



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KUŞBURNU ÇAYINDA BULUNAN
FLAVONOLLERİN PROSTAT KANSER HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Doktora Tezi

Ramin ASLAMİNABAD

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**İzmir
2020**

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KUŞBURNU ÇAYINDA BULUNAN
FLAVONOLLERİN PROSTAT KANSER HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Ramin ASLAMİNABAD

Danışman
Doç. Dr. Ali Mert ÖZGÖNÜL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Programı

İzmir
2020

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç.Dr.Ali Mert ÖZGÖNÜL

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Eser Yıldırım SÖZMEN

Üye : Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN

Üye : Prof. Dr. Nevbahar TURGAN

Üye : Prof. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 25.04.2018

Önsöz

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve birikimini benimle paylaşan ve benden desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Ali Mert ÖZGÖNÜL'e, çalışmalarımı izleyerek yol gösteren tez izleme komitesindeki hocalarım E. Ü. Tıp Fakültesi Biyoloji A. D. Başkanı sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ ve her anlamda desteğini esirgemeyen, gelişmemi sağlayan saygı değer hocam sayın Prof. Dr. Eser Y. SÖZMEN'e, çalışmalarımı destekleyen ve gerektiği zaman bana anne sıcaklığını hissettirerek katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Nevbahar TURGAN'a, zorlu süreçte her zaman yanımda olup ve benden desteklerini esirgemeyen E. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya A. D. Başkanı sayın Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN'a, çalışmalarım ve her konuda desteğini hissettiğim çalışma arkadaşım doktora öğrencisi Burak DURMAZ'a tez çalışmalarım sırasında maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğüne, tez çalışmalarım destek sağlayan E.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya A. D. ve E. Ü. Tıp Fakültesi Biyoloji A. D.'ye teşekkür ederim. Bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalının tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Son olarak hayatımda oldukları ve beni hiç yalnız bırakmadıkları için başta çok sevgili eşim Zahra MOUSAVİ, aileme ve tez çalışmalarım esnasında doğarak hayatıma anlam katan çok sevgili oğlum Barad'a teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından TDK-2018-20019 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İzmir, 7.07.2020

Ramin ASLAMİNABAD

Özet

Kuşburnu Çayında Bulunan Flavonoidlerin Prostat Kanseri Hücre Kültürlerinde Apoptoz Üzerine Etkisi

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, doğal kaynak olan fenolik bileşiklerin (Kuarsetin, Kamferol, Ellajik asit, Mirisetin) prostat kanseri tedavisinde ve kemoprevansında kullanılması önerilmiştir. Kuşburnu bu fenolik molekülleri yüksek konsantrasyonda içerdiğinden, kuşburnu çayının olası antiproliferatif ve apoptotik etkisini prostat kanseri hücre hattında araştırmayı amaçladık.

Kuşburnu çayının farklı sıcaklık ve zaman aralığında hazırlanmış örneklerinin flavonol içeriğini belirledik, daha sonra hazırlanan çayların antiproliferatif etkisi, prostat kanseri hücre hattına çay örnekleri eklenerek belirlendi (VCaP and LNCaP).

Çayların fenolik bileşik içeriği, LC-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edildi. Hücre kültürü çalışması için en yüksek kuarsetin, ellajik asit, mirisetin ve kamferol seviyelerine sahip, 7 dakika kaynamış meyve, 7 dakika kaynamış ticari meyve, 5 dakika parçalanmış ve kaynamış meyve, 3 dakika demlenmiş ticari meyve ekstraktları seçildi. Çay örnekleri, IC50 değerlerine uygun konsantrasyonda hazırlandı, VCaP ve LNCaP hücre hattında çalışıldı. Kuarsetin, LNCaP hücresinde VCaP hücresine göre daha etkili olduğu belirlendi. Kuşburnu çaylarının VCaP hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi, LNCaP hücrelerinden biraz daha güçlü etkiye sahip olduğu belirlendi. Elde edilen çaylarda en yüksek miktarda farklı fenolik maddeye sahip olan çay ekstraktlarından elde edilen flavonollerden, Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit ELISA kiti metodu kullanılarak prostat kanseri hücre hattı üzerinde Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, TRAIL, APAF-1 ölçümleri ile VCaP ve LNCaP hücrelerindeki apoptotik etkisi incelenmiştir. AnnexinV-FITC seviyeleri Flow Sitometri yöntemi ile belirlendi.

Verilerimiz kuşburnu çayındaki flavonollerin, prostat kanseri tedavisinde önerilebilir doğal bir kaynak olduğunu açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, ekstrakte edilmiş fenolik molekül miktarı, hazırlama tekniklerine bağlı olarak değişmektedir, flavonollerin en yüksek konsantrasyonunu elde etmek için en uygun koşulların belirlenmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, kuşburnu, kuarsetin, ellajik asit, kamferol, mirisetin

Abstract

The Effect of Rosehip Tea Flavonoids on Apoptosis in Prostate Cancer Cell Culture

Recently, phenolic compounds as natural sources have been (Quercetin, Kaempferol, Ellagic acid and Myricetin) suggested to use in treatment and chemoprevention of prostate cancer. Since rosehip includes these molecules in high concentration, we aimed to investigate the possible anti-proliferative and apoptotic effect of rosehip tea on the prostate cancer cell line.

The phenolic compound content of the teas was analyzed using the LC-MS / MS system. For the cell culture study, 7 minutes brewed fruit, 7 minutes brewed commercial fruit, 5 minutes brewed and shredded fruit, 3 minutes brewed commercial fruit extracts were selected with the highest quercetin, ellagic acid, myricetin and kaempferol levels. The tea samples were prepared in relevant concentration to their IC50 values and then added into VCaP and LNCaP cell line. Quercetin was more effective in LNCaP cell than VCaP cell. The antiproliferative effect of rosehip teas on VCaP cells was slightly stronger than LNCaP cells. The tea extracts obtained from flavonols, quercetin, Myricetin, Kaempferol, Ellagic acid which have the highest amount of different phenolic substances in the obtained teas have two different VCaP and LNCaP apoptotic effects on prostate cancer cell line by using ELISA kit method by assessing Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, TRAIL, APAF-1 levels. AnnexinV-FITC levels were determined by Flow cytometry method.

Our data clearly indicated that rosehip tea as a natural source of flavonols might be proposed in treatment of prostate cancer. However, the extracted amount of phenolic molecules is attributed with preparation techniques, so it is suggested to determine the optimum conditions and achieve highest concentration of flavonols.

Keywords: Prostate cancer, rose hip, quercetin, ellagic acid, kaempferol, myricetin

İçindekiler

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri.....	I
Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	IV
Tablolar Dizini.....	VII
Şekiller Dizini	VIII
Kısaltma Listesi	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Araştırmanın Problemi	1
1.2. Araştırmanın Sorusu.....	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	3
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Apoptoz	5
2.1.1. Apoptotik Proteinler	5
2.1.2. Apoptotik Yol.....	7
2.2. Fitokimyasallar ve Sınıflandırılması	10
2.2.1. Flavonoidler	11
2.3. Biyoyararlanım.....	16
3. Gereç ve Yöntem	20
3.1. Kuşburnu çayı eldesi	20

3.1.1. İnfüzyon yöntemi	20
3.1.2. Kaynatma yöntemi	22
3.2. Kuşburnu çayı ekstraktlarında yapılacak Analizler.....	22
3.2.1. Fenol bileşiklerin miktarının belirlenmesi LC MS / MS Analizleri	22
3.3. Hücre kültüründe gerçekleştirilmiş analizler	24
3.3.1. Sitotoksosite ve hücre canlılığı analizi (toksik doz belirlenmesi).....	24
3.3.2. Hücre kültüründe apopitoz üzerine etkinin belirlenmesi	25
3.4. İstatistiksel analiz	27
4. Bulgular.....	28
4.1. LC MS / MS Sonuçları.....	28
4.2. Fenolik bileşiklerin VCaP ve LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	33
4.3. Kuşburnu çaylarının büyüme inhibisyon etkileri	40
4.4. Apopitozun belirlenmesi için kullanılan AnnexinV-FITC Analiz Sonuçları.....	43
4.4.1. LNCaP AnnexinV-FITC Analiz Sonuçları	43
4.4.2. VCaP AnnexinV-FITC Analiz Sonuçları.....	50
4.5. Apopitozun belirlenmesi için kullanılan ELISA kit sonuçları	56
5. Tartışma	68
6. Sonuç ve Öneriler	76
7. Kaynaklar	77
Teşekkür	86
Özgeçmiş	87

Tablolar Dizini

Tablo 1.	Lineer gradyanı gösteren elüsyon tablosu.	23
Tablo 2.	Çalışılan fenolik bileşik standartlarının MRM değerleri.....	24
Tablo 3.	Kuşburnu çaylarında fenolik moleküllerin (ng / mL) içeriği	31
Tablo 4.	VCaP hücre kültüründeki fenolik bileşikler için IC ₅₀ değerleri.	33
Tablo 5.	LNCaP hücre kültüründeki fenolik bileşikler için IC ₅₀ değerleri	33
Tablo 6.	Hücre hattına (µmol / L) eklenen çay örneklerinin flavonol konsantrasyonu.....	34
Tablo 7.	24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	43
Tablo 8.	48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	46
Tablo 9.	72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	47
Tablo 10.	Apoptotik Kat Değişimi.	48
Tablo 11.	24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	50
Tablo 12.	48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	52
Tablo 13.	72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	53
Tablo 14.	Apoptotik Kat Değişimi	54

Şekiller Dizini

Şekil 1.	Kanser hücre ayırımının gösterimi.....	4
Şekil 2.A.	Kaspazların sınıflandırılması	5
Şekil 2.B	Apoptotik proteinlerin apoptozdaki işlevlerine göre sınıflandırılması	6
Şekil 3.	İçsel, dışsal, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum apoptotik yolların gösterimi.....	8
Şekil 4.	Fitokimyasalların sınıflandırılması.....	11
Şekil 5.	Flavonoidlerin yapısal farklılıklara bağlı olarak altı sınıfa sınıflandırılması	12
Şekil 6.	Flavonollerin sınıflandırılması ve yapısı.	13
Şekil 7.	Kuşburnu çaylarında fenolik moleküllerin (ng / mL) içeriği.....	30
Şekil 8.	Fenolik bileşiklerin VCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi.	35
Şekil 9.A.	Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi	36
Şekil 9.B.	Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi	37
Şekil 9.C.	Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi	38
Şekil 9.D.	Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi.	39
Şekil 10.	Eğim (1 / h), kuşburnu çayı muamelesinden sonra (24 saat) VCaP hücreler için hücre endeksinin değişim oranını	41
Şekil 11.	Eğim (1/ h), kuşburnu çayı muamelesinden sonra (24 saat) Lncap hücreler için hücre endeksinin değişim oranını	42
Şekil 12.	24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri.....	45
Şekil 13.	48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri.....	46
Şekil 14.	72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri.....	47
Şekil 15.	LNCaP hücrelerinde fenolik bileşiklerin ve kuşburnu çay uygulamalarının kontrol grubuna göre Apoptotik kat değişimleri	49
Şekil 16.	24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri.....	51
Şekil 17.	48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri.....	52

Şekil 18.	72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri	53
Şekil 19.	VCaP hücrelerinde fenolik bileşiklerin ve kuşburnu çay uygulamalarının kontrol grubuna göre Apoptotik kat değişimleri	55
Şekil 20.A.	Apoptotik LNCaP değişiminin TRAIL ile gösterimi	56
Şekil 20.B.	Apoptotik VCaP değişiminin TRAIL ile gösterimi	57
Şekil 20.C.	Apoptotik LNCaP değişiminin Apaf-1 ile gösterimi	58
Şekil 20.D.	Apoptotik VCaP değişiminin Apaf-1 ile gösterimi	59
Şekil 20.E.	Apoptotik LNCaP değişiminin Sitokrom-C ile gösterimi	60
Şekil 20.F.	Apoptotik VCaP değişiminin Sitokrom-C ile gösterimi	61
Şekil 20.G.	Apoptotik LNCaP değişiminin Kaspaz-3 ile gösterimi	62
Şekil 20.H.	Apoptotik VCaP değişiminin Kaspaz-3 ile gösterimi	63
Şekil 20.I.	Apoptotik LNCaP değişiminin Kaspaz-8 ile gösterimi	64
Şekil 20.J.	Apoptotik VCaP değişiminin Kaspaz-8 ile gösterimi	65
Şekil 20.K.	Apoptotik LNCaP değişiminin Kaspaz-9 ile gösterimi	66
Şekil 20.L.	Apoptotik VCaP değişiminin Kaspaz-9 ile gösterimi	67

