enflamatuvar sitokinlerden olan IFN-gamma'nın da kaynağı kabul edilmektedir (Jorgovanovic, Song, Wang ve Zhang, 2020). Kanda yapılan IFN-gamma, $CD4^+$ ve $CD8^+$ düzeyleri ölçümlerinde, tedavi gruplarının kontrol grubuna kıyasla farklı oranlarda değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda, serum $CD4^+$ seviyeleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre tedavi gruplarında düzeyin daha düşük olduğu, en düşük seviyenin sırasıyla SP FR.A+B ve nobiletin grupları için belirlendiği görülmüştür. Bununla birlikte, referans, CASK-3 ve nobiletin gruplarında serum $CD8^+$ düzeyinde azalma kaydedilmiş, ancak gruplar arası anlamlılık saptanmamıştır. Kan IFN-gamma seviyelerinde de, kontrol grubuna kıyasla sham ve referans ile nobiletin grubunda anlamlı derecede düşüş gözlenmiştir. Nobiletin uygulanan grupta bu üç parametre bakımından düşüş tespit edilmiştir.

$CD4^+$ ve $CD8^+$ serum düzeyleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, tümörün sistemik bağışıklığı anlamlı olarak etkilemediği ancak tümör dokularındaki lokal bağışıklık sistemini etkilediği rapor edilmiştir (Rad ve diğerleri, 2015). You vd. (2021) tarafından yapılan bir başka çalışmada da, Pearson korelasyon katsayısı analizinde, serum $CD4^+$ seviyelerinin, bu hücrelerin tümör mikroçevresine infiltrasyonu ile korele olduğu ancak serum $CD8^+$ düzeyinin tümör mikroçevresi infiltrasyonu ile aynı eğilimi göstermediği ortaya

konulmuştur (You ve diğerleri, 2021). Bu bulgular ışığında, çalışmamızda da, serum CD8⁺ seviyelerinde meydana gelen ancak anlamlı olmayan miktarsal değişikliklerin, söz konusu duruma bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Yarim ve diğerleri (2022) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, nobiletinin otoimmün ensefalomyelit fare modelinde enflamatuvar reaksiyonlarla ilişkili sitokinlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Beyin ve omurilik dokusundaki iltihaplanma sürecinde rol oynayan CD4⁺, CD8⁺ ve IFN-gamma düzeylerinin nobiletin uygulaması ile azaldığı ve bu bileşiğin nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabileceği rapor edilmiştir (Yarim ve diğerleri, 2022). Li ve diğerleri tarafından yapılan bir başka çalışmada, farelerde konkanavalin A-nedenli akut akciğer hasarı modelinde nobiletinin 10 mg/kg dozda uygulanması ile enflamatuvar sitokinlerden IFN-gamma salımını baskılayarak anti-enflamatuvar etki gösterdiği ortaya konulmuştur (M. Li ve diğerleri, 2020). Ürolojik kanserlerde ve akciğer kanserinde de nobiletin uygulamasının IFN-gamma düzeylerinde düşüş yaptığı rapor edilmiştir (Ashrafizadeh, Ahmadi, Mohammadinejad, Kaviyani ve Tavakol, 2020; Pantsulaia, Iobadze, Pantsulaia ve Chikovani, 2014). Çalışmamızda, nobiletinin IFN-gamma düzeyinde azalma göstermesi, bileşiğin olası anti-enflamatuvar etkisini açıklamaktadır. Yang ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, nobiletinin TPA-nedenli IFN-gamma ve CD4⁺ artışı ve artan Ki-67 ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. İmmunohistokimyasal çalışmalarda referans, CASK-3 ve nobiletin gruplarında gözlenen Ki-67 ekspresyonunun inhibisyonu, biyokimyasal çalışmalardaki aynı gruplarda gözlenen serum IFN-gamma ve CD4⁺ düzeyindeki azalma ile paralel olup, çalışmamız daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermiştir (G. Yang ve diğerleri, 2018).

Meme kanserli dokularda, tümöre özgü T hücreleri, pro-enflamatuvar moleküller GM-CSF, IL-12 ve IFN-gamma'nın yanı sıra CXCL-9, CXCL-10 ve CXCL-11'in transkripsiyonel seviyelerinde önemli ölçüde artış gözlemlendiği rapor edilmiştir (Y. Li ve diğerleri, 2020; S.-C. Yang ve diğerleri, 2004). CXCL-9, CXCL-10 ve CXCL-11'in salımının ağırlıklı olarak IFN-gamma tarafından yönlendirildiği bilindiğinden (Tokunaga ve diğerleri, 2018), anılan kemokin seviyelerinin, IFN-gamma'nın azalması ile uyum göstermesi, sonuçlarımızın tutarlı olduğunu ortaya koymuştur. Anılan kemokinlerin düzeylerinin azalması tedavide istenen bir durumdur. Tedavi gruplarında, her üç kemokin düzeyinde de azalma saptanmış; CXCL-9 ve CXCL-10 için bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Daha önce

yapılan çalışmalarda, nobiletinin CXCL-10 düzeyini düşürdüğü bildirildiğinden (Hosokawa, Hosokawa ve Ozaki, 2021; L. Hu ve diğerleri, 2023) bulgularımız daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Citrus türlerinin ekstrelerinin GM-CSF üzerindeki etkilerine yönelik çalışma bulunmamakla birlikte Gu ve diğer araştırmacılar tarafından nobiletinin etkisi araştırılmış ve bileşiğin dekstran sodyum sülfat-nedenli kolit oluşturulan farelerde GM-CSF'yi baskılayarak pro-enflamatuvar sitokinlerin (INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α) seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir (Gu ve diğerleri, 2017). Başka bir çalışmada, nobiletin immün sistemi baskılanmış ratlarda CXCL-10, TNF- α , GM-CSF ve IL-6 düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır (L. Hu ve diğerleri, 2023). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, bahsi geçen kaynaklarla uyum göstermektedir.

Bax ve Bcl2 proteinleri tümör regülatör proteinleri olup, limon kabuklarından hazırlanan ekstreler ve nobiletinin etki mekanizmasının araştırılmasına yönelik yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda, ekstrelerin ve nobiletinin Bax ekspresyonunu arttırdığı ve Bcl2 ekspresyonunu azalttığı ortaya konulmuştur (Gao, Xu, Zhang ve Zhao, 2021; J. Liu ve diğerleri, 2018; Ma ve diğerleri, 2014; J. G. Wang ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte literatürde, *Citrus unshiu* kabuk ekstresinin ve nobiletinin HT22 hipkampal nöronal hücreleri üzerinde hidrojen peroksit-nedenli oksidatif stres durumunda Bcl2 ekspresyonunu arttırarak ve Bax ekspresyonunu azaltarak antiapoptotik etki gösterdiğinin rapor edildiği çalışmaların da bulunduğu görülmüştür (Cho, Jung, Lee, Cho ve Choi, 2015; Ijaz, Tahir, Samad ve Anwar, 2021). Benzer şekilde, sıçanlarda oluşturulan serebral iskemi deney modelinde, nobiletinin 10 mg/kg ve 25 mg/kg dozlarda hayvanlara uygulanmasının Bcl2 gen seviyelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (L. Zhang ve diğerleri, 2013). Arsenik-nedenli karaciğer hasarı deney modelinde, albino sıçanlara 25 ve 50 mg/kg dozunda uygulanan nobiletinin enflamasyon, apoptozis ve histolojik hasarı sağlıklı grup değerlerine yaklaşacak şekilde anlamlı derecede geri çevirdiği; Bax ekspresyonunu azaltıp, Bcl2 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Ijaz ve diğerleri, 2023). Yang ve diğerleri tarafından yapılan başka bir çalışmada, farelerde oluşturulan deneysel epilepsi modelinde, nobiletinin (25 ve 50 mg/kg dozlarda) Bax ekspresyonunu azaltıp, Bcl2 ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (G. Yang ve diğerleri, 2018). Diğer taraftan, tüm bunlardan farklı olarak, nobiletinin MCF-7 ve SK-BR-3 hücrelerinde Bax seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadan, farklı yollardan (Bcl-xl, AKT, mTOR) apoptotik hücre ölümünü indüklediği de

bildirilmiştir (C. Chen ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda, kontrol grubuna göre, test numunelerinin Bax seviyesini düşürdüğü, Bcl2 seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. Yapılan literatür tarama çalışmaları ve Bax ve Bcl2 ekspresyonları ile ilgili elde ettiğimiz bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deney gruplarının, kullanılan deney modeli, tedavi dozları, uygulama yolu ve süresi, kanser hücresi tipi vb. değişkenlere bağlı olarak Bax ve Bcl2 gen ekspresyonu üzerinde farklı etkiler gösterebileceği sonucuna varılmıştır. Araştırmamızda, daha önce yapılmış olan bu çalışmalara benzer olarak, ekstre, fraksiyon, alt fraksiyon ve bileşik ile tedavi edilen hayvanların meme dokularında Bax gen ekspresyonunda anlamlı derecede düşüş; ve bileşik grubunda Bcl2 ekspresyonunun anlamlı derecede artış kaydedilmiştir.

Çalışmamızda, NMU enjeksiyonu ile östrojen pozitif meme tümörü modeli oluşturulan sıçanlarda, ekstre, fraksiyon ve nobiletinin östrojen- β ekspresyonunu anlamlı derecede inhibe ettiği ve nobiletinin baskılayıcı etkisinin, referans olarak kullanılan tamoksifenden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Östrojen- α ve progesteron ekspresyonlarında da azalma kaydedildiği; tedavi gruplarından elde edilen sonuçların sham grubuna yakın olduğu; ancak kaydedilen azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, tedavi gruplarının östrojen ve progesteron modülasyonu yoluyla anti-tümör etki gösterebileceği ortaya konulmuştur. Daha önce yapılmış olan *in vivo* östrojenik ve anti-östrojenik etki çalışmalarında, *Citrus* flavonoidlerinden kersetin, naringin ve naringenin anti-östrojenik aktivite gösterdiği ve meme tümör hacimlerini azalttığı bildirilmiş ve *Citrus* flavonoidlerinin östrojen modülasyonu ve aromataz inhibisyonu yaparak menopoz öncesi ve sonrası meme kanseri hastalarında kullanımı önerilmiştir (El-Kersh ve diğerleri, 2021). Flavonoidler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, kastisin, krisin, epimedinin (A-C), genkvanin, ikarin, ikarizit II, nobiletin, kersetin, rutin ve tangeretin östrojenik etki göstermediği tespit edilmiştir (Kiyama, 2023). Nobiletin bileşiğinin, farklı hücre hatları üzerindeki *in vitro* etkilerinin mekanistik olarak değerlendirildiği bir çalışmada, östrojen pozitif hücre hattında Bax ve Bcl2 ekspresyonları açısından anlamlı bir fark oluşturmaması nedeniyle, *in vitro* östrojen negatif meme kanseri hücre hattına karşı etkisinin, daha yüksek olabileceği öngörülmüştür (C. Chen ve diğerleri, 2014). Ancak, bileşik üzerinde bu iki metodolojinin kıyaslandığı yeterli sayıda *in vitro* çalışma bulunmamaktadır.

Histopatolojik analizlerde sham grubuna ait meme dokusunun normal histolojik görünümde olduğu belirlenmiş, test gruplarında ise, meme dokusunda değişen histolojik tip ve sayıda

adenokarsinoma ve karsinoma bulgularına rastlanmıştır. Test gruplarından elde edilen kesitlerde, non invaziv duktal karsinoma *in situ*, invaziv papiller karsinom, invaziv tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, invaziv komedo karsinom ve invaziv kistik adenoit karsinoma saptanmıştır. Malign karakterli tüm lezyonların %58,82'sinin invaziv papiller karsinoma olduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, ratlarda meme tümörü indüksiyonunun intraperitoneal yoldan tek doz NMU uygulaması ile başarıyla oluşturulabileceği kanaatine varılmıştır. Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda, tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre tümör derecelendirmesinin azaldığı sonucuna varılmıştır.

Meme tümörlü dokularda yapılan çalışmalarda, ER (Gutiérrez ve diğerleri, 2020), Ki-67 (Davey, Hynes, Kerin, Miller ve Lowery, 2021), laminin (Qiu, Tan, Fu, Zhu ve Zhang, 2018), P63 (Koker ve Kleer, 2004), pansitokeratin (Fischer ve diğerleri, 2023), progesteron (Trabert, Sherman, Kannan ve Stanczyk, 2020), apoptozis (Yuan ve diğerleri, 2022) ve vimentin (X. Wang ve diğerleri, 2020) seviyelerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda da, NMU-nedenli östrojen pozitif meme tümörü modelinde bu parametrelere ait değerlerin artış gösterdiği, test numunelerinin uygulanmasıyla bu seviyelerin modüle edildiği görülmüştür. Bununla birlikte, meme tümörlü dokuda E-kaderin (Karsten ve diğerleri, 2022) ve EGFR (Hashmi ve diğerleri, 2019). düzeylerinin hücre tipine ve hormon bağımlı olup olmadığına göre değişkenlik gösterebildiği bildirilmiştir. Özellikle E-kaderin'in tümör ilerlemesinin patogenezinde farklı potansiyellerinin olduğu, hücre yapışma moleküllerinin sürekli ekspresyonunun, tümör büyümesinin ve metastazının baskılanmasına mutlaka katkıda bulunmayacağı ve bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görüşü savunulmaktadır (Karsten ve diğerleri, 2022). Çalışmamızda ise, E-kaderin düzeyinin kontrol grubunda arttığı tedavi ile birlikte azaldığı görülmüştür. EGFR düzeyinin ise gruplar arası değişkenlik gösterdiği dikkati çekmiştir. E-kaderin ve EGFR düzeylerindeki bu değişimin tümör hücre tipine göre değişkenlik gösterebileceği düşünülmektedir. Elde ettiğimiz bu veriler doğrultusunda, proliferasyon ve apoptotik indeks başta olmak üzere histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgular birlikte değerlendirildiğinde, tedaviye en iyi yanıtın nobiletin grubunda; tümör skorlandırılmasında en olumsuz sonuçların ise kontrol grubunda olduğu kanaatine varılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, nobiletin bileşiğinin son yıllarda oldukça önemli bileşikler arasında yer aldığı ve çok çeşitli hastalıkların tedavisindeki terapötik potansiyelinin yoğun bir şekilde

araştırıldığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmalar, nobiletinin *in vivo* kullanım için güvenli bir ajan olduğunu, uzun süreli toksisiteye veya toksisite belirtileri olan kilo ve karaciğer ağırlığında azalmaya neden olmadığını göstermiştir (Lin, Chen, Li, Lin ve Wang, 2017; Miyamoto ve diğerleri, 2008; Yabing Wang, Xie, Ai ve Su, 2019; H. Zhang, Lv, Xiao, Jothi ve Yang, 2020). Çalışmamızda da, 8 hafta süreyle nobiletin uygulamasına bağlı olarak kilo kaybı ve klinik toksisite bulgusuna rastlanmamıştır. Çok sayıda metoksi grubunun varlığı nedeniyle suda çözünürlüğü zayıf olduğundan biyoyararlanımı düşüktür. Bu nedenle, bileşiğin çözünürlüğünün ve dolayısıyla gastrointestinal emiliminin artırılması için amorf katı dispersiyonlar ve nanopartikül formülasyonları hazırlanmaktadır (Hattori ve diğerleri, 2019; Luque-Alcaraz ve diğerleri, 2012; Wani, Sharma, Zhong ve Chauhan, 2020).

Sonuç olarak, çalışmamızda, aktivite-yönlendirmeli olarak izole ettiğimiz ve en yüksek aktivite gösteren nobiletin bileşiği ile ilgili yukarıda da açıklanan antikanserojenik aktivite çalışmalarının birçoğunun *in vitro* hücre deneylerinden elde edilen bulgular olduğu ve bileşik üzerinde meme tümörüne yönelik yeterli sayıda *in vivo* prelinik çalışmanın bulunmadığı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, nobiletinin tümör hücreleri üzerindeki etkileri hücre büyümesinin ve çoğalmasının engellenmesi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre apoptozunun indüklenmesi ve gen, transkripsiyon ve translasyon düzeyinde migrasyon ve invazyonun engellenmesi şeklinde açıklanmıştır (Borah, Gunawardana, Torres, McDonnell ve Van Slambrouck, 2017; C. Chen ve diğerleri, 2014; J. Liu ve diğerleri, 2018; Morley, Ferguson ve Koropatnick, 2007; Sp ve diğerleri, 2017; Y. Wu ve diğerleri, 2021; H. Zhang ve diğerleri, 2020). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada ise nobiletinin, nude farelerde MCF-7 hücre hattı enjeksiyonu ile oluşturulan östrojen pozitif *in vivo* deney modelinde, 30 ve 60 mg/kg dozlarda haftada 2 kez olmak üzere oral yolla 4 hafta boyunca uygulanması ile, ERK-STAT ve JNK-c-JUN yollarını downregüle ederek meme kanserinin karaciğer metastazını inhibe edebileceği bildirilmiş ve nobiletinin meme kanseri için terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip bir bileşik olma özelliği ortaya konulmuştur (Y. Wu ve diğerleri, 2023). Bununla birlikte, nobiletinin A549/T ksenograft fare modelinde çoklu ilaç rezistans (MDR) tümörlerinde paklitaksel ile kombine uygulandığında tümör boyutlarını küçülttüğü bulunmuştur (J. Feng ve diğerleri, 2020). Çalışmamızda, konvansiyonel hayvanlarda kimyasal-nedenli östrojen pozitif meme tümörü modelinde nobiletinin bağışıklık hücreleri, sitokin ve kemokinler ile tümör mikroçevresi üzerindeki etkileri ve bu modülasyonun nasıl sağlandığı ortaya konulmuştur. Tümör mikroçevresi nispeten karmaşık olduğundan *in vivo* deneylerle daha somut sonuçlar ortaya konulmuş, *in*

vitro bulguların *in vivo* sonuçlarla uyumluluğu değerlendirilmiş ve ileri araştırmalara yol gösterici olması açısından önemli bulgular elde edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, *Citrus aurantium* L. (turunç), *Citrus grandis* (L.) Osbeck (pomelo), *Citrus medica* L. (ağaç kavunu) ve *Citrus paradisi* Macfad. (greyfurt) bitkilerinin meyve kabuklarının meme tümörü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En aktif bulunan *C. aurantium* EtOAc ekstrelerinden aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ve izolasyon çalışmaları doğrultusunda etkili bulunan fraksiyon, alt fraksiyon ve bileşiğin antikanser etkileri östrojen pozitif *in vivo* model ile araştırılmış ve antitümör etkinliğin doku ve gen düzeyinde ortaya konulmasıyla, bilimsel literatüre önemli katkılar sunulması sağlanmıştır. Hem ekstrenin, hem fraksiyonların hem de nobiletin bileşiğinin farklı oranlarda tümör-nedenli sitokinleri ve genleri modüle ettiği anlaşılmıştır. Yapılan tüm değerlendirmelerde, nobiletinin en iyi etki gösteren bileşik olduğu belirlenmiştir. İleri çalışmalarda, bu bileşiğin farklı dozları ile farklı uygulama sürelerinin araştırılmasının, bileşiğin biyoyararlanımı da göz önünde bulundurularak etkili formülasyonlarının hazırlanmasının, etki mekanizmasına yönelik araştırmaların nude fareler ve zebra balığının kullanıldığı daha gelişmiş *in vivo* modellerde farklı meme tümörü tiplerinde çalışılmak suretiyle ortaya konulmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca meme kanseri tedavisinde nobiletinin kemoterapi ve hedefe yönelik ilaçlarla kombine edilmesine ilişkin nispeten az sayıda çalışma bulunduğundan, nobiletinin diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımında olası sinerjik etkilerinin araştırılmasına yönelik ileri çalışmalar yapılmalıdır. CLC-Pred aracılığı (*in silico*) ile yapılan sitotoksik aktivite analizlerinde nobiletinin prostat ve kolon kanserlerinde ve lösemide etki gösterebileceğine yönelik tahminler de elde edilmiştir. Nobiletin üzerinde ileride bu kanser tiplerinde yapılacak yeni çalışmaların önemli sonuçlar getirmesi muhtemel olabilecektir.

Çalışmamızda etkisini değerlendirdiğimiz diğer *Citrus* türlerinin de (*Citrus grandis*, *C. medica* ve *C. paradisi*) sitotoksik etki gösteren ekstreleri üzerinde ileri preklinik ve fitokimyasal çalışmalar yürütülebilir. Bununla birlikte, *Citrus* meyve kabuğu atıkları çok çeşitli molekül iskeletlerine sahip potansiyel sitotoksik etkili bileşikleri içeren ve terapötik değeri yüksek olan yan ürünler olduğundan, bu atıkların ülkemize ekonomik yarar sağlayacak bir kaynağa dönüştürülmesinin hedeflenmesi ve nobiletin gibi diğer biyoaktif sekonder metabolitlerin elde edilmesi amacıyla çeşitli üretim proseslerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların yapılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Takada, Y., Banerjee, S., Newman, R. A., Bueso-Ramos, C. E. and Price, J. E. (2005). Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor- κ B pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clinical Cancer Research*, 11(20), 7490-7498.
- Aggarwal, R., Jha, M., Shrivastava, A. and Jha, A. K. (2015). Natural compounds: role in reversal of epigenetic changes. *Biochemistry (Moscow)*, 80, 972-989.
- Agra, M. d. F., Silva, K. N., Basílio, I. J. L. D., Freitas, P. F. d. and Barbosa-Filho, J. M. (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 472-508.
- Ahmad, A., Ali, S., Ahmed, A., Ali, A. S., Raz, A., Sakr, W. A. and Rahman, K. W. (2013). 3, 3'-Diindolylmethane enhances the effectiveness of herceptin against HER-2/neu-expressing breast cancer cells. *PLOS One*, 8(1), e54657.
- Ahmad, A., Ali, S., Wang, Z., Ali, A. S., Sethi, S., Sakr, W. A. and Rahman, K. W. (2011). 3, 3'-diindolylmethane enhances taxotere-induced growth inhibition of breast cancer cells through downregulation of FoxM1. *International Journal of Cancer*, 129(7), 1781-1791.
- Akhlaghi, M., Shabanian, G., Rafieian-Kopaei, M., Parvin, N., Saadat, M. and Akhlaghi, M. (2011). *Citrus aurantium* blossom and preoperative anxiety. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61, 707-712.
- Amalina, N. and Wahyuni, S. (2021). *Cytotoxic effects of the synthesized Citrus aurantium peels extract nanoparticles against MDA-MB-231 breast cancer cells*. Paper presented at the Journal of Physics: Conference Series.
- Amini, H. and Hamdam, S. (2017). Medicinal plants used traditionally in Guldara district of Kabul, Afghanistan. *International Journal of Pharmacognosy & Chinese Medicine*, 1(3), 000118.
- Amiri, M. S. and Joharchi, M. R. (2013). Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(3), 254.
- Ana, C.-C., Jesús, P.-V., Hugo, E.-A., Teresa, A.-T., Ulises, G.-C. and Neith, P. (2018). Antioxidant capacity and UPLC–PDA ESI–MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 5106-5114.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 163-171.
- Anmol, R. J., Marium, S., Hiew, F. T., Han, W. C., Kwan, L. K., Wong, A. K. Y. and Kifli, N. (2021). Phytochemical and therapeutic potential of *Citrus grandis* (L.) Osbeck: A review. *Journal of Evidence-based Integrative Medicine*, 26, 2515690X211043741.