Kisaltma Listesi

$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
5-FU	5-Fluorourasil
AIF	Apopitoz İndükleyici Faktör
Akt	Protein Kinaz B
AMPK	Adenozin Monofosfatla Aktive Edilen Protein Kinaz
APAF-1	Apopitoz Proteaz Aktive edici Faktör 1
BAD	Bcl-2 İlişkili Ölüm Organizatör
Bak	Bcl-2 Antagonisti ve Katili
Bax	Bcl-2 İlişkili X Protein
Bcl-2	B Hücreli Lenfoma 2 Proteinleri
Bcl-xL	B Hücreli Lenfoma-Ekstra Büyük
BH3	Bcl-2 Homoloji 3
Bim	Bcl-2-Benzeri Protein 11
KIB	Baculoviral IAP Tekrar Alanlar
CAT	Katalaz
c-Ayaklı	Kaspaz FLICE Benzeri İnhibitör Protein
CHOP	C/EBP Homolog Protein
c-IAP	Apopitosis Proteininin Hücrel İnhibitörü
Cox-2	Siklooksijenaz 2
DISC	Ölüm Nedenli Sinyal Kompleksi
DR	Ölüm reseptörü

EGCG	Epigallokatekin galat
EndoG	Endonükleaz G
ER	Endoplazmik retikulum
ESC	Özofagus Skuamöz Karsinomu
FADD	Fas ile İlişkili Proteinli Ölüm
FasL	Fas Ligand
GPx	Glutasyon peroksidazı
CTP	Glikoz İlgili Protein
GSH	Glutasyon
HCC	Hepatosellüler kanser
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
Her2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü
HSP	Isı Şoku Protein
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinazı
Mcl-1	Miyeloid Hücre Lösemi 1
MDR	Çok İlaç Direnci
MMP	Matris Metalloproteinaz
MOMP	Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği
mTOR	Rapamisininin memeli hedefi
NAC	N Asetil Sistein
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa Beta Yolu
N-IAP	Nöronal Apoptoz İnhibitör Protein

NSLC	Küçük Akciğer Dışı Karsinom
Omi / HtrA2	Sıcaklık Gereksinimi Protein A2
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PUMA	P53-Yukarı Regüle Apoptozis Modülatör
BİK	Renal Hücreli Karsinom
ROS	Reaktif oksijen türleri
Smak / DIABLO	Düşük İzoelektrik Noktalı Kasapaz / Apoptoz Bağlama Direkt İnhibitörünün İkinci Mitokondrial Türetilmiş Aktivatörü
SOD	Süper Oksit Dismutaz
t-Motion	Kesik-Teklif
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRADD	TNF-İlişkili Apoptoz-Endükleyen Ligand
TRIAL	TNFRSF1A ile İlişkili Ölüm Etki Alanı
uPA	Ürokinaz Plazminojen
SSVD	Gerilim bağımlı anyon kanalı
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
X-IAP	X Bağlantılı Apoptoz İnhibitörü

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PC), 50 yaş üstü erkeklerde en sık görülen kanserdir. Prostat kanseri, küçük bir lezyondan klinik bulgulara gelişen kronik bir hastalıktır. Hastalık metastatik hale geldiğinde, hasta prognozu zayıftır. Bu sebepten dolayı, PC ile mücadele için yeni stratejilerin geliştirilmesi önemli bir terapötik amaç haline gelmiştir. Meyve ve sebzeler bakımından zengin bir diyetin kanser riskini azalttığı ve kanser önlemede yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, tümörler çok çeşitli sitotoksik ilaçlara dirençli hale geldiğinden, kanser kontrolüne yeni ve alternatif bir yaklaşım olarak, doğal bileşiklerle yapılan tedavi yöntemine odaklanılmıştır. Çeşitli doğal antioksidanların, özellikle de polifenollerin, hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda kemoterapötik etkileri gösterilmiştir.

1.7. Araştırmanın Problemi

Prostat kanseri hücrelerin proliferasyonu ve canlılığı, flavanoller (Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol ve Ellajik asid) tarafından inhibe edilir. Ayrıca bu flavanoller prostat kanser hücre apoptozunun gelişmesine sebep olur. Yaptığımız çalışmada fenol içeriğine sahip kuşburnu çaylarının fenol bileşikleri yönünden içeriği belirlendikten sonra kuşburnu çaylarının farklı kaynama, demleme yöntemleri kullanarak en yüksek flavanol bileşiği içeren en uygun yöntemi belirlemektir. Daha sonra seçilen kuşburnu çayları ve etken flavanol bileşiklerinin ayrı ayrı iki farklı prostat kanseri hücresi üzerine antiproliferatif ve Apoptotik etkisine bakılacaktır. Bu sayede prostat kanseri tedavisinde koruyucu veya önleyici bir doğal bileşiğin varlığında bu problemlere çözüm bulunmaya çalışılmıştır.

1.8. Araştırmanın Sorusu

Kuşburnu çayı sahip olduğu fenolik bileşikleri Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asid içeriği açısından değerlendirildiğinde LNCaP ve VCaP prostat kanser hücre hatlarında antiproliferatif ve apoptotik bir etki gösterir mi? Bu sebeple prostat kanseri önlemede ve korumada doğal bir bileşik olabilir mi?

1.9. Araştırmanın Hipotezleri

Kuşburnu ayının sulu ekstraktları diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre sağlık açısından daha güvenli ve kullanılabilir. Bu çalışmada kullanılan yöntem, diğer çay çalışmalarından farklı olarak hem demleme hem de kaynatma yöntemleri ile ekstraktlar hazırlanmış olması ve 1-10 dakika arasındaki farklı zaman aralıklarında ekstrakta geçen Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit miktarını belirlenmek için kullanılan en uygun yöntemdir. Özellikle artan zaman periyotlarında elde edeceğimiz çay ekstraktları ile süre optimizasyonu yapılmış kuşburnu bitkisinin ekstraksiyonlarının iki farklı LNCaP ve VCaP prostat hücre hattında apoptotik özelliklerini belirlemek ve iki hücre arasındaki farklılıkları değerlendirebilmek açısından literatürdeki bir boşluğu dolduracaktır. Özellikle biyolojik aktiviteleri ile bilinen Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit kuşburnu bitkisi ayı içerisindeki miktarı ve kaç dakikada maksimum düzeyde olduğu araştırılmıştır. Bunun yanında Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit tek başına göstereceği etki ile Kuşburnu Bitkisi ayı içerisinde göstereceği etki karşılaştırılarak, Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit çay içerisindeki etkinliği de ortaya çıkarılmış olacaktır.

1.10. Araştırmanın Varsayımları

Kuşburnu ayında bulunan flavonoidler kanser tedavisinde önemli yer tutmaktadır. Prostat Kanseri Hücre Kültürlerinde bu çayların tedavi edici etkisi bulunabilir.

1.11. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bitkilerin demleme/kaynama süreleri sonunda ekstraksiyonunun etkin bir biçimde yapılıp yapılmaması bir sınırlılık oluşturmaktadır. Araştırma in vitro hücre kültüründe yapılacağı için in vivo şartlarda aynı etkiyi göstermesi beklenmemekle birlikte in vivo ortamda diğer koşulların etkisi bilinmemektedir.

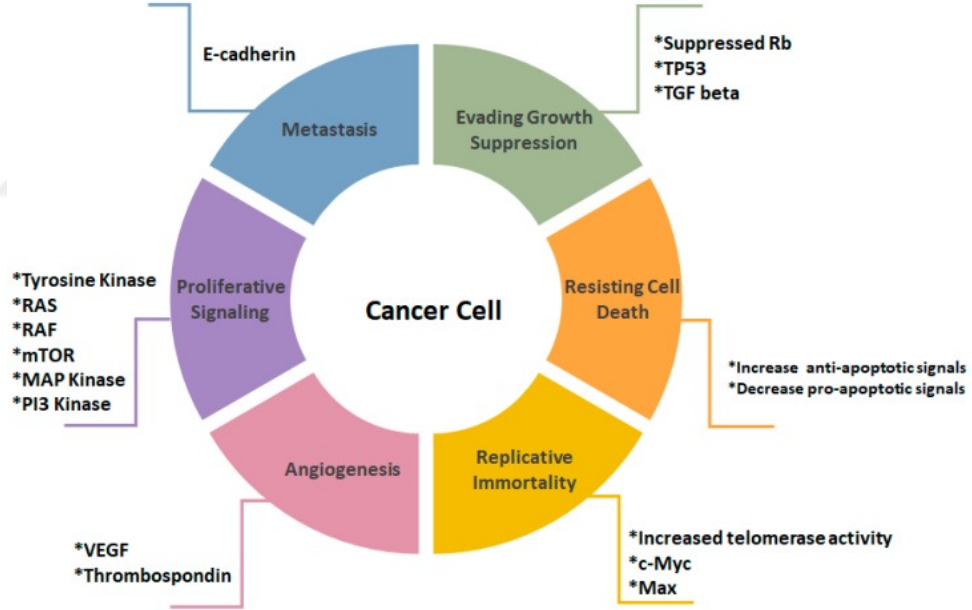
1.12. Araştırmanın Amacı

Bu tezin amacı, ülkemizde doğal olarak bulunan ve sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmakta olan doğal kuşburnu bitkisinden farklı demleme/kaynama sürelerinde elde edilen ayların Flavanol içeriğini belirlemek ve en yüksek Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit içeren kuşburnu ayı ekstraktlarının, VCaP ve LNCaP prostat kanser hücresinde olası yararlı etkisini araştırmak için sitotoksik dozları belirlendikten sonra apoptozis üzerine etkileri araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

Kanser, hücrel homeostaz ve fonksiyonun geri dönüşümsüz bozulması ile tetiklenen heterojen bir hastalıktır. Kanser ilerlemesi, neoplastik hücre popülasyonunda büyük bir genişlemeye yol açan Apoptotik fonksiyonların kaybı ile birlikte kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşmasının bir sonucudur (Igney & Krammer, 2002; Safarzadeh, Sandoghchian Shotorbani, & Baradaran, 2014). Hücre içi kanser nedenleri Apoptotik fonksiyon eksikliği, genetik mutasyonlar, oksidatif stres ve hipoksiye bağlanabilirken, dış kanser nedenleri ultraviyole ışınlarına, radyasyona, kirlenmeye, sigara içmeye ve strese aşırı maruz kalmaya bağlı olabilir (Prakash, Kumar, Kumar, & Ajeet, 2013). Tümör oluşumuna katkıda bulunan ve kanser hücrelerini normal sağlıklı olanlardan ayıran altı özellik vardır (Şekil1) (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).



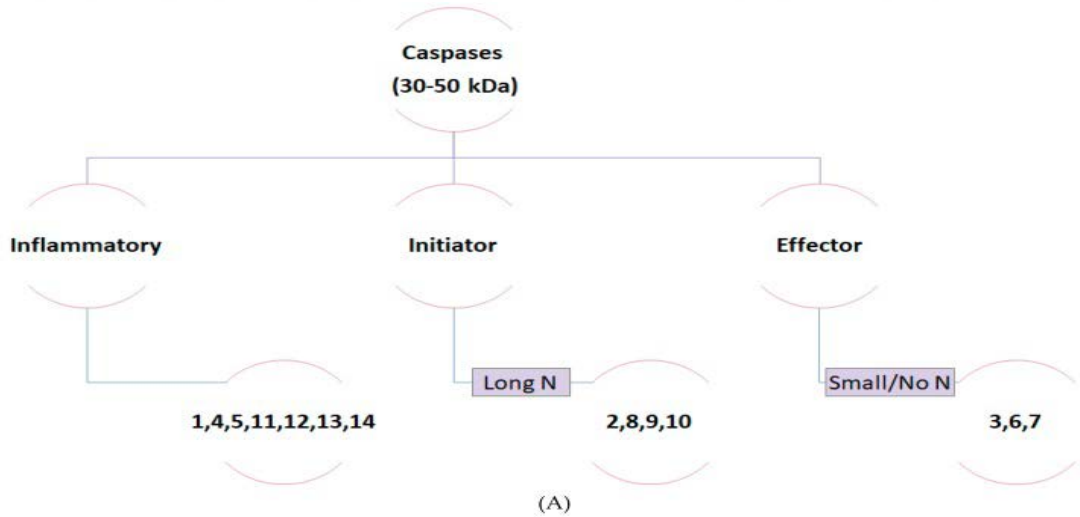
Şekil 1. Kanser hücre ayrımının gösterimi. Büyüme baskılamasının kaçmasına Rb, TP 53 ve TGF beta inhibisyonu aracılık eder. Hücre ölümündeki direnç, anti-apoptotikteki artış ve proapoptotik faktörlerdeki azalma ile ifade edilir. Replikatif ölümsüzlük, telomeraz aktivitesinde, c-Myc ve Max. Anjiyogenez, VEGF ve trombospondinin artması nedeniyle desteklenir. Proliferatif artışın artması, artan tirozin kinaz aktivitesi, Ras, Raf, m-TOR, MAP kinaz ve PI3-kinaz ile vurgulanır. Metastaz oluşumu, E-kadherin kaybı ile belgindir.