- Anwar, S., Ahmed, N., Speciale, A., Cimino, F. and Saija, A. (2016). Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 259-268): Elsevier.
- Appelhans, M. S., Bayly, M. J., Heslewood, M. M., Groppo, M., Verboom, G. A., Forster, P. I. and Duretto, M. F. (2021). A new subfamily classification of the *Citrus* family (Rutaceae) based on six nuclear and plastid markers. *Taxon*, 70(5), 1035-1061.
- Arias, B. A. and Ramón-Laca, L. (2005). Pharmacological properties of *citrus* and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1), 89-95.
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A. and Cavalli, F. (2017). Non-hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 390(10091), 298-310.
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M. and González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279-3330.
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Mohammadinejad, R., Kaviyani, N. and Tavakol, S. (2020). Monoterpenes modulating autophagy: A review study. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 126(1), 9-20.
- Au, D. T., Wu, J., Jiang, Z., Chen, H., Lu, G. and Zhao, Z. (2008). Ethnobotanical study of medicinal plants used by Hakka in Guangdong, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 41-50.
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M. and Goodman, C. B. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Research*, 29(8), 2993-2996.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z. and Sarkar, F. H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*, 269(2), 226-242.
- Barlas, S. (2016). The White House launches a cancer moonshot: despite funding questions, the progress appears promising. *Pharmacy and Therapeutics*, 41(5), 290.
- Barrett, H. and Rhodes, A. (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany*, 105-136.
- Belobrajdic, D. P. and McIntosh, G. H. (2000). Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats. *Nutrition and Cancer*, 36(2), 217-223.
- Ben Hsouna, A., Gargouri, M., Dhifi, W., Ben Saad, R., Sayahi, N., Mnif, W. and Saibi, W. (2019). Potential anti-inflammatory and antioxidant effects of *Citrus aurantium* essential oil against carbon tetrachloride-mediated hepatotoxicity: A biochemical, molecular and histopathological changes in adult rats. *Environmental Toxicology*, 34(4), 388-400.

- Benayad, O., Bouhrim, M., Tiji, S., Kharchoufa, L., Addi, M., Drouet, S. and Bnouham, M. (2021). Phytochemical profile, α -glucosidase, and α -amylase inhibition potential and toxicity evaluation of extracts from *Citrus aurantium* (L) peel, a valuable by-product from Northeastern Morocco. *Biomolecules*, 11(11), 1555.
- Benjamim, C. J. R., Júnior, F. W. d. S., Porto, A. A., Rocha, É. M. B., Santana, M. D., Garner, D. M. and Bueno Júnior, C. R. (2022). Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) intake before submaximal aerobic exercise is safe for cardiovascular and autonomic systems in healthy males: a randomized trial. *Frontiers in Nutrition*, 9, 890388.
- Benzaid, C., Belmadani, A., Tichati, L., Djeribi, R. and Rouabhia, M. (2021). Effect of *Citrus aurantium* L. essential oil on *Streptococcus mutans* growth, biofilm formation and virulent genes expression. *Antibiotics*, 10(1), 54.
- Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prevention Research*, 2(5), 409-418.
- Bloom, H. and Richardson, W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*, 11(3), 359.
- Boon, H. S., Olatunde, F. and Zick, S. M. (2007). Trends in complementary/alternative medicine use by breast cancer survivors: comparing survey data from 1998 and 2005. *BMC Women's Health*, 7, 1-7.
- Borah, N., Gunawardana, S., Torres, H., McDonnell, S. and Van Slambrouck, S. (2017). 5, 6, 7, 3', 4', 5'-Hexamethoxyflavone inhibits growth of triple-negative breast cancer cells via suppression of MAPK and Akt signaling pathways and arresting cell cycle. *International Journal of Oncology*, 51(6), 1685-1693.
- Boyd, M. R. (1997). The NCI *in vitro* anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation, 1985–1995. In *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval* (pp. 23-42): Springer.
- Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A. and Berghe, D. V. (1996). Inhibition of bacterial mutagenesis by *Citrus* flavonoids. *Planta Medica*, 62(03), 222-226.
- Carvalho-Freitas, M. I. R. and Costa, M. (2002). Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1629-1633.
- Cebadera-Miranda, L., Morales, P. and Cámara, M. (2019). Bioactive compounds in oranges from the Mediterranean climate area. *The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 606.
- Chan, M. M., Lu, X., Merchant, F. M., Iglehart, J. D. and Miron, P. L. (2005). Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis*, 26(8), 1343-1353.

- Chavoshi, H., Vahedian, V., Saghaei, S., Pirouzpanah, M. B., Raeisi, M. and Samadi, N. (2017). Adjuvant therapy with silibinin improves the efficacy of paclitaxel and cisplatin in MCF-7 breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 18(8), 2243.
- Chen, C., Ono, M., Takeshima, M. and Nakano, S. (2014). Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of nobiletin against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, 34(4), 1785-1792.
- Chen, J., Chen, A. Y., Huang, H., Ye, X., Rollyson, W. D., Perry, H. E. and Dasgupta, P. (2015). The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancers via the Akt pathway. *International Journal of Oncology*, 46(6), 2629-2638.
- Chen, J., Duan, Y., Zhang, X., Ye, Y., Ge, B. and Chen, J. (2015). Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food & Function*, 6(3), 995-1000.
- Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F. and He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(2), 115-132.
- Chen, Y., Shu, W., Chen, W., Wu, Q., Liu, H. and Cui, G. (2007). Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101(6), 427-433.
- Cheng, X. and Lopez, D. M. (1998). CD4+, but not CD8+, T cells from mammary tumor-bearing mice have a down-regulated production of IFN- γ : role of phosphatidyl serine. *The Journal of Immunology*, 160(6), 2735-2741.
- Chlebowski, R. T. (2014). Current concepts in breast cancer chemoprevention. *Polish Archives of Internal Medicine*, 124(4), 191-199.
- Cho, H. W., Jung, S. Y., Lee, G. H., Cho, J. H. and Choi, I. Y. (2015). Neuroprotective effect of *Citrus unshiu* immature peel and nobiletin inhibiting hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HT22 murine hippocampal neuronal cells. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl 2), S284.
- Chow, H. S., Garland, L. L., Heckman-Stoddard, B. M., Hsu, C.-H., Butler, V. D., Cordova, C. A. and Cornelison, T. L. (2014). A pilot clinical study of resveratrol in postmenopausal women with high body mass index: effects on systemic sex steroid hormones. *Journal of Translational Medicine*, 12, 1-7.
- Chung, M.-H., Kim, D.-H., Na, H.-K., Kim, J.-H., Kim, H.-N., Haegeman, G. and Surh, Y.-J. (2014). Genistein inhibits phorbol ester-induced NF- κ B transcriptional activity and COX-2 expression by blocking the phosphorylation of p65/RelA in human mammary epithelial cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 768, 74-83.
- Costa, C. A., Cury, T. C., Cassettari, B. O., Takahira, R. K., Flório, J. C. and Costa, M. (2013). *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT 1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1-10.

- Coughlin, S. S. and Ekwueme, D. U. (2009). Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiology*, 33(5), 315-318.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 72-79.
- Cuendet, M. and Pezzuto, M. (2000). The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17(1-4), 109-158.
- Curigliano, G., Cardoso, F., Gnant, M., Harbeck, N., King, J., Laenkholm, A.-V. and Prat, A. (2023). PROCURE European consensus on breast cancer multigene signatures in early breast cancer management. *NPJ Breast Cancer*, 9(1), 8.
- Da, C., Liu, Y., Zhan, Y., Liu, K. and Wang, R. (2016). Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Oncology Reports*, 35(5), 2767-2774.
- Dadwal, V., Joshi, R. and Gupta, M. (2022). A comparative metabolomic investigation in fruit sections of *Citrus medica* L. and *Citrus maxima* L. detecting potential bioactive metabolites using UHPLC-QTOF-IMS. *Food Research International*, 157, 111486.
- Dall'Acqua, S. (2014). Natural products as antimitotic agents. *Current Topics in medicinal Chemistry*, 14(20), 2272-2285.
- Davey, M. G., Hynes, S. O., Kerin, M. J., Miller, N. and Lowery, A. J. (2021). Ki-67 as a prognostic biomarker in invasive breast cancer. *Cancers*, 13(17), 4455.
- Davis, P. H. (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. In *Edinburgh University Press* (Vol. 2).
- De-qiu, F., Wen-cai, Z., Shun-Yuan, X., De-qiu, F., Wen-cai, Z. and Shun-Yuan, X. (1993). Studies on taxonomy and evolution of *Citrus* and its related genera by isozyme analysis. *Journal of Systematics and Evolution*, 31(4), 329.
- de Moraes Pultrini, A., Galindo, L. A. and Costa, M. (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, 78(15), 1720-1725.
- Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C. and Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211034366.
- Degner, S. C., Papoutsis, A. J., Selmin, O. and Romagnolo, D. F. (2009). Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3, 3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *The Journal of Nutrition*, 139(1), 26-32.
- Delaney, B., Phillips, K., Vasquez, C., Wilson, A., Cox, D., Wang, H. and Manthey, J. (2002). Genetic toxicity of a standardized mixture of *citrus* polymethoxylated flavones. *Food and Chemical Toxicology*, 40(5), 617-624.

- Den Hartogh, D. J. and Tsiani, E. (2019). Antidiabetic properties of naringenin: A *citrus* fruit polyphenol. *Biomolecules*, 9(3), 99.
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A. and von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*, 389(10087), 2430-2442.
- Denkert, C., Winzer, K. J., Müller, B. M., Weichert, W., Pest, S., Köbel, M. and Guski, H. (2003). Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 97(12), 2978-2987.
- Dharmappa, K. K., Mohamed, R., Shivaprasad, H. V. and Vishwanath, B. S. (2010). Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A 2: a new insight in down regulation of inflammation. *Inflammopharmacology*, 18, 25-31.
- Divya, P. J., Jamuna, P. and Jyothi, L. A. (2016). Antioxidant properties of fresh and processed *Citrus aurantium* fruit. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1184119.
- Duan, L., Guo, L., Liu, K., Liu, E.-H. and Li, P. (2014). Characterization and classification of seven *Citrus* herbs by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *Journal of Chromatography A*, 1339, 118-127.
- Ducasse, M. and Brown, M. A. (2006). Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer*, 5, 1-10.
- Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. (2015). The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches *Citrus* phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. *PLOS One*, 10(11), e0142757.
- Duru, N., Gernapudi, R. and Zhou, Q. (2014). Chemopreventive activities of shikonin in breast cancer. *Biochemical Pharmacology*, 3, e163.
- El-Kersh, D. M., Ezzat, S. M., Salama, M. M., Mahrous, E. A., Attia, Y. M., Ahmed, M. S. and Elmazar, M. M. (2021). Anti-estrogenic and anti-aromatase activities of *citrus* peels major compounds in breast cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 7121.
- Elsayed, H. E., Ebrahim, H. Y., Mohyeldin, M. M., Siddique, A. B., Kamal, A. M., Haggag, E. G. and El Sayed, K. A. (2017). Rutin as a novel c-Met inhibitory lead for the control of triple negative breast malignancies. *Nutrition and Cancer*, 69(8), 1256-1271.
- Encarnacion Dimayuga, R., Virgen, M. and Ochoa, N. (1998). Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology*, 36(1), 33-43.
- Essombe Malolo, F. A., Bellier Tabekoueng, G., Dongmo Tekapi Tsopgni, W., Nguemdjo Chimeze, V. W., Kenmogne Kouam, A., Mas-Claret, E. and Sewald, N. (2022). Chemical constituents of the stem bark of the hybrid plant *Citrus × paradisi* Macfad.(Rutaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 19(7), e202101033.

- Ezzati, M., Yousefi, B., Velaei, K. and Safa, A. (2020). A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. *Life Sciences*, 248, 117463.
- Fang, J., Wu, X., Jiang, J. and Mao, L. (2018). Related analysis between antioxidant activities and HPLC fingerprint of flavonoids in *citrus changshan-huyou* YB Peels. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 35(10), 1489-1493.
- Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C. and Camacho-Corona, M. d. R. (2016). Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2), 247.
- Federici, C., Fang, D., Scora, R. and Roose, M. (1998). Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 812-822.
- Feng, J., Hu, W., Xu, L., Li, J., Wang, S. and Song, J. (2020). Simultaneous determination of the contents of 12 flavonoids in quzhiqiao from different collection places by HPLC. *China Pharmacy*, 571-575.
- Feng, S.-L., Tian, Y., Huo, S., Qu, B., Liu, R.-M., Xu, P. and Xie, Y. (2020). Nobiletin potentiates paclitaxel anticancer efficacy in A549/T xenograft model: Pharmacokinetic and pharmacological study. *Phytomedicine*, 67, 153141.
- Ferlay, J., Héry, C., Autier, P. and Sankaranarayanan, R. (2010). Global burden of breast cancer. *Breast Cancer Epidemiology*, 1-19.
- Filimonov, D., Lagunin, A., Gloriovova, T., Rudik, A., Druzhilovskii, D., Pogodin, P. and Poroikov, V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50, 444-457.
- Fischer, J. R., Jackson, H. W., de Souza, N., Varga, Z., Schraml, P., Moch, H. and Bodenmiller, B. (2023). Multiplex imaging of breast cancer lymph node metastases identifies prognostic single-cell populations independent of clinical classifiers. *Cell Reports Medicine*, 4(3).
- Gao, X., Xu, D., Zhang, X. and Zhao, H. (2021). Protective effect of lemon peel polyphenols on oxidative stress-induced damage to human keratinocyte HaCaT cells through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Frontiers in Nutrition*, 7, 606776.
- Gopal, P. V. (2012). Evaluation of anti-microbial activity of *Citrus aurantium* against some gram positive and negative bacterial strains. *Pharmacia*, 1(3), 107-109.
- Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, 102(1), 1-4.
- Greene, F. L. and Sobin, L. H. (2008). The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(3), 180-190.
- Gress, D. M., Edge, S. B., Greene, F. L., Washington, M. K., Asare, E. A., Brierley, J. D. and Winchester, D. P. (2017). Principles of cancer staging. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8, 3-30.

- Groppo, M., Afonso, L. F. and Pirani, J. R. (2022). A review of systematics studies in the *Citrus* family (Rutaceae, Sapindales), with emphasis on American groups. *Brazilian Journal of Botany*, 45(1), 181-200.
- Grosso, G., Bella, F., Godos, J., Sciacca, S., Del Rio, D., Ray, S. and Giovannucci, E. L. (2017). Possible role of diet in cancer: systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutrition Reviews*, 75(6), 405-419.
- Group, E. B. C. T. C. (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 366(9503), 2087-2106.
- Gu, M., Cai, X., Song, M., Li, Z., Li, F., Goulette, T. and Xiao, H. (2017). Inhibitory effects of nobiletin on colitis were associated with altered gut microbiota. *The FASEB Journal*, 31, 793.711-793.711.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1625.
- Gutiérrez, A., Sambuco, L., Alvarez, L., Núñez, M., Bergoc, R., Zotta, E. and Randi, A. (2020). Expression of estrogen receptor α variants and c-Fos in rat mammary gland and tumors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 199, 105594.
- Hamed, A., Zarshenas, M. M., Jamshidzadeh, A., Ahmadi, S., Heidari, R. and Pasdaran, A. (2019). *Citrus aurantium* (bitter orange) seeds oil: pharmacognostic, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 153-164.
- Hamilton, J. P., Sato, F., Greenwald, B. D., Suntharalingam, M., Krasna, M. J., Edelman, M. J. and Mori, Y. (2006). Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(6), 701-708.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S. and Hayes, M. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 134(7), e48-e72.
- Han, M. H., Lee, W. S., Lu, J. N., Kim, G., Jung, J. M., Ryu, C. H. and Choi, Y. H. (2012). *Citrus aurantium* L. exhibits apoptotic effects on U937 human leukemia cells partly through inhibition of Akt. *International Journal of Oncology*, 40(6), 2090-2096.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hansen, D. K., George, N. I., White, G. E., Pellicore, L. S., Abdel-Rahman, A., Fabricant, D. and Administration, D. (2012). Physiological effects following administration of *Citrus aurantium* for 28 days in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(3), 236-247.

- Haraoui, N., Allem, R., Chaouche, T. M. and Belouazni, A. (2020). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of some varieties citrus grown in Algeria. *Advances in Traditional Medicine*, 20(1), 23-34.
- Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M. and Cohen, G. M. (2003). Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25534-25541.
- Hashmi, A. A., Naz, S., Hashmi, S. K., Irfan, M., Hussain, Z. F., Khan, E. Y. and Faridi, N. (2019). Epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpression in triple-negative breast cancer: association with clinicopathologic features and prognostic parameters. *Surgical and Experimental Pathology*, 2(1), 1-7.
- Hattori, T., Tagawa, H., Inai, M., Kan, T., Kimura, S.-i., Itai, S. and Iwao, Y. (2019). Transdermal delivery of nobiletin using ionic liquids. *Scientific Reports*, 9(1), 20191.
- Hindi, N. K. K. and Chabuck, Z. A. G. (2013). Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(6), 074-078.
- Hosokawa, Y., Hosokawa, I. and Ozaki, K. (2021). Nobiletin decreases inflammatory mediator expression in tumor necrosis factor-stimulated human periodontal ligament cells. *Mediators of Inflammation*, 2021(1), 5535844.
- Hsieh, T. c. and Wu, J. M. (2010). Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *Biofactors*, 36(5), 360-369.
- Hu, L., Chen, J., Duan, H., Zou, Z., Qiu, Y., Du, J. and Nagai, T. (2023). A screening strategy for bioactive components of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang regulating spleen-qi deficiency based on “endobiotics-targets-xenobiotics” association network. *Journal of Ethnopharmacology*, 314, 116605.
- Hu, Y. H., Liu, J., Li, H., Tang, W., Li, X. W. and Guo, Y. W. (2020). Chemical constituents from *citrus changshan-huyou* and their anti-inflammatory activities. *Chemistry & Biodiversity*, 17(11), e2000503.
- Idowu, O., Soniran, O., Ajana, O. and Aworinde, D. (2010). Ethnobotanical survey of antimalarial plants used in Ogun State, Southwest Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(2), 055-060.
- Ijaz, M. U., Ahmed, A., Al-Ghanim, K. A., Al-Misned, F., Riaz, M. N., Kaimkhani, Z. A. and Mahboob, S. (2023). Evaluation of the possible protective role of nobiletin against arsenic-induced liver damage in male albino rats. *Toxics*, 11(2), 110.
- Ijaz, M. U., Tahir, A., Samad, A. and Anwar, H. (2021). Nobiletin ameliorates nonylphenol-induced testicular damage by improving biochemical, steroidogenic, hormonal, spermatogenic, apoptotic and histological profile. *Human & Experimental Toxicology*, 40(3), 403-416.
- Imai, F., Kinoshita, T. and Sankawa, U. (1989). Constituents of the leaves of *Murraya paniculata* collected in Taiwan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(2), 358-362.

- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabala-Dzik, A. and Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1529-1538.
- Ito, C., Fujiwara, K., Koizumi, M. and Furukawa, H. (1998). Isolation and characterization of an antibacterial substance from *Citrus* plant. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 45(1), 89-91.
- Itoh, N., Iwata, C. and Toda, H. (2016). Molecular cloning and characterization of a flavonoid-O-methyltransferase with broad substrate specificity and regioselectivity from *Citrus depressa*. *BMC Plant Biology*, 16, 1-13.
- Jabri karoui, I. and Marzouk, B. (2013). Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International*, 2013(1), 345415.
- Jackson, S. J. and Singletary, K. W. (2004a). Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2229-2236.
- Jackson, S. J. and Singletary, K. W. (2004b). Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis*, 25(2), 219-227.
- Janhavi, P., Divyashree, S., Sanjailal, K. and Muthukumar, S. (2022). DoseCal: a virtual calculator for dosage conversion between human and different animal species. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128(2), 426-430.
- Jayaprakasha, G., Mandadi, K., Poulouse, S., Jadegoud, Y., Gowda, G. N. and Patil, B. S. (2008). Novel triterpenoid from *Citrus aurantium* L. possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(11), 5939-5951.
- Jayaprakasha, G. K., Brodbelt, J. S., Bhat, N. G. and Patil, B. S. (2006). Methods for the separation of limonoids from *citrus*. In: ACS Publications.
- Jia, S., Hu, Y., Zhang, W., Zhao, X., Chen, Y., Sun, C. and Chen, K. (2015). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from *Citrus aurantium* L. in diabetic KK-A y mice. *Food & Function*, 6(3), 878-886.
- Jiang, K., Wang, W., Jin, X., Wang, Z., Ji, Z. and Meng, G. (2015). Silibinin, a natural flavonoid, induces autophagy via ROS-dependent mitochondrial dysfunction and loss of ATP involving BNIP3 in human MCF7 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 33(6), 2711-2718.
- Jiao, S., Huang, C., Wang, H. and Yu, S. (2007). Effects of *Citrus aurantium* extract on liver antioxidant defense function in experimental diabetic mouse. *Wei Sheng yan jiu= Journal of Hygiene Research*, 36(6), 689-692.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153-164.

- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. and Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*, 8, 1-16.
- Jose, M. A., Amathi, R., Sathyamurthy, D. and Kumar, B. N. (2013). Chemopreventive effect of montelukast in n-nitroso n-methyl urea induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 45(3), 286-288.
- Jun, Y., Xu, J., Kim, H., Park, J. E., Jeong, Y.-S., Min, J. S. and Bae, S. K. (2020). Carfilzomib delivery by quinic acid-conjugated nanoparticles: discrepancy between tumoral drug accumulation and anticancer efficacy in a murine 4T1 orthotopic breast cancer model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(4), 1615-1622.
- Kačániová, M., Terentjeva, M., Galovičová, L., Ivanišová, E., Štefániková, J., Valková, V. and Felšöciiová, S. (2020). Biological activity and antibiofilm molecular profile of *Citrus aurantium* essential oil and its application in a food model. *Molecules*, 25(17), 3956.
- Kakarala, M., Brenner, D. E., Korkaya, H., Cheng, C., Tazi, K., Ginestier, C. and Wicha, M. S. (2010). Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122, 777-785.
- Kalam, S., Soujanya, K., Mahendar, P. and Begum, S. (2016). *In vitro* antioxidant and cytotoxic activities of new herbal ointments. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 50(2), S1-S10.
- Kang, M. H. and Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 15(4), 1126-1132.
- Kang, S. R., Park, K. I., Park, H. S., Lee, D. H., Kim, J. A., Nagappan, A. and Park, M. K. (2011). Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chemistry*, 129(4), 1721-1728.
- Karabıyıklı, Ş., Değirmenci, H. and Karapınar, M. (2014). Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 421-425.
- Karsten, N., Kolben, T., Mahner, S., Beyer, S., Meister, S., Kuhn, C. and Ditsch, N. (2022). The role of E-Cadherin expression in primary site of breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 1-8.
- Karthikeyan, V. and Karthikeyan, J. (2014). *Citrus aurantium* (bitter orange): A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *International Journal of Drug Discovery and Herbal Research*, 4(4), 766-772.
- Kayani, S., Ahmad, M., Zafar, M., Sultana, S., Khan, M. P. Z., Ashraf, M. A. and Yaseen, G. (2014). Ethnobotanical uses of medicinal plants for respiratory disorders among the inhabitants of Gallies–Abbottabad, Northern Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 156, 47-60.