2.1. Apoptoz

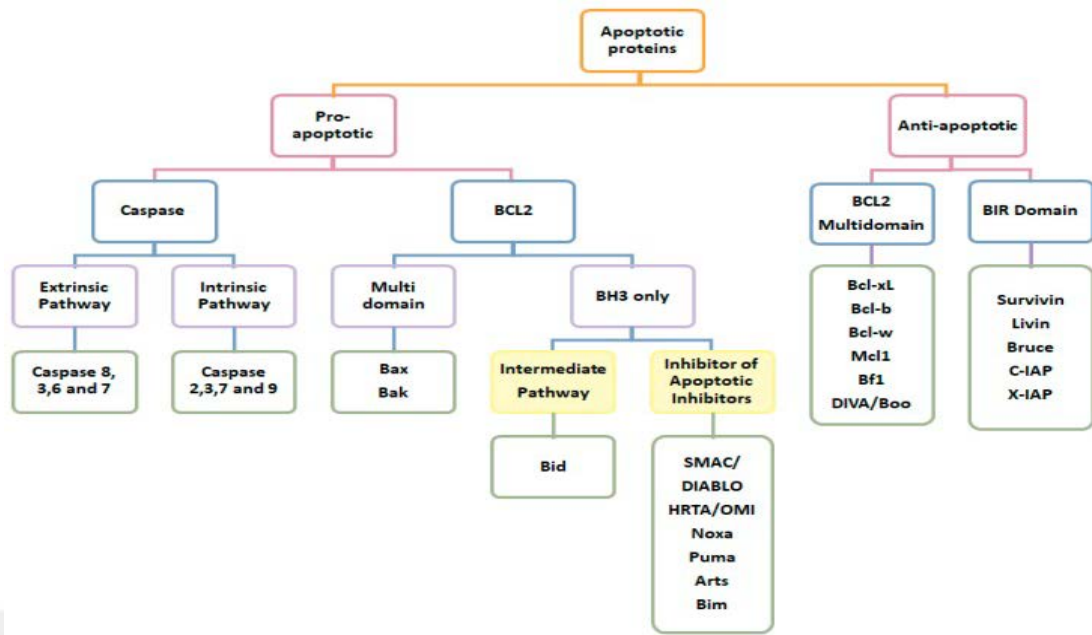
Apoptozis, bir dizi sinyal iletimi kaskadları ve hücrel proteinler tarafından düzenlenen sıkı düzenlenmiş bir süreçtir (Fan, Han, Cong, & Liang, 2005). Kanser ve AIDS, diyabet ve Parkinson sendromu gibi diğer birçok hastalık, Apoptotik yollardaki dengesizlikler ve anormal mekanizmalar sonucu ortaya çıkmaktadır (Indran, Tufo, Pervaiz, & Brenner, 2011). Böylece, Apoptotik mekanizmaların ve ilişkili yolların derinlemesine bir şekilde anlaşılması, yalnızca hastalığı anlamada değil aynı zamanda hastalık tedavisinde de yardımcı olur (Wong, 2011).

2.1.1. Apoptotik Proteinler

Apoptotik proteinlerin sınıflandırılması, öncelikle apoptozdaki rollerine bağlıdır (Şekil 2B). Pro-Apoptotik proteinler ayrıca protein ailesine bağlı olarak (1) kaspaz ve (2) Bcl2 familyasına göre sınıflandırılır.



Şekil 2. (A) Kaspazların sınıflandırılması. Kaspazlar üç alt tipe ayrılır: Enflamatuar kaspazlar (1,4,5,11,12,13,14), uzun N terminalli (2,8,9,10) intrinsik ve ekstrinsik Apoptotik yollarda başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar kısa/olmadıkça N-terminalleri ile bilinir (3,6,7).



(B)

Şekil 2. (B) Apoptotik proteinlerin apoptozdaki işlevlerine göre sınıflandırılması. Pro-Apoptotik proteinler kaspaz ve BCL-2 familyalarına sınıflandırılır. Kaspazlar, apoptotik yolaktaki rollerine göre ayrıca bölünmüştür. Bcl-2 proteinleri, multidomain proteinler (Bax ve Bak) ve sadece BH3 bölgesi olarak sınıflandırılan BH3 domeni (Teklif ve SMAC / Diablo, HRTA / Omi, Noxa, Puma, Arts ve Bim gibi Apoptotik inhibitörlerin inhibitörleri) olarak sınıflandırılır. Anti-apoptotik proteinler, BCL-2 çok-alanlı proteinler (Bcl-xl, Bcl-b, Bcl-w, Mcl-1, Bf1 ve DIVA / Boo) ve BIR alan ailesi (survivin, livin, bruce, c- olarak sınıflandırılır. IAP ve x-IAP).

(1) Aspartat spesifik sistein proteazları (FAN ve ark., 2005; Igney & Krammer, 2002) olan kaspazlar, apoptoz induksiyonunda kilit bir role sahiptir ve genellikle prokaspazlar olarak bilinen inaktif heterodimerler olarak bulunur (Hanahan & Weinberg, 2011; Indran ve ark., 2011). Yapılarına ve işlevlerine göre sınıflandırılan kaspazlara ait 14 bilinen protein vardır (Şekil 2A).

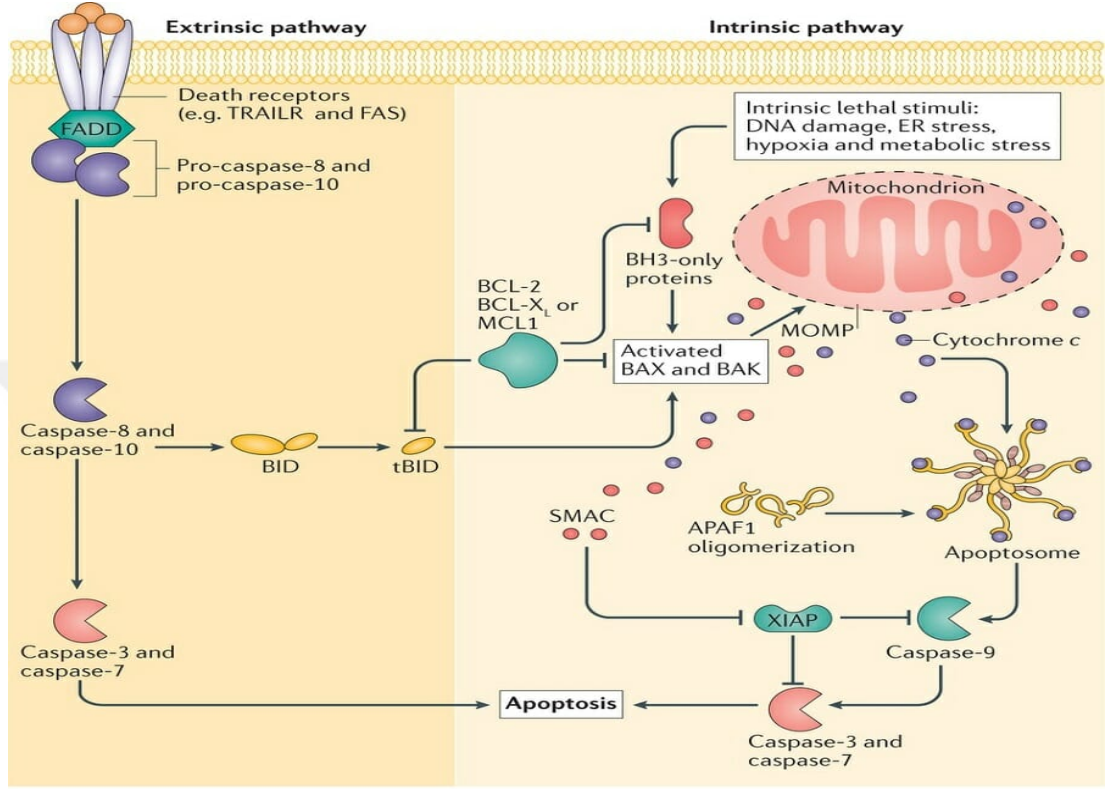
(2) Bcl-2 ailesi (Şekil 2B), programlanmış hücre ölümü ile hücre davranışını düzenler (Opferman & Kothari, 2018; Wong, 2011). Mitokondrinin dış zarına lokalize, esas olarak sitokrom-c salınımını modüle eder. Bcl-2 protein ailesi, BH3 bölgesinin varlığı ile yapısal olarak ayırt edilir (Opferman & Kothari, 2018). Bcl-2 ailesi ya çok alanlı Bax/Bak yoluyla apoptozu indükler ya da sadece Puma, Noxa,

Bim, Bad, Smac/Diablo, Hrt/a/Omi, Arts dahil olmak üzere BH3 ailesine ait anti-apoptotik proteinleri (IAP'ler) inhibe eder. Sitokinlerin indüklediği apoptozda çok önemli olan Puma ve Noxa, DNA hasarı ve P53'ün transkripsiyonu sonucu üretilir (Aubrey, Kelly, Janic, Herold, & Strasser, 2018; FAN ve ark., 2005; Safarzadeh ve ark., 2014). Apoptoz inhibitörleri olarak işlev gören Bcl-2 familyasının üyeleri olan anti-apoptotik proteinler (Şekil 2B), Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Bfl Diva/Boo içeren çoklu BH alanına alt gruptandırılmıştır. Stresli hücrel koşullar altında, bu proteinler, mitokondriyal zar bütünlüğünü koruyarak proapoptotik Bax ve Bak'ı bağlamak için düzenlenir (Indran ve ark., 2011; Wong, 2011). Anti-apoptotik proteinlerin BIR alanı, N-IAP, c-IAP 1, c-IAP 2 ve x-IAP'yi içerir. Testis spesifik survivin ve ubiquitin konjuge enzimler livin ve bruce / appollon'un tümü esas olarak kaspazların inhibisyonu yolağı ile işlev görür (Indran ve ark., 2011; Wong, 2011).

2.1.2. Apoptotik Yol

Apoptoza katkıda bulunan iki ana yol Şekil 3'te gösterilmiştir (Rathore, McCallum, Varghese, Florea, & Büsselberg, 2017). İlk olarak, dışsal/ölüm reseptörü yolağı çıkmış ve ikinci olarak, mitokondriyal stresin dahil olduğu kendine özgü yolağı ortaya çıkmıştır. Dışsal yolakta, sinyal iletim kaskadı aktivasyonu, ölüm sinyallerinin Fas ve TNF gibi trimerik ölüm ligandlarına bağlanması yoluyla gerçekleşir (FAN ve ark., 2005; Igney & Krammer, 2002). Ekstra bir hücrel ölüm sinyali alındığında, başlatıcı prokaspazlar 8 ve 10 (ölüm reseptörlerinin iç zarına FADD / TRADD bölgelerine bağlanır) aktive edilir, bu da bir DISC kompleksi oluşumu ile sonuçlanır ve böylece sinyal transdüksiyon kaskadı başlar (FAN ve ark., 2005; Igney & Krammer, 2002; Rathore ve ark., 2017). Daha sonra, aktive kaspaz-3, sadece BH3 alanı içeren BID proteini yolağıyla mitokondriyal amplifikasyon döngüsünün aktivasyonunda işlev görür, böylece dış ve iç yollar arasında bir bağlantı görevi görür (Fan ve ark., 2005; Igney & Krammer, 2002; Rathore ve ark., 2017). Mitokondriyal membran üzerinde yer alan aktif bir form olan t-BID, pro-apoptotik çok alanlı Bcl-2 proteinleri Bax ve Bak'ın aktivasyonu ile intrinsik kaskaddan sorumludur (Fan ve ark., 2005). Aktive edilmiş Bax ve Bak, gözeneklerin oluşması ve mitokondriyal membran potansiyelinin (μm) değişmesi ile sitokrom-c'nin salıverilmesine yol açan MOMP'nin artmasına aracılık eder (Indran ve ark., 2011; Kasibhatla & Tseng, 2003;

Rathore ve ark., 2017; Safarzadeh ve ark., 2014). Sitokrom-c, Apaf-1 proteini ve prokaspaz-9, uygulayıcı kaspazların aktivasyonu yoluyla Apoptotik kaskadı güçlendiren bir apoptozom oluşturur (Indran ve ark., 2011).