- Khan, S. I., Aumsuwan, P., Khan, I. A., Walker, L. A. and Dasmahapatra, A. K. (2012). Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), 61-73.
- Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F. and Maiza-Benabdeslam, F. (2017). Phenolic compounds from *Citrus* leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1), 20160030.
- Kim, A., Im, M., Gu, M. J. and Ma, J. Y. (2016). *Citrus unshiu* peel extract alleviates cancer-induced weight loss in mice bearing CT-26 adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 6(1), 24214.
- Kim, E., Kim, Y.-J., Ji, Z., Kang, J. M., Wirianto, M., Paudel, K. R. and Eckel-Mahan, K. (2022). ROR activation by Nobiletin enhances antitumor efficacy via suppression of I κ B/NF- κ B signaling in triple-negative breast cancer. *Cell Death & Disease*, 13(4), 374.
- Kim, G.-S., Park, H. J., Woo, J.-H., Kim, M.-K., Koh, P.-O., Min, W. and Cho, J.-H. (2012). *Citrus aurantium* flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 1-10.
- Kim, H.-N., Kim, D.-H., Kim, E.-H., Lee, M.-H., Kundu, J. K., Na, H.-K. and Surh, Y.-J. (2014). Sulforaphane inhibits phorbol ester-stimulated IKK-NF- κ B signaling and COX-2 expression in human mammary epithelial cells by targeting NF- κ B activating kinase and ERK. *Cancer Letters*, 351(1), 41-49.
- Kim, H., Hall, P., Smith, M., Kirk, M., Prasain, J. K., Barnes, S. and Grubbs, C. (2004). Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3445S-3452S.
- Kim, S., Kim, S. H., Hur, S. M., Lee, S.-K., Kim, W. W., Kim, J. S. and Lee, J. E. (2009). Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression by down-regulation of COX-2 in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2), 252-257.
- Kim, S. H., Park, H. J. and Moon, D. O. (2017). Sulforaphane sensitizes human breast cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis by downregulating the NF- κ B signaling pathway. *Oncology Letters*, 13(6), 4427-4432.
- King-Batoon, A., Leszczynska, J. M. and Klein, C. B. (2008). Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(1), 36-45.
- Kisacam, M. A. (2023). Nobiletin is capable of regulating certain anti-cancer pathways in a colon cancer cell line. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(3), 547-555.
- Kiyama, R. (2023). Estrogenic flavonoids and their molecular mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 114, 109250.

- Ko, E.-Y. and Moon, A. (2015). Natural products for chemoprevention of breast cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20(4), 223.
- Ko, Y.-C., Choi, H. S., Liu, R., Kim, J.-H., Kim, S.-L., Yun, B.-S. and Lee, D.-S. (2020). Inhibitory effects of tangeretin, a *citrus* peel-derived flavonoid, on breast cancer stem cell formation through suppression of Stat3 signaling. *Molecules*, 25(11), 2599.
- Kohno, H., Yoshitani, S.-i., Tsukio, Y., Murakami, A., Koshimizu, K., Yano, M. and Tanaka, T. (2001). Dietary administration of *citrus nobiletin* inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Life Sciences*, 69(8), 901-913.
- Koker, M. M. and Kleer, C. G. (2004). p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 28(11), 1506-1512.
- Kubitzki, K. (2010). *Flowering plants. eudicots: Sapindales, cucurbitales, myrtaceae* (Vol. 10): Springer Science & Business Media.
- Kuo, P.-C., Liao, Y.-R., Hung, H.-Y., Chuang, C.-W., Hwang, T.-L., Huang, S.-C. and Wu, T.-S. (2017). Anti-inflammatory and neuroprotective constituents from the peels of *Citrus grandis*. *Molecules*, 22(6), 967.
- Lagha-Benamrouche, S. and Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.
- Lagunin, A. A., Dubovskaja, V. I., Rudik, A. V., Pogodin, P. V., Druzhilovskiy, D. S., Glorizova, T. A. and Poroikov, V. V. (2018). CLC-Pred: A freely available web-service for in silico prediction of human cell line cytotoxicity for drug-like compounds. *PLOS One*, 13(1), e0191838.
- Landis-Piwowar, K. R., Milacic, V. and Dou, Q. P. (2008). Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(2), 514-523.
- Lau, T. Y. and Leung, L. K. (2006). Soya isoflavones suppress phorbol 12-myristate 13-acetate-induced COX-2 expression in MCF-7 cells. *British Journal of Nutrition*, 96(1), 169-176.
- Laux, M. T., Aregullin, M., Berry, J. P., Flanders, J. A. and Rodriguez, E. (2004). Identification of a p53-dependent pathway in the induction of apoptosis of human breast cancer cells by the natural product, resveratrol. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 10(2), 235-239.
- Lee, Y.-H., Charles, A. L., Kung, H.-F., Ho, C.-T. and Huang, T.-C. (2010). Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 59-64.
- Leite, M. P., Fassin Jr, J., Baziloni, E. M., Almeida, R. N., Mattei, R. and Leite, J. R. (2008). Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 661-666.

- Lephart, E. D. (2015). Modulation of aromatase by phytoestrogens. *Enzyme Research*, 2015.
- Lewinska, A., Bednarz, D., Adamczyk-Grochala, J. and Wnuk, M. (2017). Phytochemical-induced nucleolar stress results in the inhibition of breast cancer cell proliferation. *Redox Biology*, 12, 469-482.
- Li, F., Li, S., Li, H.-B., Deng, G.-F., Ling, W.-H. and Xu, X.-R. (2013). Antiproliferative activities of tea and herbal infusions. *Food & Function*, 4(4), 530-538.
- Li, M., Zhao, H., Wu, J., Wang, L., Wang, J., Lv, K. and Liu, J. (2020). Nobiletin protects against acute liver injury via targeting c-Jun N-terminal kinase (JNK)-induced apoptosis of hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(27), 7112-7120.
- Li, N., Zhang, Z., Jiang, G., Sun, H. and Yu, D. (2019). Nobiletin sensitizes colorectal cancer cells to oxaliplatin by PI3K/Akt/MTOR pathway. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 24(2), 303-312.
- Li, Q., Yao, Y., Eades, G., Liu, Z., Zhang, Y. and Zhou, Q. (2014). Downregulation of miR-140 promotes cancer stem cell formation in basal-like early stage breast cancer. *Oncogene*, 33(20), 2589-2600.
- Li, W., Liu, J., Jackson, K., Shi, R. and Zhao, Y. (2014). Sensitizing the therapeutic efficacy of taxol with shikonin in human breast cancer cells. *PLOS One*, 9(4), e94079.
- Li, X.-Y., Hao, Y.-F., Hao, Z.-X., Jiang, J.-G., Liu, Q., Shen, Q. and Shen, C.-Y. (2021). Inhibitory effect of chloroform extracts from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. on fat accumulation. *Phytomedicine*, 90, 153634.
- Li, Y., Chen, H., Hardy, T. M. and Tollefsbol, T. O. (2013). Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. *PLOS One*, 8(1), e54369.
- Li, Y., Li, S., Meng, X., Gan, R.-Y., Zhang, J.-J. and Li, H.-B. (2017). Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*, 9(7), 728.
- Li, Y., Liang, M., Lin, Y., Lv, J., Chen, M., Zhou, P. and Wang, C. (2020). Transcriptional expressions of CXCL9/10/12/13 as prognosis factors in breast cancer. *Journal of Oncology*, 2020(1), 4270957.
- Li, Y., Liu, J., Liu, X., Xing, K., Wang, Y., Li, F. and Yao, L. (2006). Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135, 181-192.
- Li, Y., Meeran, S. M. and Tollefsbol, T. O. (2017). Combinatorial bioactive botanicals re-sensitize tamoxifen treatment in ER-negative breast cancer via epigenetic reactivation of ER α expression. *Scientific Reports*, 7(1), 9345.
- Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H.-F., Newman, B. and Wicha, M. S. (2010). Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*, 16(9), 2580-2590.

- Liao, G.-S., Apaya, M. K. and Shyur, L.-F. (2013). Herbal medicine and acupuncture for breast cancer palliative care and adjuvant therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Lim, S.-W., Lee, D.-R., Choi, B.-K., Kim, H.-S., Yang, S. H., Suh, J.-W. and Kim, K. S. (2016). Protective effects of a polymethoxy flavonoids-rich *Citrus aurantium* peel extract on liver fibrosis induced by bile duct ligation in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(12), 1158-1164.
- Limtrakul, P., Chearwae, W., Shukla, S., Phisalpong, C. and Ambudkar, S. V. (2007). Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 296, 85-95.
- Lin, S.-C., Chen, M.-C., Li, S., Lin, C.-C. and Wang, T. T. (2017). Antiviral activity of nobiletin against chikungunya virus *in vitro*. *Antiviral Therapy*, 22(8), 689-697.
- Liu, H., Chen, X., Sun, J., Gao, P., Song, Y., Zhang, N. and Wang, Z. (2014). The efficacy and toxicity of paclitaxel plus S-1 compared with paclitaxel plus 5-FU for advanced gastric cancer: a PRISMA systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 93(25), e164.
- Liu, J.-j., Lin, M., Yu, J.-y., Liu, B. and Bao, J.-k. (2011). Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Letters*, 300(2), 105-114.
- Liu, J., Wang, S., Tian, S., He, Y., Lou, H., Yang, Z. and Cao, X. (2018). Nobiletin inhibits breast cancer via p38 mitogen-activated protein kinase, nuclear transcription factor- κ B, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathways in MCF-7 cells. *Food & Nutrition Research*, 62.
- Liu, K., Wang, W., Guo, B.-H., Gao, H., Liu, Y., Liu, X.-H. and Cheng, K. (2016). Chemical evidence for potent xanthine oxidase inhibitory activity of ethyl acetate extract of *Citrus aurantium* L. dried immature fruits. *Molecules*, 21(3), 302.
- Liu, Q., Loo, W. T., Sze, S. and Tong, Y. (2009). Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NF κ B, cyclinD and MMP-1 transcription. *Phytomedicine*, 16(10), 916-922.
- Liu, X., Sun, C., Jin, X., Li, P., Ye, F., Zhao, T. and Li, Q. (2013). Genistein enhances the radiosensitivity of breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Molecules*, 18(11), 13200-13217.
- Liu, Y., Heying, E. and Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530-545.
- Lu, G., Li, J., Wang, S., Pu, J., Sun, H., Wei, Z. and Ma, H. (2018). The fluctuating incidence, improved survival of patients with breast cancer, and disparities by age, race, and socioeconomic status by decade, 1981–2010. *Cancer Management and Research*, 4899-4914.

- Lu, W., Lin, C., King, T. D., Chen, H., Reynolds, R. C. and Li, Y. (2012). Silibinin inhibits Wnt/ β -catenin signaling by suppressing Wnt co-receptor LRP6 expression in human prostate and breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 24(12), 2291-2296.
- Luan, Y., Wang, S., Wang, R. and Xu, C. (2020). Accumulation of red apocarotenoid β -citraurin in peel of a spontaneous mutant of huyou (*Citrus changshanensis*) and the effects of storage temperature and ethylene application. *Food Chemistry*, 309, 125705.
- Luque-Alcaraz, A. G., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Acosta, A. L., Iloki-Assanga, S. B. and Argüelles-Monal, W. (2012). Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012.
- Ma, X., Jin, S., Zhang, Y., Wan, L., Zhao, Y. and Zhou, L. (2014). Inhibitory effects of nobiletin on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Phytotherapy Research*, 28(4), 560-567.
- Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Pezzi, V., Carpino, A., Marsico, S., Rago, V. and Andò, S. (2002). Aromatase overexpression enhances the stimulatory effects of adrenal androgens on MCF7 breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193(1-2), 13-18.
- Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A. and Raza, A. (2014). Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(8), 3353-3358.
- Mak, N. K., Wong-Leung, Y. L., Chan, S. C., Wen, J., Leung, K. N. and Fung, M. C. (1996). Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*. *Life Sciences*, 58(15), 1269-1276.
- Malleshappa, P., Kumaran, R. C., Venkatarangaiah, K. and Parveen, S. (2018). Peels of citrus fruits: A potential source of anti-inflammatory and anti-nociceptive agents. *Pharmacognosy Journal*, 10(6s).
- Mayer, A. M. and Gustafson, K. R. (2004). Marine pharmacology in 2001–2: antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 40(18), 2676-2704.
- Mdkhana, B., Zaher, D. M., Abdin, S. M. and Omar, H. A. (2021). Tangeretin boosts the anticancer activity of metformin in breast cancer cells via curbing the energy production. *Phytomedicine*, 83, 153470.
- Meiyanto, E., Hermawan, A., Junedi, S., Fitriarsi, A. and Susidarti, R. A. (2011). Nobiletin increased cytotoxic activity of doxorubicin on MCF-7 cells but not on T47D cells. *International Journal of Phytomedicine*, 3(1), 129.
- Miles, E. A. and Calder, P. C. (2021). Effects of citrus fruit juices and their bioactive components on inflammation and immunity: a narrative review. *Frontiers in Immunology*, 12, 712608.
- Miller, K., Abraham, J. H., Rhodes, L. and Roberts, R. (2013). Use of the word “cure” in oncology. *Journal of Oncology Practice*, 9(4), e136-e140.

- Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K. and Yano, M. (2001). The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Japanese Journal of Cancer Research*, 92(12), 1322-1328.
- Miyamoto, S., Yasui, Y., Tanaka, T., Ohigashi, H. and Murakami, A. (2008). Suppressive effects of nobiletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice. *Carcinogenesis*, 29(5), 1057-1063.
- Mok, T. S., Wu, Y.-L., Kudaba, I., Kowalski, D. M., Cho, B. C., Turna, H. Z. and Bondarenko, I. (2019). Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 393(10183), 1819-1830.
- Molavi, O., Narimani, F., Asiaee, F., Sharifi, S., Tarhriz, V., Shayanfar, A. and Lai, R. (2017). Silibinin sensitizes chemo-resistant breast cancer cells to chemotherapy. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 729-739.
- Morley, K. L., Ferguson, P. J. and Koropatnick, J. (2007). Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters*, 251(1), 168-178.
- Muhtadi, H., Azizah, T., Suhendi, A. and Yen, K. H. (2015). Antidiabetic and antihypercholesterolemic activities of *Citrus sinensis* peel: *in vivo* study. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 5(5), 382-385.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiha, T., Koshimizu, K. and Yano, M. (2000). Inhibitory effect of *citrus nobiletin* on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Research*, 60(18), 5059-5066.
- Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W. and Zheng, Q. (2022). Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, 27(23), 8367.
- Nagappan, A., Park, H.-S., Hong, G.-E., Yumnam, S., Lee, H.-J., Kim, D.-H. and Kim, G.-S. (2014). Anti-cancer and anti-inflammatory properties of Korean *Citrus* fruits (*Citrus aurantium* L.). *Journal of Korean Clinical Health Science*, 2(1), 73-78.
- Nair, A. B. and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27.
- Nakajima, V. M., Macedo, G. A. and Macedo, J. A. (2014). *Citrus* bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1205-1212.
- Nicolosi, E., Deng, Z., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G. and Tribulato, E. (2000). *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1155-1166.

- Okla, M. K., Alamri, S. A., Salem, M. Z., Ali, H. M., Behiry, S. I., Nasser, R. A. and Soufan, W. (2019). Yield, phytochemical constituents, and antibacterial activity of essential oils from the leaves/twigs, branches, branch wood, and branch bark of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.). *Processes*, 7(6), 363.
- Ollitrault, P., Curk, F. and Krueger, R. (2020). *Citrus* Taxonomy. In *The Genus Citrus* (pp. 57-81): Elsevier.
- Panara, K., Joshi, K. and Nishteswar, K. (2012). A review on phytochemical and pharmacological properties of *Citrus medica* Linn. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 3(6), 1292-1297.
- Pantsulaia, I., Iobadze, M., Pantsulaia, N. and Chikovani, T. (2014). The effect of *citrus* peel extracts on cytokines levels and T regulatory cells in acute liver injury. *BioMed Research International*, 2014(1), 127879.
- Park, J., Kim, H.-L., Jung, Y., Ahn, K. S., Kwak, H. J. and Um, J.-Y. (2019). Bitter orange (*Citrus aurantium* Linné) improves obesity by regulating adipogenesis and thermogenesis through AMPK activation. *Nutrients*, 11(9), 1988.
- Park, K.-I., Park, H.-S., Kim, M.-K., Hong, G.-E., Nagappan, A., Lee, H.-J. and Shin, S.-C. (2014). Flavonoids identified from Korean *Citrus aurantium* L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 7, 287-297.
- Paul, A. and Cox, P. A. (1995). An ethnobotanical survey of the uses for *Citrus aurantium* (Rutaceae) in Haiti. *Economic Botany*, 249-256.
- Peixoto, J. S., Comar, J. F., Moreira, C. T., Soares, A. A., De Oliveira, A. L., Bracht, A. and Peralta, R. M. (2012). Effects of *Citrus aurantium* (bitter orange) fruit extracts and p-syneprine on metabolic fluxes in the rat liver. *Molecules*, 17(5), 5854-5869.
- Peng, S., Li, J., Zhou, Y., Tuo, M., Qin, X., Yu, Q. and Li, Y. (2017). *In vitro* effects and mechanisms of lycopene in MCF-7 human breast cancer cells. *Genetics and Molecular Research (GMR)*, 16(2), 13.
- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I. and Jackisch, C. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1659-1672.
- Pieroni, A., Muenz, H., Akbulut, M., Başer, K. H. C. and Durmuşkahya, C. (2005). Traditional phytotherapy and trans-cultural pharmacy among Turkish migrants living in Cologne, Germany. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 69-88.
- Pimenta, F. C. F., Alves, M. F., Pimenta, M. B. F., Melo, S. A. L., Almeida, A. A. F. d., Leite, J. R. and Almeida, R. N. d. (2016). Anxiolytic effect of *Citrus aurantium* L. on patients with chronic myeloid leukemia. *Phytotherapy Research*, 30(4), 613-617.
- Pimenta, F. C. F., Cunha-Tavares, N., Chaves-Neto, G., Alves, M., Fernandes-Pimenta, M., Melo-Diniz, J. and Melo-Diniz, M. (2017). Pharmacological actions of Citrus species. *Citrus Pathology; Gill, H., Garg, H., Eds*, 197-211.

- Pimenta, F. C. F., Tavares, N., Neto, G. C., Alves, M., Pimenta, M. F., Diniz, J. M. and Diniz, M. (2017). Pharmacological actions of *Citrus* species. In H. Gill & H. Garg (Eds.), *Citrus Pathology* (pp. 197-211).
- Pledge-Tracy, A., Sobolewski, M. D. and Davidson, N. E. (2007). Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(3), 1013-1021.
- Polat, R. and Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 626-641.
- Pons, D. G., Nadal-Serrano, M., Blanquer-Rossello, M. M., Sastre-Serra, J., Oliver, J. and Roca, P. (2014). Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbeta ratio. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(5), 949-958.
- Pula, B., Malicka, I., Pawlowska, K., Paslawska, U., Cegielski, M., Podhorska-Okolow, M. and Wozniowski, M. (2013). Immunohistochemical characterization of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumours of Sprague-Dawley rats. *In Vivo*, 27(6), 793-801.
- Qiao, J., Gu, C., Shang, W., Du, J., Yin, W., Zhu, M. and Lu, W. (2011). Effect of green tea on pharmacokinetics of 5-fluorouracil in rats and pharmacodynamics in human cell lines in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1410-1415.
- Qin, W., Zhang, K., Clarke, K., Weiland, T. and Sauter, E. R. (2014). Methylation and miRNA effects of resveratrol on mammary tumors vs. normal tissue. *Nutrition and Cancer*, 66(2), 270-277.
- Qiu, X., Tan, H., Fu, D., Zhu, Y. and Zhang, J. (2018). Laminin is over expressed in breast cancer and facilitate cancer cell metastasis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(Suppl 5), S1170-S1172.
- Rad, F. R., Ajdary, S., Omranipour, R., Alimohammadian, M. H. and Hassan, Z. M. (2015). Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer. *Iranian Biomedical Journal*, 19(1), 35.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S., Bashir, N., Nazir, F. and Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
- Rahman, K. W., Li, Y., Wang, Z., Sarkar, S. H. and Sarkar, F. H. (2006). Gene expression profiling revealed survivin as a target of 3, 3'-diindolylmethane-induced cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Research*, 66(9), 4952-4960.
- Rahmatullah, M., Mukti, I. J., Haque, A., Mollik, M. A. H., Parvin, K., Jahan, R. and Rahman, T. (2009). An ethnobotanical survey and pharmacological evaluation of medicinal plants used by the Garo tribal community living in Netrakona district, Bangladesh. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 3(3), 402-418.

- Ranger, G. S., Thomas, V., Jewell, A. and Mokbel, K. (2004). Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer. *Anticancer Research*, 24(4), 2349-2352.
- Rani, S. and Gill, N. (2020). A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant?: *Citrus medica* L. (Citron). *International Journal of Science and Research*, 10(9), 1285-1289.
- Razafindraibe, M., Kuhlman, A. R., Rabarison, H., Rakotoarimanana, V., Rajeriarison, C., Rakotoarivelo, N. and Randrianasolo, A. (2013). Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9(1), 1-13.
- Riby, J. E., Firestone, G. L. and Bjeldanes, L. F. (2008). 3, 3'-Diindolylmethane reduces levels of HIF-1 α and HIF-1 activity in hypoxic cultured human cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 75(9), 1858-1867.
- Roth, W. and Reed, J. C. (2002). Apoptosis and cancer: when BAX is TRAILing away. *Nature Medicine*, 8(3), 216-218.
- Russo, J. and Russo, I. H. (2000). Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5, 187-200.
- Saeb, S., Amin, M., Gooybari, R. S. and Aghel, N. (2016). Evaluation of antibacterial activities of *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, and *Citrus grandis* against pathogenic bacteria. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(4), e37103.
- Saini, R. K., Ranjit, A., Sharma, K., Prasad, P., Shang, X., Gowda, K. G. M. and Keum, Y.-S. (2022). Bioactive compounds of citrus fruits: A review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. *Antioxidants*, 11(2), 239.
- Saldanha, S. N. and Tollefsbol, T. O. (2012). The role of nutraceuticals in chemoprevention and chemotherapy and their clinical outcomes. *Journal of Oncology*, 2012.
- Sareen, D., Darjatmoko, S. R., Albert, D. M. and Polans, A. S. (2007). Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer. *Molecular Pharmacology*, 72(6), 1466-1475.
- Saruhan, B. G. and Dereli, S. (2016). Deney hayvanlarının beslenme, barınma ve üremesi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*(1), 16-21.
- Scheckel, K. A., Degner, S. C. and Romagnolo, D. F. (2008). Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *The Journal of Nutrition*, 138(11), 2098-2105.
- Scora, R. W. (1975). On the history and origin of *Citrus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 369-375.
- Segun, P. A., Ismail, F. M., Ogbale, O. O., Nahar, L., Evans, A. R., Ajaiyeoba, E. O. and Sarker, S. D. (2018). Acridone alkaloids from the stem bark of *Citrus aurantium* display selective cytotoxicity against breast, liver, lung and prostate human carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 131-138.

- Sehdev, V., Lai, J. C. and Bhushan, A. (2009). Biochanin A modulates cell viability, invasion, and growth promoting signaling pathways in HER-2-positive breast cancer cells. *Journal of Oncology*, 2009.
- Seraj, F., Nourani, S., Mokhber, N. and Shakeri, M. T. (2014). Investigating the effects of aromatherapy with *citrus aurantium* oil on anxiety during the first stage of labor. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*, 17(111), 20-29.
- Sevindik, E., Aydin, A. and Yildirim, E. M. (2018). Chemical compositions and antiproliferative effect of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* flowers in the West Anatolian ecological conditions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4), 1011-1020.
- Shanbhag, S. and Ambinder, R. F. (2018). Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(2), 116-132.
- Shen, C.-Y., Jiang, J.-G., Zhu, W. and Ou-Yang, Q. (2017). Anti-inflammatory effect of essential oil from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(39), 8586-8594.
- Shen, C.-Y., Yang, L., Jiang, J.-G., Zheng, C.-Y. and Zhu, W. (2017). Immune enhancement effects and extraction optimization of polysaccharides from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Food & Function*, 8(2), 796-807.
- Shim, H.-Y., Park, J.-H., Paik, H.-D., Nah, S.-Y., Kim, D. S. and Han, Y. S. (2007). Genistein-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades. *Anti-cancer Drugs*, 18(6), 649-657.
- Shin, S.-C. and Choi, J.-S. (2009). Effects of epigallocatechin gallate on the oral bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *Anti-cancer Drugs*, 20(7), 584-588.
- Siegel, R. L., Giaquinto, A. N. and Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12-49.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7-34.
- Silva, M., Dreveck, S. and Zeni, A. (2009). Ethnobotanical study of medicinal plants used by rural population around the Itajaí National Park. *Indaial*, 10(2), 54-64.
- Simpson, M. G. (2010). Diversity and classification of flowering plants: eudicots. *Plant Systematics (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, 275-448.
- Singh, A. (2017). *Citrus maxima* (burm.) merr. a traditional medicine: its antimicrobial potential and pharmacological update for commercial exploitation in herbal drugs—a review. *International Journal of ChemTech Research*, 10(5), 642-651.
- Singh, A. P., Kandpal, J. B., Sharma, R. K. and Chitme, H. (2021). Nobiletin a biologically active phytoconstituent: Systematic review. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 11(3), 204-211.

- Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J. and Bishayee, A. (2016). *Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms*. Paper presented at the Seminars in Cancer Biology.
- Sp, N., Kang, D. Y., Joung, Y. H., Park, J. H., Kim, W. S., Lee, H. K. and Yang, Y. M. (2017). Nobiletin inhibits angiogenesis by regulating Src/FAK/STAT3-mediated signaling through PXN in ER+ breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 935.
- Stasinopoulos, I., O'Brien, D. R., Wildes, F., Glunde, K. and Bhujwalla, Z. M. (2007). Silencing of cyclooxygenase-2 inhibits metastasis and delays tumor onset of poorly differentiated metastatic breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 5(5), 435-442.
- Stearns, M. E., Amatangelo, M. D., Varma, D., Sell, C. and Goodyear, S. M. (2010). Combination therapy with epigallocatechin-3-gallate and doxorubicin in human prostate tumor modeling studies: inhibition of metastatic tumor growth in severe combined immunodeficiency mice. *The American Journal of Pathology*, 177(6), 3169-3179.
- Stearns, V., Zhou, Q. and Davidson, N. E. (2007). Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy. *Breast Cancer*, 307-318.
- Stefanska, B., Karlic, H., Varga, F., Fabianowska-Majewska, K. and Haslberger, A. (2012). Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components—the implications in cancer prevention. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 279-297.
- Stohs, S. J. (2017). Safety, efficacy, and mechanistic studies regarding *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and p-synephrine. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1463-1474.
- Stohs, S. J., Preuss, H. G. and Shara, M. (2011). The safety of *Citrus aurantium* (bitter orange) and its primary protoalkaloid p-synephrine. *Phytotherapy Research*, 25(10), 1421-1428.
- Stohs, S. J., Preuss, H. G. and Shara, M. (2012). A review of the human clinical studies involving *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and its primary protoalkaloid p-synephrine. *International Journal of Medical Sciences*, 9(7), 527.
- Suffness, M. (1990). Assays related to cancer drug discovery. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, 6, 71-133.
- Sun, S.-Y., Hail Jr, N. and Lotan, R. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(9), 662-672.
- Sun, T., Wang, S., Sun, H., Wen, J., An, G. and Li, J. (2018). Improved survival in multiple myeloma, with a diminishing racial gap and a widening socioeconomic status gap over three decades. *Leukemia & Lymphoma*, 59(1), 49-58.
- Sun, Y., Han, Y., Song, M., Charoensinphon, N., Zheng, J., Qiu, P. and Xiao, H. (2019). Inhibitory effects of nobiletin and its major metabolites on lung tumorigenesis. *Food & Function*, 10(11), 7444-7452.

- Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R. and Rastrelli, L. (2018). An overview on *Citrus aurantium* L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Suzuki, R., Kohno, H., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Yano, M. and Tanaka, T. (2004). *Citrus* nobiletin inhibits azoxymethane-induced large bowel carcinogenesis in rats. *Biofactors*, 21(1-4), 111-114.
- Szewczyk, K. and Bogucka-Kocka, A. (2012). Analytical methods for isolation, separation and identification of selected furanocoumarins in plant material. *A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 10(27495), 57-92.
- Takeshima, M., Ono, M., Higuchi, T., Chen, C., Hara, T. and Nakano, S. (2014). Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Cancer Science*, 105(3), 252-257.
- Tang, M. X., Ogawa, K., Asamoto, M., Chewonarin, T., Suzuki, S., Tanaka, T. and Shirai, T. (2011). Effects of nobiletin on PhIP-induced prostate and colon carcinogenesis in F344 rats. *Nutrition and Cancer*, 63(2), 227-233.
- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z. and Zhao, J. (2015). Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72, 333-338.
- Thakur, V. S., Deb, G., Babcook, M. A. and Gupta, S. (2014). Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. *The AAPS Journal*, 16, 151-163.
- Thomas, L. R., Henson, A., Reed, J. C., Salsbury, F. R. and Thorburn, A. (2004). Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32780-32785.
- Thomson, C. A., Chow, H. S., Wertheim, B. C., Roe, D. J., Stopeck, A., Maskarinec, G. and Strom, M. B. (2017). A randomized, placebo-controlled trial of diindolylmethane for breast cancer biomarker modulation in patients taking tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165, 97-107.
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S. and Lenz, H.-J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation—a target for novel cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40-47.
- Tominaga, Y., Wang, A., Wang, R., Wang, X., Cao, L. and Deng, C. (2007). Genistein inhibits Brca1 mutant tumor growth through activation of DNA damage checkpoints, cell cycle arrest, and mitotic catastrophe. *Cell Death & Differentiation*, 14(3), 472-479.
- Toshiya, K., Testuya, T., Akira, H. and Takuji, T. (2012). Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry*, 2012.
- Trabert, B., Sherman, M. E., Kannan, N. and Stanczyk, F. Z. (2020). Progesterone and breast cancer. *Endocrine Reviews*, 41(2), 320-344.

- Trad, D., Bibani, N., Sabbah, M., Elloumi, H., Gargouri, D., Ouakaa, A. and Kharrat, J. (2017). Known, new and emerging risk factors of hepatocellular carcinoma. *La Presse Médicale*, 46(11), 1000-1007.
- Traore, M., Baldé, M., Diallo, M., Baldé, E., Diané, S., Camara, A. and Keita, S. (2013). Ethnobotanical survey on medicinal plants used by Guinean traditional healers in the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 1145-1153.
- Tsubura, A., Lai, Y.-C., Miki, H., Sasaki, T., Uehara, N., Yuri, T. and Yoshizawa, K. (2011). Animal models of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. *In Vivo*, 25(1), 11-22.
- Uckoo, R. M., Jayaprakasha, G., Vikram, A. and Patil, B. S. (2015). Polymethoxyflavones isolated from the peel of Miaray Mandarin (*Citrus miaray*) have biofilm inhibitory activity in *Vibrio harveyi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(32), 7180-7189.
- Uckoo, R. M., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. (2011). Rapid separation method of polymethoxyflavones from citrus using flash chromatography. *Separation and Purification Technology*, 81(2), 151-158.
- Uesato, S., Yamashita, H., Maeda, R., Hirata, Y., Yamamoto, M., Matsue, S. and Baba, K. (2014). Synergistic antitumor effect of a combination of paclitaxel and carboplatin with nobiletin from *Citrus depressa* on non-small-cell lung cancer cell lines. *Planta Medica*, 452-457.
- Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N. and Dogan, Y. (2009). The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5), 345-367.
- Ullah, M. F. (2008). Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9(1), 1-6.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 237-245.
- Varghese, R. and Dalvi, Y. B. (2021). Natural products as anticancer agents. *Current Drug Targets*, 22(11), 1272-1287.
- Victoria-Montesinos, D., Abellán Ruiz, M. S., Luque Rubia, A. J., Guillén Martínez, D., Pérez-Piñero, S., Sánchez Macarro, M. and López-Román, F. J. (2021). Effectiveness of consumption of a combination of citrus fruit flavonoids and olive leaf polyphenols to reduce oxidation of low-density lipoprotein in treatment-naïve cardiovascular risk subjects: a randomized double-blind controlled study. *Antioxidants*, 10(4), 589.
- Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays in Biochemistry*, 39, 53-71.
- Waks, A. G. and Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- Wang, D. and DuBois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 181-193.

- Wang, H., Oo Khor, T., Shu, L., Su, Z.-Y., Fuentes, F., Lee, J.-H. and Tony Kong, A.-N. (2012). Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(10), 1281-1305.
- Wang, J., Duan, Y., Zhi, D., Li, G., Wang, L., Zhang, H. and Liu, Q. (2014). Pro-apoptotic effects of the novel tangeretin derivate 5-acetyl-6, 7, 8, 4'-tetramethylnortangeretin on MCF-7 breast cancer cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70, 1255-1263.
- Wang, J., Gao, J., Xu, H.-l., Qian, Y., Xie, L., Yu, H. and Qian, B.-y. (2021). Citrus fruit intake and lung cancer risk: A meta-analysis of observational studies. *Pharmacological Research*, 166, 105430.
- Wang, J. G., Jian, W. J., Li, Y. and Zhang, J. (2021). Nobiletin promotes the pyroptosis of breast cancer via regulation of miR-200b/JAZF1 axis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 37(7), 572-582.
- Wang, R.-H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H.-S., Cao, L., Xiao, C. and Chilton, B. (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, 14(4), 312-323.
- Wang, S., Song, R., Sun, T., Hou, B., Hong, G., Mallampati, S. and Zhang, H. (2017). Survival changes in patients with synovial sarcoma, 1983-2012. *Journal of Cancer*, 8(10), 1759.
- Wang, S., Sun, H., Xie, Z., Li, J., Hong, G., Li, D. and Zhang, H. (2016). Improved survival of patients with hepatocellular carcinoma and disparities by age, race, and socioeconomic status by decade, 1983–2012. *Oncotarget*, 7(37), 59820.
- Wang, S., Tang, J., Sun, T., Zheng, X., Li, J., Sun, H. and Cheng, Z. (2017). Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Scientific Reports*, 7(1), 1339.
- Wang, X., Ji, S., Ma, Y., Xing, X., Zhou, Y., Xu, X. and Wang, X. (2020). Vimentin plays an important role in the promotion of breast cancer cell migration and invasion by leucine aminopeptidase 3. *Cytotechnology*, 72, 639-647.
- Wang, Y., Gho, W. M., Chan, F. L., Chen, S. and Leung, L. K. (2008). The red clover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *British Journal of Nutrition*, 99(2), 303-310.
- Wang, Y., Lee, K. W., Chan, F. L., Chen, S. and Leung, L. K. (2006). The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicological Sciences*, 92(1), 71-77.
- Wang, Y., Qian, J., Cao, J., Wang, D., Liu, C., Yang, R. and Sun, C. (2017). Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 citrus (*Citrus reticulata* Blanco) varieties. *Molecules*, 22(7), 1114.
- Wang, Y., Xie, J., Ai, Z. and Su, J. (2019). Nobiletin-loaded micelles reduce ovariectomy-induced bone loss by suppressing osteoclastogenesis. *International Journal of Nanomedicine*, 7839-7849.