Şekil 3. İçsel, dışsal, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum apoptotik yolların gösterimi. Apoptotik proteinlerin rolü (siyah oklar) ve bunların apoptotik inhibitörler (Pembe) tarafından düzenlenen anti-apoptotik proteinler (Kırmızı) ile inhibisyonu. Bir apoptotik hücre genellikle artan K⁺ akışı, yüzey taşması, GSH gibi antioksidan belirteçlerin tükenmesi, kromatin yoğunlaşması ve hücresel bütünlüğün kaybı ile karakterize edilir.

Mitokondriyal gözenekler ayrıca kaspaz-9'un inhibisyonu ile etki eden BID ailesi inhibitörleri olan Smac/Diablo ve Hrt/Omi'nin salınımını kolaylaştırır (Lopez & Tait, 2015). İçsel yol ayrıca oksidatif stres, hipoksi, hücre içi kalsiyum iyonlarının hücre içi konsantrasyonunda artış, enfeksiyon veya Bax ve Bak'ı da uyararak pro-apoptotik Bad proteini engelleyen büyüme faktörlerinin geri çekilmesi yoluyla içsel olarak aktive edilebilir (Indran ve ark., 2011). Bax ve Bak aktivasyonuna anti-apoptotik

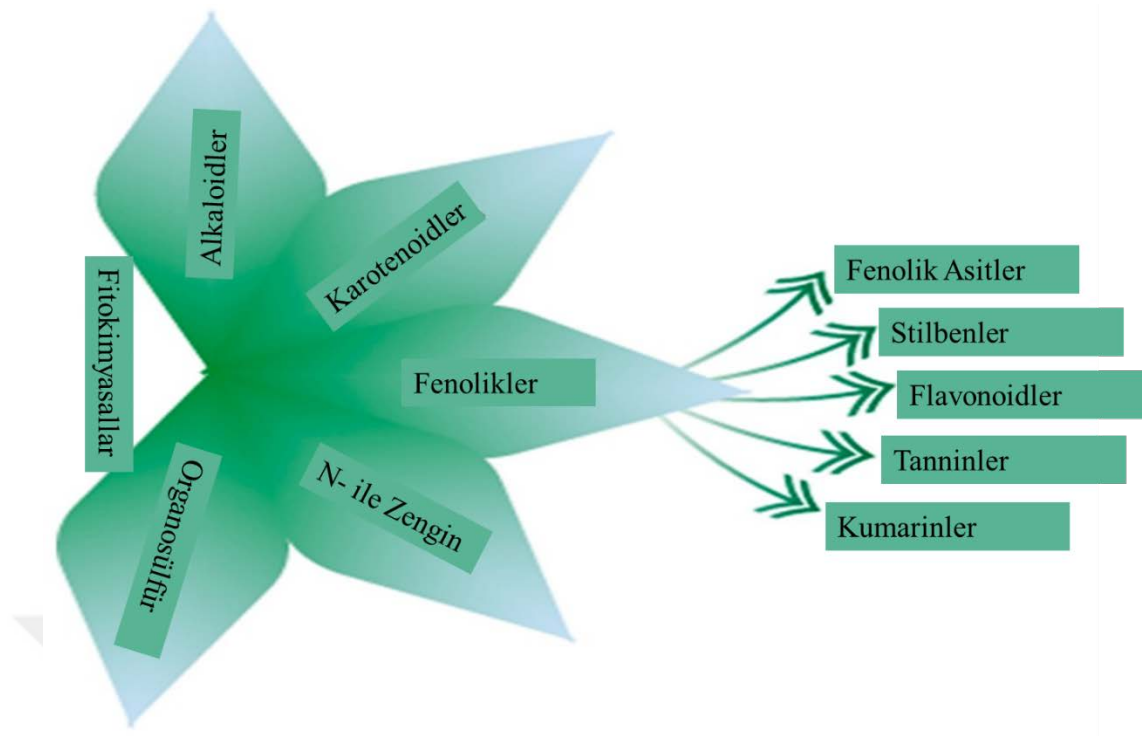
proteinler Bcl-xL ve Bcl-2'nin inhibisyonu aracılık eder (FAN ve ark., 2005). Bak işlevi VDAC ile sınırlandırılmıştır. IAP'lerin aktivasyonu, sadece pro-apoptotik BH3 alan proteinleri olan Bid (Bcl-xL'nin inhibe edilmesi), Noxa (Bcl-2'nin inhibe edilmesi) ve Puma'nın (Mcl-1'in inhibe edilmesi) pro-apoptotik BH3'ün etki alanı ile sonuçlanan tümör baskılayıcı gen TP53'ün aşırı ekspresyonunun bir sonucu olarak meydana gelir. Bax-Bak gözenek oluşumuna ve sitokrom salınımına katkıda bulunanlar p53, ROS'un kaspaz fonksiyonunu geliştirebileceği kanıtlandığı için ROS indüksiyonu ve hücrel stresin artması sürecinde işlev görür. ROS ayrıca H₂O₂ üretimini uyarır, hücre içi pH değerini değiştirir ve Bak aktivasyonunu kolaylaştırır. Ek olarak, O₂⁻ VDAC'nin işlevini modüle eder, bu nedenle mitokondriyal membran geçirgenliğini artırır (Indran ve ark., 2011). p53 ayrıca, mitokondriyal membran üzerinde BID ve Bak'ı aktive eden katapsini serbest bırakan lizozomal geçirgenleştirme ile de ilişkilidir (Chwieralski, Welte, & Bühling, 2006; Lopez & Tait, 2015). Ayrıca, p53, pro53paz-2'nin, P53'ün bir PIDDOSOME ölüm alanı olan p53 kaynaklı proteinden salınması yoluyla aktivasyonu ile de ilgilidir. Daha sonra, kaspaz-2, mitokondriyal amplifikasyon döngüsünü artırarak, t-BID'in aktivasyonunu artırır (Chwieralski ve ark., 2006; Manzl ve ark., 2009). MOMP yolu, DNA fragmentasyonunu artıran AIF ve Endo G'yi aktive eder (Chwieralski ve ark., 2006; Indran ve ark., 2011). Ayrıca, Smac / Diablo'nun serbest bırakılması, KUA familyası işlevini inhibe ederek kaspaz 9'un inhibisyonunu önler (Wong, 2011). Sitokrom-c, ER yüzeyindeki Inositol 1,4,5 fosfatın, mitokondriye aktive edilmesiyle Ca²⁺ iyonlarının salınımını, mitokondriyal alanda Ca²⁺ birikimine neden olarak, bu nedenle mitokondriyal stres ve gözenek oluşumunu artırır (Boehning ve ark., 2003; Lopez & Tait, 2015). Artan hücre içi Ca²⁺ iyon konsantrasyonu, nükleer ve hücrel membranların ayrışmasını hedefleyen hücre içi bir endonükleaz olan kalpain aktivasyonunu da tetikler (Momeni, 2011; Stewart, Yapa, & Monteith, 2015). Kaspaz-3'ün mitokondriyal döngü amplifikasyonundaki fonksiyonuna ek olarak, kaspaz-3'ün DNA tamir prosesi ile ilişkili PARP'yi inhibe eden ve parçalayan, uygulayıcı kaspaz olduğu da düşünülmektedir. PARP, DNA parçalanmasına katkıda bulunan CAD'in yanı sıra Lamin A' nın aktivasyonuna katkıda bulunan CAD'yi aktive eder, bu da kromatin yoğunlaşması ve nükleer membran bozulmasına neden olur. Diğerlerinin yanı sıra, foprinin aktivasyonundan sonra apoptotik cisimlerin oluşumu gerçekleşir (FAN ve ark., 2005; Igney & Krammer, 2002). Bahsedilen

reaksiyonlar/yolaklar, plazmoliz ve hücre yüzeyinde çıkıntı, apoptotik cisimlerin oluşumu ve fosfatidil serin "Annexin V" den etkilenen zar değişiklikleri gibi karakteristik fizyolojik ve morfolojik değişikliklere yol açmaktadır (Kasibhatla & Tseng, 2003; Wong, 2011). Buna göre, kromatin yoğunlaşması (karyohexis), DNA parçalanması, nükleer zarın parçalanması ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin yanı sıra yüksek ATP tüketimi artışı da bu değişikliklere dahil edilmiştir (Igney & Krammer, 2002; Kasibhatla & Tseng, 2003; Momeni, 2011; Wong, 2011).

Kanser hücreleri, onkojenik genlerin (hücre sel proliferasyonu artıran ve p53'ü baskılayan c-Myc gibi) ve p53'ü baskılayan c-Myc gibi (p53) ve anti-Apoptotik proteinleri (Bcl-2, survivin, livin, vb.) (Kasibhatla & Tseng, 2003) aşırı apoptoza direnç gösterir. Aksine, kanser hücrelerinin apoptoza direnci, proapoptotik proteinlerin (kaspazlar, Bad, Bax vb.) düzenlenmesi ve p53'ün tümör baskılama fonksiyonunun kaybı ile de modüle edilebilir (Igney & Krammer, 2002; Indran ve ark., 2011). Apoptotik yollarda direncin üstesinden gelmek kanser tedavisinde ilginç bir yaklaşımdır (Indran ve ark., 2011). Bu esas olarak p53 (ilaç, gen ve immünoterapi), kaspazlar (ilaç ve gen tedavisi) ve BID ailesini hedefleyerek ve IAP'nin etkisini uyararak elde edilir. Son zamanlarda, bitki kaynaklı kanser tedavisi dünya genelinde oldukça aktif bir araştırma alanı olmuştur.

2.2. Fitokimyasallar ve Sınıflandırılması

Fitokimyasallar, çeşitli hastalıkların riskini azaltma yeteneğine sahip bitkilerde yaygın olarak bulunan, biyoaktif besleyici olmayan bileşiklerdir (Panche, Diwan, & Chandra, 2016; Varghese ve ark., 2018). Bitki aleminde 50.000'den fazla farklı bilinen fitokimyasal vardır. Fitokimyasalların temel sınıflandırması, Şekil 4'te verilmektedir.

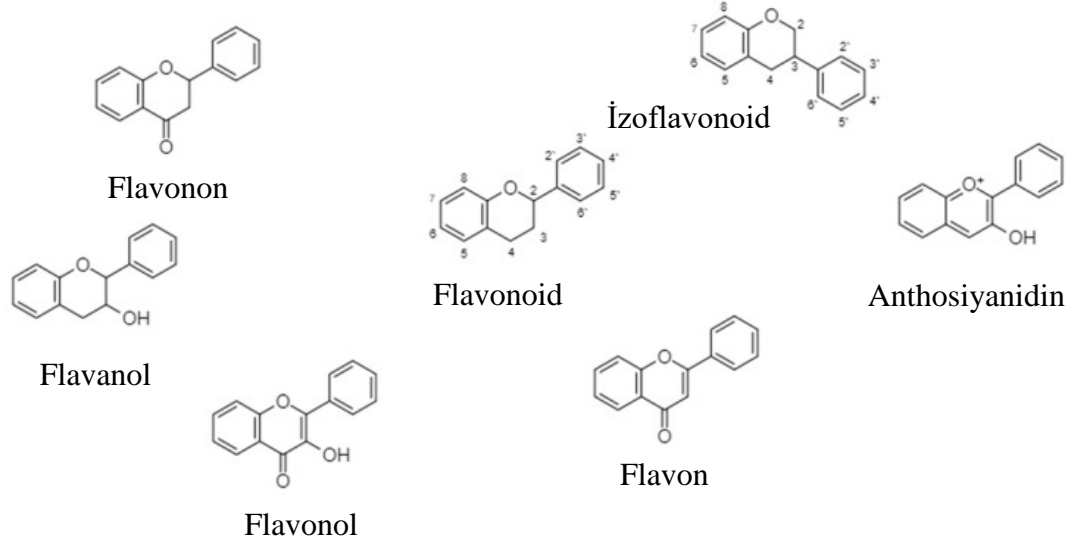


Şekil 4. Fitokimyasalların sınıflandırılması. Ayrıca fenolik asitler, stilbenler, flavonoidler, tanenler ve kumarinler olarak sınıflandırılan alkaloidler, karotenoidler, bakımından zengin, organo-sülfür bileşikleri ve fenolikler.

Fenolikler bir veya daha fazla aromatik benzen halkasına sahiptir ve mono veya poli hidroksile edilebilir. Dahası, fenolikler insan beslenmesinde en bol bulunan antioksidanlar olarak kabul edilir. Fenolikler fenolik asitler, stilbenler, tanenler, kumarinler ve Flavonoidler olarak sınıflandırılır(Liu, 2004).