- Wani, R. J., Sharma, P., Zhong, H. A. and Chauhan, H. (2020). Preparation and characterization of griseofulvin solid dispersions. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 18(3), 109-118.
- Wei, D., Zhang, G., Zhu, Z., Zheng, Y., Yan, F., Pan, C. and Meng, P. (2019). Nobiletin inhibits cell viability via the SRC/AKT/STAT3/YY1AP1 pathway in human renal carcinoma cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 690.
- Wen, L., He, M., Yin, C., Jiang, Y., Luo, D. and Yang, B. (2021). Phenolics in *Citrus aurantium* fruit identified by UHPLC-MS/MS and their bioactivities. *LWT*, 147, 111671.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H. and Fitzgibbons, P. (2014). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 138(2), 241-256.
- Wu, X., Song, M., Gao, Z., Sun, Y., Wang, M., Li, F. and Xiao, H. (2017). Nobiletin and its colonic metabolites suppress colitis-associated colon carcinogenesis by down-regulating iNOS, inducing antioxidative enzymes and arresting cell cycle progression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, 17-25.
- Wu, Y., Cheng, C.-s., Li, Q., Chen, J.-x., Lv, L.-l., Xu, J.-y. and Zheng, L. (2021). The application of *Citrus folium* in breast cancer and the mechanism of its main component nobiletin: a systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021(1), 2847466.
- Wu, Y., Li, Q., Lv, L.-l., Chen, J.-x., Ying, H.-f., Ruan, M. and Zhang, K.-y. (2023). Nobiletin inhibits breast cancer cell migration and invasion by suppressing the IL-6-induced ERK-STAT and JNK-c-JUN pathways. *Phytomedicine*, 110, 154610.
- Xie, Q., Bai, Q., Zou, L. Y., Zhang, Q. Y., Zhou, Y., Chang, H. and Mi, M. T. (2014). Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(5), 422-431.
- Xu, G., Feng, L., Song, P., Xu, F., Li, A., Wang, Y. and Wu, X. (2016). Isomeranzin suppresses inflammation by inhibiting M1 macrophage polarization through the NF- κ B and ERK pathway. *International Immunopharmacology*, 38, 175-185.
- Xu, G., Ye, X., Chen, J. and Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 330-335.
- Yan, Y., Zhou, H., Wu, C., Feng, X., Han, C., Chen, H. and Li, Y. (2021). Ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of synephrine, naringin, and neohesperidin from *Citrus aurantium* L. fruitlets. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(8), 780-791.

- Yang, G., Li, S., Yang, Y., Yuan, L., Wang, P., Zhao, H. and Lin, C.-C. (2018). Nobiletin and 5-hydroxy-6, 7, 8, 3', 4'-pentamethoxyflavone ameliorate 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced psoriasis-like mouse skin lesions by regulating the expression of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen and the differentiation of CD4⁺ T cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(31), 8299-8306.
- Yang, J., Cao, Y., Sun, J. and Zhang, Y. (2010). Curcumin reduces the expression of Bcl-2 by upregulating miR-15a and miR-16 in MCF-7 cells. *Medical Oncology*, 27, 1114-1118.
- Yang, S.-C., Hillinger, S., Riedl, K., Zhang, L., Zhu, L., Huang, M. and Batra, R. K. (2004). Intratumoral administration of dendritic cells overexpressing CCL21 generates systemic antitumor responses and confers tumor immunity. *Clinical Cancer Research*, 10(8), 2891-2901.
- Yang, S., Zhou, Q. and Yang, X. (2007). Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(6), 903-911.
- Yao, Y., Brodie, A. M., Davidson, N. E., Kensler, T. W. and Zhou, Q. (2010). Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124, 585-591.
- Yao, Y. and Zhou, Q. (2010). A novel antiestrogen agent Shikonin inhibits estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121, 233-240.
- Yarim, G. F., Yarim, M., Sozmen, M., Gokceoglu, A., Ertekin, A., Kabak, Y. B. and Karaca, E. (2022). Nobiletin attenuates inflammation via modulating proinflammatory and antiinflammatory cytokine expressions in an autoimmune encephalomyelitis mouse model. *Fitoterapia*, 156, 105099.
- Yarla, N. S., Bishayee, A., Sethi, G., Reddanna, P., Kalle, A. M., Dhananjaya, B. L. and Duddukuri, G. R. (2016). *Targeting arachidonic acid pathway by natural products for cancer prevention and therapy*. Paper presented at the Seminars in Cancer Biology.
- You, Q., Fang, T., Yin, X., Wang, Y., Yang, Y., Zhang, L. and Xue, Y. (2021). Serum CD4 is associated with the infiltration of CD4⁺ T cells in the tumor microenvironment of gastric cancer. *Journal of Immunology Research*, 2021(1), 6539702.
- Yuan, L., Cai, Y., Zhang, L., Liu, S., Li, P. and Li, X. (2022). Promoting apoptosis, a promising way to treat breast cancer with natural products: A comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 801662.
- Zhang, C.-H., Wang, J., Zhang, L.-X., Lu, Y.-H., Ji, T.-H., Xu, L. and Ling, L.-J. (2017). Shikonin reduces tamoxifen resistance through long non-coding RNA uc. 57. *Oncotarget*, 8(51), 88658.
- Zhang, G., Wang, Y., Zhang, Y., Wan, X., Li, J., Liu, K. and Yu, P. (2012). Anti-cancer activities of tea epigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy. *Current Molecular Medicine*, 12(2), 163-176.

- Zhang, H., Lv, P., Xiao, Z., Jothi, E. A. and Yang, J. (2020). Nobiletin attenuates cell proliferation by modulating the activating protein-1 signaling pathway in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 39(1).
- Zhang, J., Sun, C., Yan, Y., Chen, Q., Luo, F., Zhu, X. and Chen, K. (2012). Purification of naringin and neohesperidin from Huyou (*Citrus changshanensis*) fruit and their effects on glucose consumption in human HepG2 cells. *Food Chemistry*, 135(3), 1471-1478.
- Zhang, L., Zhao, H., Zhang, X., Chen, L., Zhao, X., Bai, X. and Zhang, J. (2013). Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. *Brain Research Bulletin*, 96, 45-53.
- Zhang, M., Jing, L., Wu, Q., Zhu, K., Ke, F., Xu, J. and Zhang, C. (2019). Metabolite profile comparison of a graft chimera 'Hongrou Huyou' (*Citrus changshan-huyou*+ *Citrus unshiu*) and its two donor plants. *BMC Plant Biology*, 19, 1-12.
- Zhang, Y., Qian, R.-Q. and Li, P.-P. (2009). Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, down-regulates the expression of steroid sulfatase genes in breast cancer cells. *Cancer Letters*, 284(1), 47-54.
- Zhao, H.-Y., Yang, L., Wei, J., Huang, M. and Jiang, J.-G. (2012). Bioactivity evaluations of ingredients extracted from the flowers of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Food Chemistry*, 135(4), 2175-2181.
- Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Xu, D.-P., Li, S. and Li, H.-B. (2016). Spices for prevention and treatment of cancers. *Nutrients*, 8(8), 495.
- Zhou, X., Wang, W., Ma, X., Xu, E. and Liu, D. (2021). Ultrasonication of Thawed Huyou Juice: Effects on cloud stability, physicochemical properties and bioactive compounds. *Foods*, 10(8), 1695.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.-P., Li, S., Chen, Y.-M. and Li, H.-B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515.



EK-1. Etik Kurul

Evrak Tarih ve Sayısı: 06.07.2020-E.70635



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
 Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. İpek SÜNTAR
Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu İpek SÜNTAR, Mürşide Ayşe DEMİREL, Esra EMERCE, Perihan GÜRBÜZ, Songül ÇERİBAŞI, Ömer Faruk YAKINCI'dan oluşan G.Ü.ET-20.030 kod numaralı ve "*Bazı Citrus L. Türlerinin Meme Tümörü Üzerindeki İn vitro ve İn vivo Etkilerinin Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-20.030 and entitled "*Evaluation of in vitro and in vivo effects of some Citrus L. species on mammary tumorigenesis*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards,

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Sıçan Sprague Dawley
 Hayvan Sayısı : 62

Ek: 1 Liste

EK -1. (devam) Etik Kurul

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :26/06/2020	TOPLANTI SAYISI : 04
ADI-SOYADI	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Soyadı, adı : YAKINCI, Ömer Faruk
Uyruğu : T.C.

Eğitim:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
Y. Lisans	Yeditepe Üniversitesi, Fitoterapi	
Lisans	Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018-Halen	Ulusal Zehir Danışma Merkezi	Danışman
2017-2018	Malatya Yeşilyurt Devlet Hastanesi	Eczacı
2015-2017	Maltepe Üniversitesi	Öğretim Görevlisi
2014-2015	Yeditepe Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yayınlar

- Karakaya, S., Süntar, I., Yakinci, O. F., Sytar, O., Ceribasi, S., Dursunoglu, B. and Guvenalp, Z. (2020). *In vivo* bioactivity assessment on *Epilobium* species: A particular focus on *Epilobium angustifolium* and its components on enzymes connected with the healing process. *Journal of Ethnopharmacology*, 262, 113207.
- Karakaya, S., Suntar, I., Aydın, B., Dursunoglu, B., Gözcu, S., Senol, O. and Kadioglu, Y. (2022). Evaluation of anticholinesterase effect of some *Epilobium* species and quantification of hyperoside by HPLC. *Natural Product Research*, 36(5), 1296-1299.
- Yakıncı, Ö. F. and Süntar, İ. (2023). Most Known *Citrus* L. Species and Breast Cancer Relationship. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute*, 6(1), 36-51.

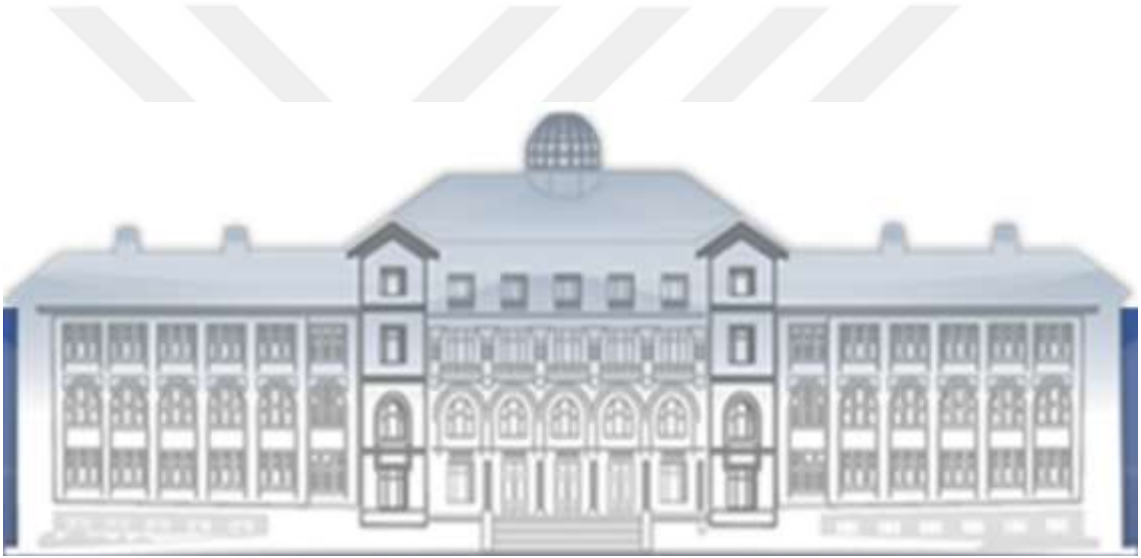
Kitap Bölümleri (Uluslararası)

Süntar, I. and Yakıncı, Ö. F. (2020). Potential risks of phytonutrients associated with high-dose or long-term use. In *Phytonutrients in Food* (pp. 137-155). Woodhead Publishing.

Yakıncı, Ö. and Süntar, I. (2019). Antioxidant Effects of Vitamin A, S.M. Nabavi, I. Sunter, D. Barreca, H. Khan (Eds), *Phytonutrients in Food: From Traditional to Rational Usage*, Woodhead Publishing, 45-52.

Yakıncı, Ö. F. and Süntar, I. (2022). Vitamin A. In *Antioxidants Effects in Health* (pp. 527-534). New York: Elsevier.





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