2.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, çiçeğin renginden ve aromasından sorumlu sekonder bitki metabolitleridir ve antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antialerjik ve antienflamatuar yeteneklere sahiptirler (Batra & Sharma, 2013; Panche ve ark., 2016; Tapas, Sakarkar, & Kakde, 2008). Karsinogenez sürecinde, flavonoidler çoklu sinyal iletim yollarına müdahale eder ve böylece proliferasyonu, anjiyogenez ve metastazı sınırlandırır veya apoptozu artırır (Ravishankar, Rajora, Greco, & Osborn, 2013) (Şekil 5).



Şekil 5. Flavonoidlerin yapısal farklılıklara bağlı olarak altı sınıfa sınıflandırılması: flavanol, flavanon, flavanol, flavon, antosiyanidin ve izoflavonoid.

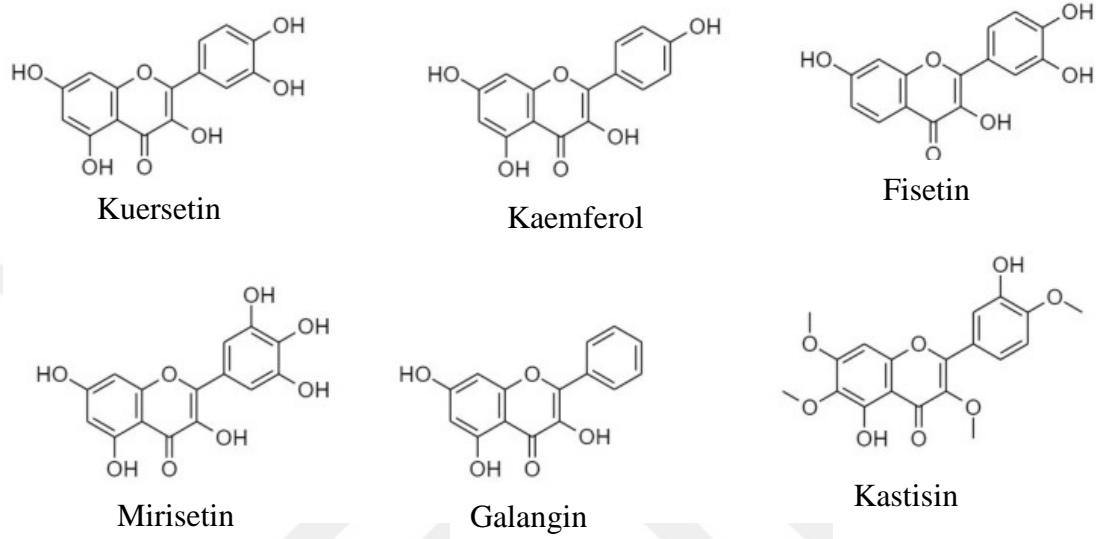
Polifenolik terpenoidler, C2 (Flavonoidler) veya C3 (izoflavonoitler) içinde bir B halkasına bağlı bir kroman halkası (A ve C) olarak düzenlenen 15 karbon atomundan oluşmaktadır (Batra & Sharma, 2013; Panche ve ark., 2016). Her sınıf hidroksilasyon derecesinde farklılık göstermektedir (Liu, 2004). Flavonoidler ya eklenmiş şekerli glikozitler olarak ya da eksiz şekersiz aglikonlar olarak bulunmuştur (Kelly, 2011).

2.2.1.1. Flavonoidler (C2'ye Bağlı B Halkası) - Doymamış C-Halkası Flavonun

Di-hidroflavonlar olarak da bilinen flavanonlar, doymuş, oksitlenmiş bir C halkası ile karakterize edilir. Flavanonlar turuncgillerde bulunup antioksidan aktiviteleri ve serbest radikal temizleme yetenekleri ile bilinirler (Panche ve ark., 2016). Hesperetin ve naringenin iki ana flavanone bileşiğe örnek olarak verilebilir.

2.2.1.2. Flavonoidler (C2'ye Bağlı B Halkası) - Doymamış C-Halkası Flavonol

Flavonol, C4'te oksitlenmiş ve C3'te hidroksile edilmiş bulunan C2-C3'deki doymamış C halkası ile karakterize edilir (Panche ve ark., 2016). Flavonol lahanada, marul, soğan, üzüm ve meyvelerde yaygındır. Flavonoller altı gruba ayrılır (Şekil 6).



Şekil 6. Flavonollerin sınıflandırılması ve yapısı.

2.2.1.2.1. Kuarsetin

3,5,7,3',4'-Pentahidroksiflavon veya Kuarsetin en çok tercih edilen flavonoid olup, kabuk, çiçek ve domates, elma, çilek, üzüm, soğan, çay yaprağı, Brassica sebze, kapari, arpacık soğanı tohumlarında ve fındıkta yaygın olarak bulunmaktadır (Liu, 2004; Varghese ve ark., 2018). Kuarsetin yapısal olarak endojen östrojen 17 β -estradiol'e benzeyen bir fitoöstrojendir (Ranganathan, Halagowder, & Sivasithambaram, 2015). Farklı çalışmalar, Kuarsetinin antikanser potansiyelini desteklemektedir. MCF-7 hücrelerinde Kuarsetin, Bax, kapsaz-3 artışı ile hem apoptozu indüklemeye hem de RIPK1 ve RIPK3'ün aşırı ekspresyonu ile Bcl-2 ve nekroptozda azalma eğilimi göstermiştir (Chou ve ark., 2010; Khorsandi ve ark., 2017; Zhang, Ying, Wang, & Zhang, 2012). Başka bir çalışmada, Kuarsetin'in intrinsik mitokondriyal Apoptotik yolağı indüklediği gösterilmiştir (Chou ve ark., 2010). Aksine, Kuarsetin, BT-474 hücre hatlarında ekstrinsik apoptozu artırır.

İlginç bir şekilde Bcl-2 veya Bax üzerinde etkisi olmadığı ve bu nedenle herhangi bir içsel apoptotik yol başlatmamıştır (Ranganathan ve ark., 2015).

Kuarsetin'in mitokondriyal kaynaklı pro-Apoptotik etkileri, HL-60 hücre hatlarında Cox-2, Kaspaz-3, Bax, Bad, Bcl-2, Sitokrom-c ve PARP'nin modülasyonu ile gösterilmiştir (Niu ve ark., 2011). BC1, BC3 ve BCBL lenfoma hücrelerinde, Kuarsetin, PI3K / AKT / mTOR ve STAT3 yollarının aşağı regülasyonu yoluyla apoptozu indüklemiştir (Manzl ve ark., 2009). Kuarsetin, EGCG ile kombinasyon halinde PC-3 ve LNCaP hücrelerinde MDR1'in inhibisyonu yoluyla hücre canlılığını azaltmıştır. Buna ek olarak, LNCaP'nin PC-3 üzerinden etkili bir şekilde azaltılması, Kuarsetin'in ayrıca p53 apoptotik yolağa da aracılık ettiğini göstermektedir (Batra & Sharma, 2013; Wang, Heber, & Henning, 2012). Benzer şekilde, metformin ile birlikte uygulandığında Kuarsetin, proliferatif PI3K/AKT yollağını inhibe ettiği bildirilmiştir (Sun, Gong, Liu, & Miao, 2018). Kuarsetin, ErbB2 tirozin kinaz aktivitesini ve PI3K ve AKT om SKBR3 meme kanseri hücrelerinin fosforilasyonunu azaltırken (Jeong, An, Kwon, Li, & Lee, 2008), ERK1/2 ve AKT fosforilasyonunu düşürmüş ve HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde NFκB yollağını inhibe etmiştir (Granado-Serrano, Martín, Bravo, Goya, & Ramos, 2010).

2.2.1.2.2. Kamferol

Kamferol veya 3,4,5,7-tetrahidroksiflavon, çay, lahana, fasulye, soğan, domates, çilek, brokoli, elma ve üzümde bulunan toksik olmayan bir flavonoiddir (Chen & Chen, 2013; Li, Du, Wang, Wang, & Zhang, 2009). Kamferol, antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, nöroprotektif ve antikanser yeteneklerine sahiptir. Kamferol yapısal olarak östrojene benzer, böylece konsantrasyonuna bağlı olarak iki (östrojenik/anti-östrojenik) etki gösterebilir. Hepatosellüler kanser; akut promyelositik lösemi; ve glioma ile yumurtalık, meme ve rahim ağzı gibi hormonal kanserlerin tedavisinde bir aday olabilir. Meme kanserinde MDA-MB-453 hücrelerinde Kamferol, DNA parçalanması ve p53 ekspresyonu ve fosforilasyonunun yükselmesine, hücre proliferatif sinyallesini, dolayısıyla apoptozu bozmaya neden olmuştur (Li ve ark., 2009). Kamferol, A2780/CP70, A2780wt ve OVCAR-3 hücre hatlarında intrinsik apoptozun, kaspaz-3, kaspaz-7, p53, Bax ve Bcl-xL'de azaldığı mitokondriyal yoldan indüksiyonu ile ilişkilidir. Kamferol ayrıca, AKT

yolağının proliferatif sinyalini azalttığı ve VEGF'nin aşağı regülasyonu yoluyla anjiyogenezi önlediği bildirilmiştir.

2.2.1.2.3. Mirisetin

3,5,7,3',4',5'-Hexahidroksflavon veya mirisetin, siyah çay, yeşil çay veya şarapta bulunan yaygın bir diyet flavonoidir. Mirisetin, antibakteriyel, antiviral, antioksidan ve anti kanserojen aktivitelerle ilişkilidir (Devi, Rajavel, Habtemariam, Nabavi, & Nabavi, 2015). Mirisetin, kansere karşı koruyucu rolü, HCT-15 hücrelerinde DNA yoğunlaşması, Bcl-xL ve Bcl-2 ekspresyonunda bastırma ve mitokondriyal AIF salınımında artışla gösterilmiştir. Bununla birlikte, kaspazlar-3 ve -9'un parçalanması üzerinde hiçbir etkisi gözlenmedi (M. E. Kim, Ha, Yoon, & Lee, 2014). UVB'nin indüklediği HaCaT hücrelerinde, mirisetin, AKT yolağının inhibisyonu yoluyla proapoptotik etkiler uyguladı. Kötü fosforilasyonda azalma, sitokrom-c, Smac ve AIF salınımları da gözlenmiştir (W. Kim ve ark., 2010). Ayrıca, SKOV3 hücrelerinde, mirisetin, nükleer kromatin yoğunlaşmasını ve parçalanmasını indüklemiştir ve DNA çift sarmalı doza bağlı şekilde kırılmaktadır (XU ve ark., 2016). Sisplatine dirençli OVCAR-3 ve A2780/CP70 hücre hatlarında, mirisetin, kanser kemoresansını aşar ve sisplatinden daha yüksek sitotoksosite sergiler. Altta yatan mekanizma, sırasıyla Bcl-2 ve DR5'in düzenlenmiş ekspresyonu ile doğrulanan hem iç hem de dış apoptotik yolları içermektedir (HUANG ve ark., 2015). Son olarak, TNBC'de mirisetin ile indüklenen apoptoz mekanizması, DNA çift sarmalının kopmasıyla sonuçlanan ROS indüksiyonu ve mitokondriyal apoptotik yolun aktivasyonu ile anlaşılmıştır (Knickle, Fernando, Greenshields, Rupasinghe, & Hoskin, 2018).

2.2.1.2.4. Ellajik Asit

Ellajik asit, 4,4',5,5',6,6'-heksahidroksidifenik asit-2,6,2',6'-dilakton kimyasal formülü ile nar, çilek de dahil olmak üzere çeşitli meyvelerde, ahududu ve böğürtlen gibi bitkilerde yaygın olarak bulunur (Promsong, Chung, Sathakarn, & Nittayananta, 2015). Ellajik asidin, antienflamatuar (Seo, Jeong, Yoo, Lee, & Shin, 2016), antioksidan ve antiviral dahil olmak üzere çeşitli etkilere sahip olduğu bildirilmiştir.

Önceki çalışmalar, ellajik asidin bir insan pankreas kanseri hücresinde ksenogre edilmiş farelerde tümör büyümesini inhibe edebildiğini ve TSGH8301 insan mesane kanseri hücrelerinde endoplazmik retikulum stres ve mitokondriya bağımlı sinyalleme yolları ile hücre apoptozisini indükleyebildiğini göstermiştir (Baek, Lee, Kim, Lim, & Lim, 2016). Ek olarak, ellajik asit, insan lösemi hücrelerinin farklılaşmasını kuvvetlendirir ve ellajik asidin güçlü antikanser aktivitesini ortaya koyan meme kanserinde bir anti-anjiyojenez aktivitesi göstermiştir. Ayrıca, önceki bir çalışma, ellajik asit tedavisinin, insan servikal karsinomundaki hücrelerde hücre büyümesini ve indüklenmiş hücre apoptozisini inhibe ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, ellajik asidin servikal karsinom üzerindeki etkisinin altında yatan moleküler mekanizma belirsizliğini korumaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ellajik asidin, insan prostat kanseri hücrelerinde sinyal transdüseri ve transkripsiyon 3 (STAT3) sinyalleme üzerindeki inhibitör etkileri üzerindeki hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir . Ek olarak, onkogenik transkripsiyon faktörü olarak işlev gören STAT3'ün, çok sayıda kanser türünde tümör hücresi proliferasyonu, hücre canlılığı, apoptoz ve anjiyojenezin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynadığı yaygın olarak tanımlanmaktadır. Klinik ve pro-klinik çalışmalar, STAT3'ün servikal karsinoma dokularında ve hücre hatlarında yanlış bir şekilde ekspres edildiğini göstermiştir (Zhao, Tang, Marsh, Shankar, & Srivastava, 2013). Artan kanıtlar ayrıca STAT3'ün rahim ağzı kanseri gelişimi sırasında tümör mikro ortamında ve insan papilloma virüsü enfeksiyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir . Yukarıda belirtilen gözlemlere dayanarak, ellajik asidin insan servikal karsinom hücrelerini inhibe edebileceği ve mekanizmanın STAT3 sinyalleşmesinin düzenlenmesi ile ilişkili olabileceği varsayılmaktadır (Hagiwara, Kasukabe, Kaneko, Niitsu, & Okabe-Kado, 2010; Ho ve ark., 2013).

2.3. Biyoyararlanım

Biyoyararlanım, vücuda alındıktan sonra insan vücudunda emilen ve metabolize edilen bir bileşiğin miktarıdır ve genellikle maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}) cinsinden ölçülür. Epidemiyolojik veriler flavonoidler açısından zengin bir diyet ile insan hastalıklarının önlenmesi arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Flavonoid bileşiklerin tedavi olarak uygulandığında çeşitli insan

hastalıklarına karşı koruyucu ajanlar olarak etkinliği, *in vitro* deneysel modellerde yoğun bir şekilde test edilmiştir ve *in vitro* olarak gözlemlenen flavonoidlerin biyolojik özellikleri ile *in vivo* biyolojik etkinlikleri arasında farklılık bulunmaktadır (Hollman, 2004; Makarova, 2011; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). Benzer şekilde, doğal olarak ortaya çıkan flavonoidlerin çoğu, *in vitro* olarak etkili antikanser ajanları olma potansiyeline sahipken, bu tür yararlı etkiler, öncelikle vücutta bu bitki kaynaklı sekonder metabolitlerin çoğunun düşük biyoyararlanımı nedeniyle insanlarda istenen sonucu elde edilememektedir. Bu nedenle antikanser flavonoidlerinin biyoyararlanımı ayrıntılı olarak araştırılmalıdır. Bir flavonoid bileşiğinin biyoaktivitesini açıklamak için emilim sürecini, biyoyararlanımını ve metabolizma verilerine ulaşılmalıdır (Hollman, 2004). Vücutta, flavonoller, izoflavonlar, flavonlar ve antosiyaninler gibi glikozile edilmiş flavonoidler, absorpsiyondan önce intestinal veya kolon mikroflorası ile ilgili aglikonlarına hidrolize edilmektedir. Lipofilik aglikonlar, pasif difüzyon yoluyla intestinal epitel hücrelerine girerken, epitelyal taşıyıcılar, intestinal epitel hücrelerine glikozitlerin alımını desteklemektedir. Glikozile edilmiş flavonoidlerin emilim oranı, barsaktaki aglikon flavonoidlere göre çok daha düşüktür. Emiliminden sonra, flavonoidler öncelikle ince barsakta, karaciğerde ve böbrekte metabolik değişikliklere tabi tutulur. Dolaşım ve hedef dokulara girmeden önce metilasyon, sülfatlama veya flavonoidlerin glukuronidasyonu gibi emilim sonrası metabolik değişiklikler biyolojik özelliklerini de büyük ölçüde değiştirebilmektedir. Ek olarak, proksimal bağırsakta emilmeyen diyetle alınmış flavonoid bileşikleri, heterosiklik oksijen içeren halkanın bölündüğü bu flavonoid moleküllerini parçalayan kolonik mikroplara maruz bırakıldığı ve sonraki bozunma ürünleri daha sonra absorbe edilebilmektedir. Gallik asit ve izoflavonlar, flavanonlar, kateşin ve Kuarsetin glikozitlerin en yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu bilinirken, antosiyaninler ve protosiyanidinlerin en düşük biyoyararlanımı olduğu söylenmektedir (Makarova, 2011).

Farmakodinamikte, çeşitli flavonoidlerin biyoyararlanımının anlaşılmasında büyük ilerleme kaydedilmiştir, ancak birçok flavonoid bileşiğinin zayıf oral biyoyararlanımının üstesinden gelmek için pratik çözümler hala eksik olduğu bilinmektedir (Hu, Wu, & Liu, 2017). Biyoyararlanımın artırılması, çözünürlük, hücresel geçirgenlik, metabolik değişim ve bu bileşiklerin insan vücudundan atılmasının önündeki engellerin aşılması ve hedef doku alımının kolaylaştırılması ile

sağlanabilmektedir (Hu ve ark., 2017). Birçok araştırma grubu, barsak emilimini artırarak, absorpsiyon bölgesini değiştirerek ve metabolik stabiliteyi artırarak koruyucu flavonoid bileşiklerin biyoyararlanımını arttırmaya çalışmaktadır (Thilakarathna, Rupasinghe, Thilakarathna, & Rupasinghe, 2013). Flavonoid bileşiklerin bazıları artık haplar halinde ticari olarak temin edilebilmesine rağmen, çok miktarda konsantre flavonoid kullanımı, bunların ters yan etkileri ve bunların ilaç etkileşimleri üzerindeki sınırlı bilgiler nedeniyle halk sağlığı endişelerine neden olabilmektedir. Her ne kadar tartışılabilir olsa da, bir soya isoflavonu olan genistin, hormon östrojen veya progesteron yokluğunda bile insülin benzeri büyüme faktörü yolunu artırarak MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını uyardığını bildirmiştir (Hu ve ark., 2017; Thilakarathna ve ark., 2013).

Biyolojik sistemde biyoyararlanım flavonoidlerini etkileme potansiyeline sahip birkaç farklı biyomolekül (karbonhidrat ve protein) olduğu bilinmektedir (Cassidy & Minihane, 2017). Yaş, cinsiyet ve genotip gibi değişken faktörler gibi faktörler, bu biyomoleküllerin biyoaktivite ekspresyonunu değiştirebilmektedir, bu da diyetle alınan flavonoid bileşiklerin emilimini, metabolizmasını, dolaşımdaki konsantrasyonlarını, doku maruziyetini ve ortadan kaldırılmasını etkilemektedir (Cassidy & Minihane, 2017). Bu nedenle, yaş, cinsiyet, devam eden hastalık durumu/durumları, mevcut ilaçlar, alışılmış beslenme, gıdanın fizyokimyasal özellikleri ve barsak mikrobiyomunun doğası ile ilgili faktörler üzerinde daha büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. Klinik çalışmalarda kanser önleyici ilaçlar olarak flavonoid bileşikleri, klinik öncesi çalışmalarda kullanılan etkili terapötik dozları elde etmek için, minimum yan etkilerle maksimum verimlilik elde etmek için geliştirilmiş ve hedeflenmiş ilaç dağıtım tekniklerine önem verilmelidir. Nanoteknolojiye dayalı ilaç dağıtım sistemlerindeki gelişmeler, çözünürlüğü artırmak, biyoyararlanımı artırmak ve flavonoidlerin hedefleme yeteneklerini geliştirmek için daha iyi fırsatlar sunmaktadır. Mevcut araştırmalar, flavonoid ilaçların dokuları hedef alması için uygun moleküler taşıyıcıların tasarlanmasına odaklanmalıdır.

Kuarsetin için nanopartikül (lipozomlar, polietilen glikol lipozomları, nikel bazlı, lesitin bazlı ve nanoribbon) taşıyıcılarının kullanıldığı çalışmaların in vitro ve in vivo merkezi sinir sistemi, akciğerler, kolon, karaciğer ve meme kanseri modellerinde katı tümörlere ilaç iletimi açısından başarılı olduğu bildirilmiştir.

Bu tezde ise, kuşburnu bitkisi, taze meyve, parçalanmış ve kuru meyve olarak 1,3,5,7 ve 10 dakika demleme ve kaynama işlemlerine tabi tutularak elde ettiğimiz çay ekstraktlarının fenolik asit içerikleri LC-MS/MS kullanarak belirlemeyi amaçladık. Elde edilen çaylardaki farklı fenolik maddelerin miktarları en yüksek oranda bulunan flavonoidlerden, Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit eldesine sahip çay ekstraktları iki farklı VCaP ve LNCaP prostat kanser hücre hattında apoptosiz etkileri için hangi ürünlerin kullanılması gerektiğini belirlemeyi hedefledik. Kanserde yararlı etkileri gösterilmiş olan Kuarsetin, Mirisetin, Kamferol, Ellajik asit molekülleri ve bu molekülleri en yüksek oranda içeren kuşburnu çayları kullanarak kanser hücre kültüründe apoptoz üzerine etkileri araştırıldı. Bunun için kanser hücre kültürüne belirli oranlarda çay ve fenolik molekülün kendisi eklenerek apoptoz göstergelerinden Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, TRAIL, APIF, FITC Annexin V düzeyleri belirlenmiştir.

3. Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı Araştırma Laboratuvarında bulunan LC-MS/MS cihazı, spektrofotometre cihazları ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında bulunan Hood hücre kültürü kabini ve Flow stometry cihazlarıyla birlikte diğer alt yapıları bu tez projesi için kullanılmıştır.

3.1. Kuşburnu çayı eldesi

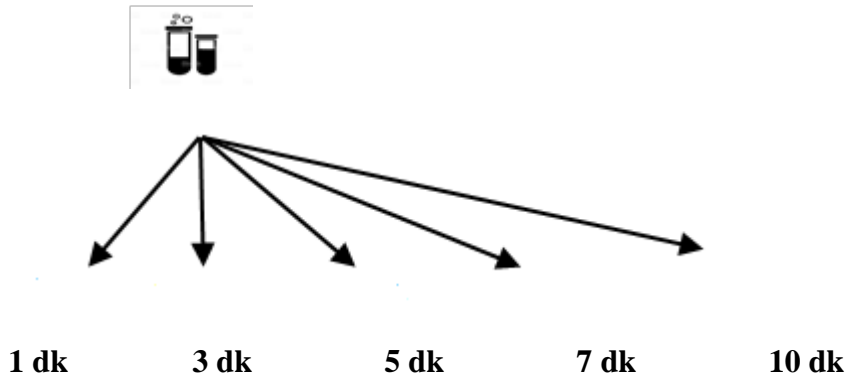
Kuşburnu çayları aşağıdaki prosedürlere göre hazırlanmıştır. Kuşburnu çayı hazırlamak için üç çeşit (taze meyve, parçalanmış meyve ve kuru meyve) kuşburnu kullanılmıştır. Taze meyveler Türkiye'de Afyon'un Şuhut ilçesinin dağlık kesimlerinden ve hazır çay piyasadan temin edilerek aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir.

10 mL distile su ile her türlü kuşburnu (1 g), 80°C ve 100°C farklı sıcaklıklar 1, 3, 5, 7 ve 10 dakika süreyle demlenmiştir.

3.1.1. İnfüzyon yöntemi

3.1.1.1. Bütün kuşburnu meyvesi

Kaynamış suda bekletme (1g/10 ml su)



3.1.1.2. Taze kuşburnu meyvesi –parçalanmış

Parçalama (karıştırıcı), Kaynamış suda bekletme (1g/10 ml su)



1 dk

3 dk

5 dk

7 dk

10 dk

3.1.1.3. Kuru kuşburnu meyvesi

Kurutma (40°C/1saat ve 60°C/30 dak), Parçalama (blender), Kaynamış suda bekletme (1g / 10 ml su)



1 dk

3 dk

5 dk

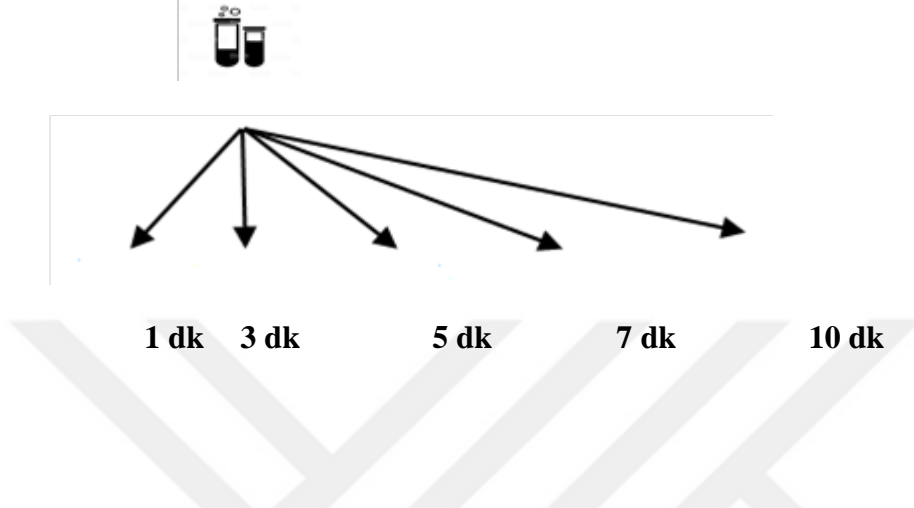
7 dk

10 dk

3.1.2. Kaynatma yöntemi

Kaynatma yönteminde ön işlemler infüzyon yöntemine benzer şekilde gerçekleştirilecek fakat bekletme işlemi kaynayan su içerisine eklenmiştir

Kaynayan suda bekletme (1 g/ 10 ml su)



3.2. Kuşburnu çayı ekstraktlarında yapılacak Analizler:

3.2.1. Fenol bileşiklerin miktarının belirlenmesi LC MS / MS Analizleri

Önceden hazırlanmış örnekler tandem kütle spektrometresinde analiz edildi. Bileşenlerin nicel analizi, dışsal standart metot kullanılarak yapılmıştır. Analizler, otomatik örnek enjeksiyonu ve UHPLC içeren Waters Xevo TQD sistemde gerçekleştirilmiştir.

Ayrırma metodu için, Hypersil BDS C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C ve enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenmiştir. Standartların moleküler spektrumuna dayanarak, iki dalga boyu kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve UV taraması 254-280 nm aralığında gerçekleştirilmiştir. Ayrırma yöntemini optimize etmek için kolonu değiştirmek, sulu çözeltide kullanılan asidi değiştirmek ve mobil fazdaki asetonitril oranını değiştirmek gibi birtakım modifikasyonlar yapılarak yöntem gerçekleştirilmiştir. Ayrırma verimi için en uygun pH değeri 2-3 arasında olacak şekilde belirlenmiştir. Mobil faz, asetonitril ve asetik asit %10 karışımı olacaktır. Elüsyon için aşağıda tanımlanan lineer bir gradyan kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Lineer gradyanı gösteren elüsyon tablosu.

Zaman	CH ₃ COOH (%10)	ACN
0	92	8
30	9	91
35	92	8
37	92	8

3.2.1.1. Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asit tayini

Çayların fenolik bileşik içeriği, LC-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edildi. Stok standartları, stok olarak 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı ve 1/1000 oranında seyreltme kullanılarak standart karışım hazırlandı. Matris etkisinden dolayı fenolik bileşiklerin kaybını belirlemek için tüm numunelere iç standart olarak DMAE Caffeate eklendi. Çay numuneleri metanol ve standart karışım ile 10 ul seyreltildi. 40 ° C'de ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) kolon ile 0.3 mL/dak akış hızında MetOH/Su hareketli faz için doğrusal bir gradyan yöntemi kullanılmıştır. Metot 5 dakika sürdü, %100 su ve 1 dakika yıkama ile başladı ve ardından MetOH miktarını kademeli olarak arttırarak 3 dakika% 100 MetOH ile devam etti. İncelenen hedef fenolik bileşikler, Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asittir. Fenolik bileşiklerin özellikleri ve MRM değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışılan fenolik bileşik standartlarının MRM değerleri.

Bileşen	İyon Modu	Kütle	Yavru İyon	Çarpışma Enerjisi	Cone Voltajı
Kamferol (Fluka 96353)	ES+	287	153	33	55
			165	33	40
			139,05		
			165,1		
Kuarsetin (Sigma Q4951)	ES+	303,1	153,2	31	55
			229,2		43
Ellajik asit (Sigma 14668)	ES+	303,1	229	30	65
Mirisetine (Sigma 72576)	ES+	537	321	33	46

3.3. Hücre kültüründe gerçekleştirilmiş analizler;

Bu çalışmada; Sitotoksosite ve hücre canlılığı analizi (toksik doz belirlenmesi), Hücre kültüründe apoptoz üzerine etkinin belirlenmesi şeklinde uygulama yapılmıştır.

3.3.1. Sitotoksosite ve hücre canlılığı analizi (toksik doz belirlenmesi)

Ellajik asit, Kuarsetin, Kamferol ve Miricetin Fluka Co.Ltd., Almanya ve Sigma Co. Ltd, ABD'den satın alınmıştır. Bu çalışmada Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Manassas, VA, ABD) satın alınan insan androjene bağlı prostat kanseri hücre hatları, VCaP ve LNCaP kullanılmıştır. LNCaP hücreleri, % 1 L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin, % 10 ısıyla etkisizleştirilmiş fetal sığır serumu (FBS) içeren RPMI 1640 ortamında (Biyolojik Endüstriler, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) kültürize edilmiştir. VCaP hücreleri, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, % 10 ısıyla etkisizleştirilmiş fetal sığır serumu (FBS) içeren DMEM ortamında (Biyolojik Endüstriler, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) kültürlenmiştir. Hücreler,% 95 hava ve

37°C'de % 5 CO₂ içeren bir atmosfer ile nemlendirilmiş bir inkübatörde muhafaza edilmiştir.

3.3.1.1. Gerçek Zamanlı Sitotoksisite Testi

Ellajik asit, Kamferol, Mirisetin ve Kuarsetin'in VCaP ve LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP sistemi (ACEA Biosciences) kullanılmıştır. Hücreler, 96 oyuklu e-plaka (6.25 x 10³ VCaP hücreleri / oyuk, 2.5 x 10⁴ LNCaP hücreleri / oyuk) içine ekilmiştir. 24 saat sonra, hücreler 100 µM - 3.125 µM iki kat Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asit dilüsyonları ile muamele edildi ve her 15 dakikada bir 72 saat boyunca izlendi. IC₅₀ değerlerinin hesaplamaları RTCA Yazılımı v 1.2.1 kullanılarak elde edildi.

3.3.1.2. Gerçek Zamanlı Büyüme İnhibisyon Testi

XCELLigence sistemi, Kuşburnu çaylarının VCaP ve LNCaP hücreleri üzerindeki büyüme inhibisyonu etkilerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Hücreler, 96 oyuklu e-plaka (6.25 x 10³ VCaP hücreleri / oyuk, 2.5 x 10⁴ LNCaP hücreleri / oyuk) içine ekilmiştir. 24 saat sonra, hücreler% 100, % 50 ve % 25 konsantrasyonda Kuşburnu çayları ile muamele edildi ve her 15 dakikada bir 72 saat boyunca izlendi. Kuşburnu çaylarının büyüme inhibisyonu etkileri, RTCA Yazılımı v 1.2.1 kullanılarak değerlendirildi.

3.3.2. Hücre kültüründe apoptoz üzerine etkinin belirlenmesi

Human prostat kanseri hücre hatları LNCaP ve VCaP kullanılarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite çalışmasında belirlenen dozda kuşburnu çayı ekstraktı ile 24, 48 veya 72 saat süresince inkübe edilmeden önce ve edildikten sonra alınan örneklerde izleyen parametreler ticari kit kullanılarak ELISA ve Flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Human apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Sitokrom-c, TRAIL biyobelirteçleri ELISA kiti ile ve Annexin V-FITC apoptosis flow sitometri yöntemi ile ölçülmüştür.



3.3.2.1. Annexin V-FITC yöntemi ile apoptozis analizi

Apoptozun erken döneminde hücre membran bütünlüğü bozulmaktadır. Bu süreçte hücre membranının sitozolik yüzeyinde bulunan fosfatidilserin fosfolipidi membranın dış yüzeyine transloke olmaktadır. Anneksinler, kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlama proteinleridir. Membranın dış yüzeyindeki fosfatidilserini belirlemek amacıyla yeşil renkli floresan izotiyosiyanat (FITC) floresan boyası ile işaretli tercihen fosfatidilserine bağlanan Anneksin V kullanıldı. Ayrıca, apoptotik hücreleri ayırmak için bir vital boya olan kırmızı renkli propidium iyodür (PI) kullanıldı. FITC⁺PI⁻ hücreler erken apoptotik hücreleri, FITC⁺PI⁺ hücreler geç apoptotik hücreleri, FITC⁻PI⁺ hücreler ise nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

LNCaP hücrelerinde kuarsetin, mirisetin, ellagik asit, 7dk kaynama ticari çay, 5dk kaynama parça meyve ve 3dk demleme ticari çay etkenlerinin 24 saatlik IC₅₀ dozları 24 saat için; 7 dk kaynama meyve etkeninin 48 saatlik IC₅₀ dozu 48 saat için; kamferol etkeninin 72 saatlik IC₅₀ dozu 72 saat için olacak şekilde apoptotik etkinlikleri değerlendirildi. VCaP hücrelerinde kuarsetin, mirisetin, 7dk kaynama ticari çay, 3dk demleme ticari çay ve 5dk kaynama parça meyve etkenlerinin 24 saatlik IC₅₀ dozları 24 saat için; 7dk kaynama meyve 48 saatlik IC₅₀ dozu 48 saat için; kamferol ve ellagik asit etkenlerinin 72 saatlik IC₅₀ dozu 72 saat için olacak şekilde apoptotik etkinlikleri değerlendirildi.

Apoptoz analizi, “eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” kullanılarak gerçekleştirildi. Kit uygulaması için öncelikle hücreler uygun sayıda 6 oykulu plaklara ekildi. Hücreler 24 saat sonra (hücreler plak yüzeyine tutunduktan sonra) her biri için belirlenen IC₅₀ doz süreleri boyunca etken maddelere maruz bırakıldı. Etken maddeye maruz bırakılmamış hücreler 24, 48 ve 72 saat için olacak şekilde kontrol olarak kullanıldı. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplanarak kit protokolüne geçildi.

Kit protokolü aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi:

- Hücreler 1ml PBS ile süspansiyon edildi ve 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı.
- Hücreler 200 µL 1X Bağlama Tamponu (1X Binding Buffer) ile süspansiyon edildi.

- 195 µL hücre süspansiyonuna 5 µL Anneksin V-FITC eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Hücreler inkübasyon sonrasında 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı ve 190 µL 1X Bağlama Tamponu ile süspanse edildi.
- 10 µL PI eklenerek flow sitometride analiz gerçekleştirildi.

Analiz, "BD Accuri™ C6 Flow Cytometer" cihazında "CFlow Plus v1.0.264.15" yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre boyutu ile ilgili bilgi veren ileri ışın saçılımı (FSC) ve partiküllerin granül içeriği hakkında bilgi veren yan ışın saçılımı (SSC) parametreleri ile oluşan grafikte kapılama işlemi yapıldı. Anneksin V-FITC için FL1-A ve PI için FL2-A kanalları kullanılarak bu parametrelerle oluşan grafikte kapılama alanı içerisine düşen hücrelerin apoptotik durumları analiz edildi.

3.3.2.1. ELISA yöntemi

Human prostat kanseri LNCaP ve VCaP hücre hatları 1milyon/ml olacak şekilde 6 oyuklu plaklara ekildikten sonra etken maddeler uygulandı ve 72 saat sonra hücreler toplandı 20 dk 2000-3000 rpm de santrifüj edildi daha sonra 3 kez dondur-çöz uygulaması yapılarak tekrar 20 dk 2000-3000 rpm de santrifüj uygulandı ve Human Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) ELISA Kit'i, Human Apoptotic peptidase activating factor-1 (Apaf-1) ELISA Kit'i, Cytochrome C,Cyt-C ELISA Kit'i, Human Caspase-3 ELISA Kit'i, Human Caspase-8 ELISA Kit'i ve Human Caspase-9 ELISA Kit'i uygulanarak etkinin belirlenmesi sağlanmıştır.

3.4. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 7.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) ile yapıldı. P değerleri, çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılarak iki yönlü ANOVA ile hesaplandı.

4. Bulgular

4.1. LC MS / MS Sonuçları

Kuşburnu çaylarında farklı zaman noktalarında kaynama ve demlenme ile fenolik moleküllerin miktarı belirlenmiştir. Kaynama ile elde edilen fenolik bileşiklerin miktarı, demlenmeye göre daha yüksektir. Verilerimiz, tüm flavonollerin, kaynatılmış ticari çay (kurutulmuş kuşburnu) numunelerinde, zamana bakılmaksızın yüksek olduğunu göstermiştir, ancak demlenmiş ticari çaydaki en yüksek seviyeler 3. dakikada gözlenmiştir. 7 dakika kaynamış meyve, 5 dakika kaynamış parçalanmış meyve, 7 dakika kaynamış ticari çay ve hücre kültürü çalışmaları için 3 dakika demlenmiş ticari çay, en yüksek fenolik bileşiklere sahip olduğu için bu 4 çay örneği seçilmiştir. Kuşburnu çayı örnekleri, hücre büyümesi inhibisyon testleri için kullanılmadan önce taze olarak hazırlanmıştır.

Şekil 7 ve Tablo 3’de Kuşburnu çaylarında farklı zaman noktalarında kaynama ve demleme ile fenolik moleküllerin (ng / mL) içeriği, Gösterilmiştir.

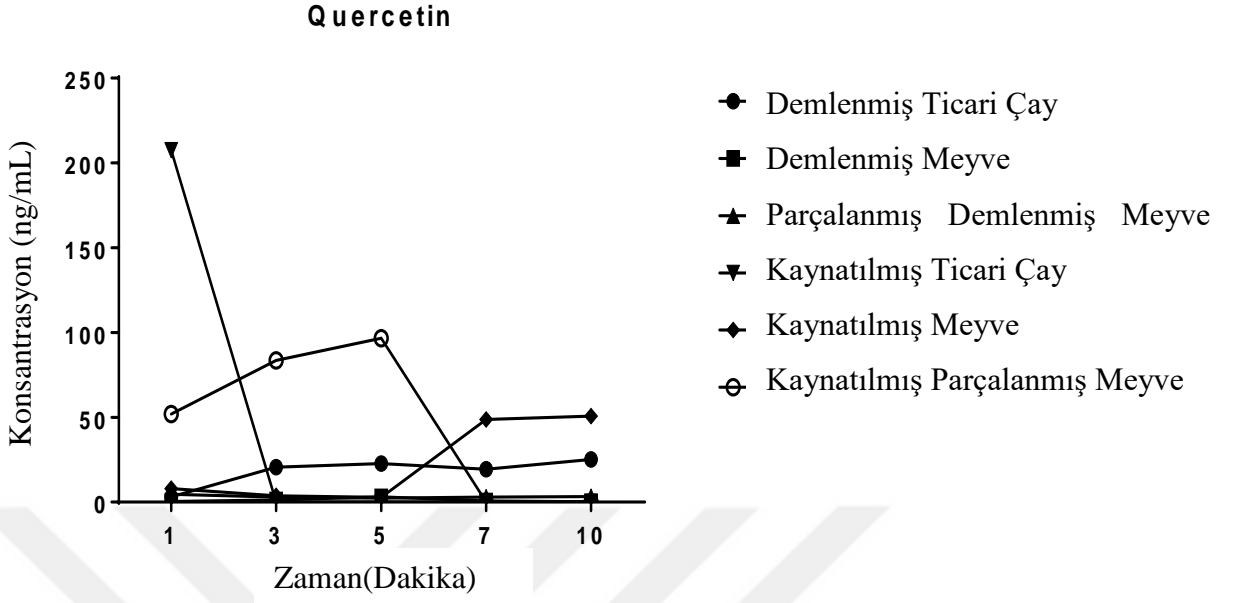
Kuarsetin kaynamış ticari çayda bir dakikada maksimum konsantrasyona yani 200 ng/mL’e ulaşmıştır. kaynatılmış parçalanmış meyve ekstraktında 5’inci dakikada 100 ng/mL oranında konsantrasyona ulaşmıştır.

Kamferol en fazla parçalanmış meyve ekstraktlarından elde edilmiş ve 5 dakikada maksimum konsantrasyona (91ng/mL) ulaşmıştır. Kamferol, kaynatılmış ticari çayda da maksimum konsantrasyona 7. dakikada ulaşmıştır.

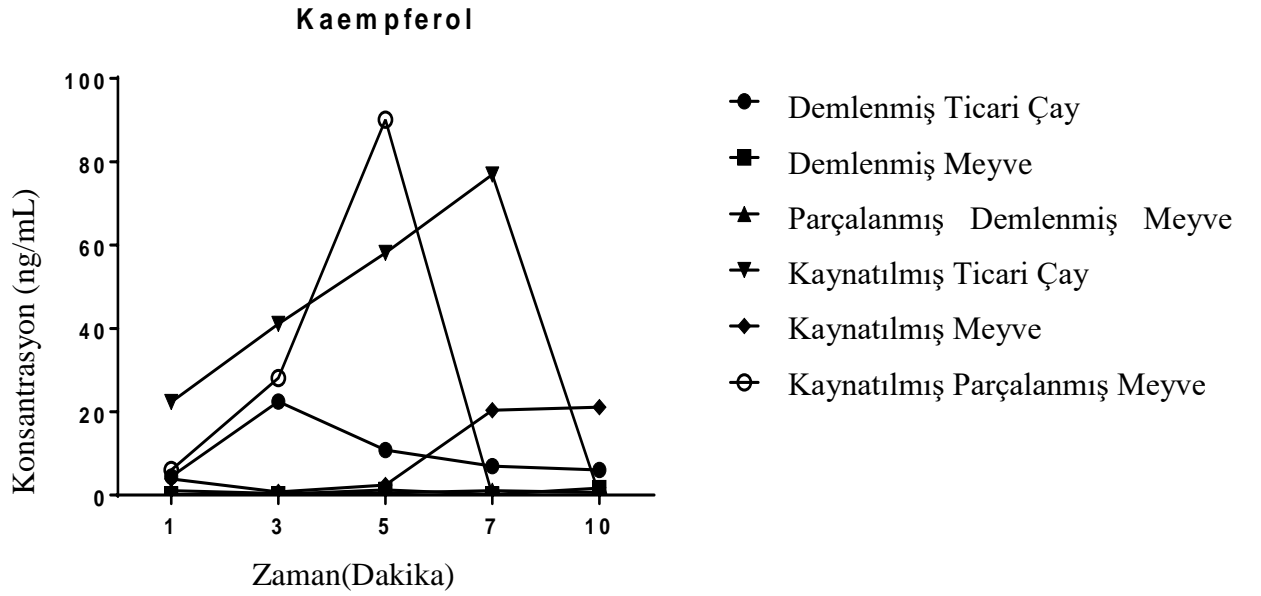
Mirisetin ise kaynatılmış ticari çay ekstraktlarında 7. Dakikada 150 ng/mL konsantrasyona ulaşmıştır.

Ellajik asit ise, kaynatılmış ticari çayda 200 ng/mL üzerinde, kaynatılmış meyve ise 200 ng/mL oranında konsantrasyona ulaşmıştır.

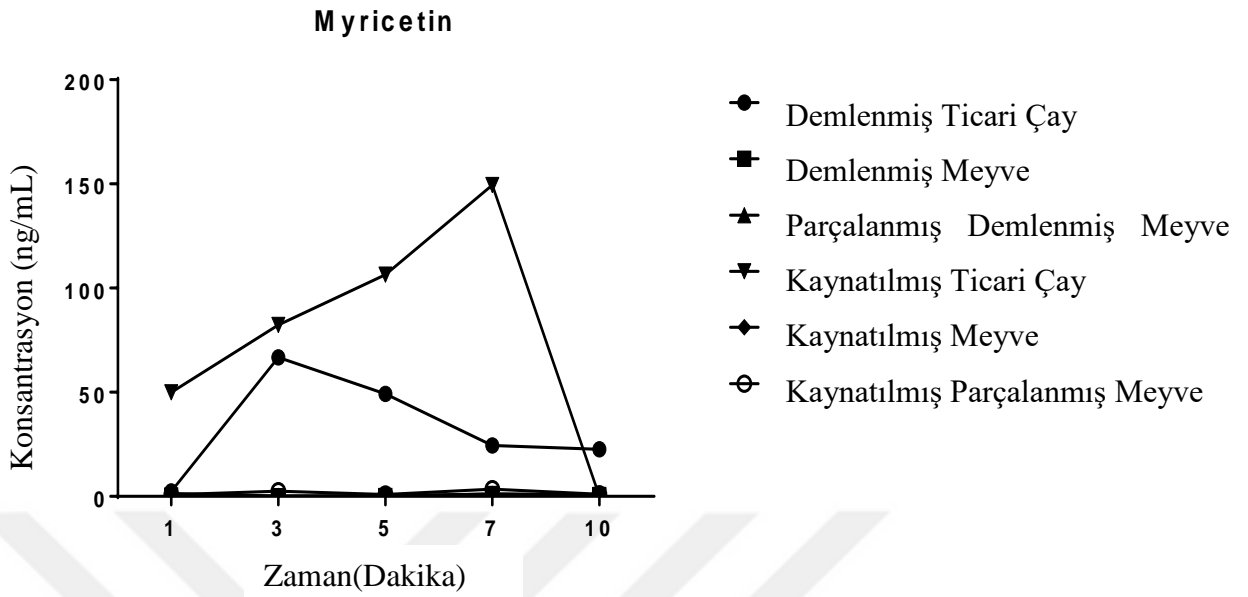
A.



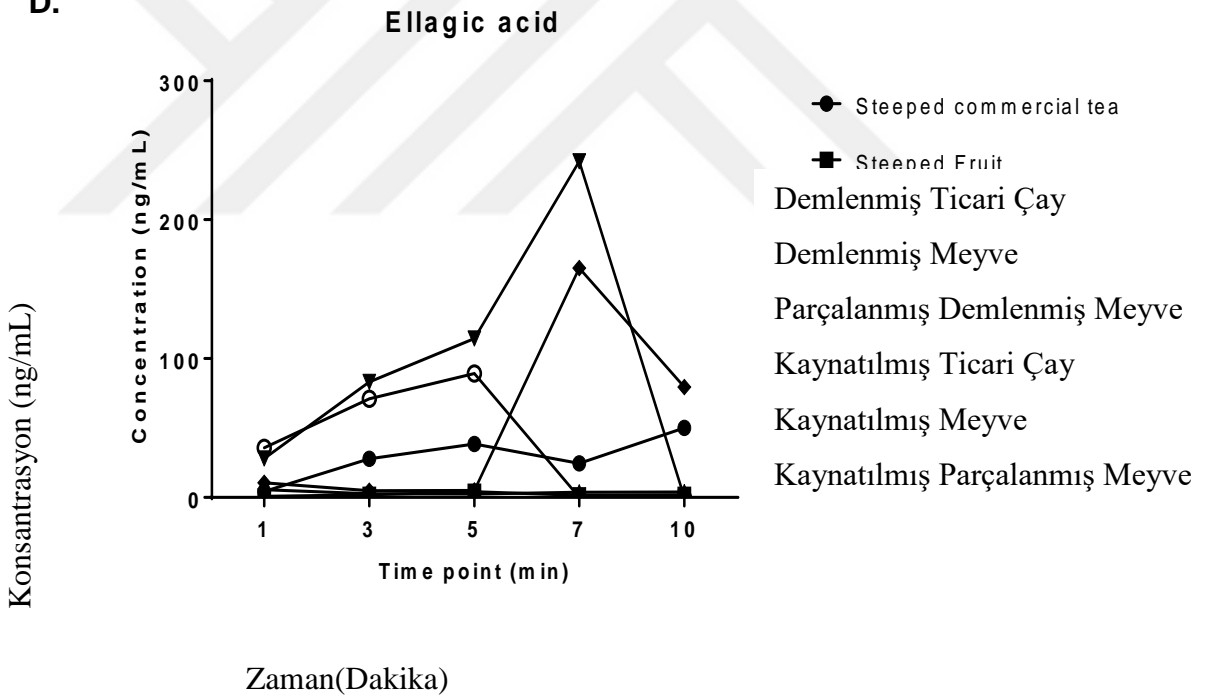
B.



C.



D.



Şekil 7. Kuşburnu çaylarında fenolik moleküllerin (ng / mL) içeriği, farklı zaman noktalarında kaynama ve demleme ile elde edilmiştir. A. Kuarsetin içeriği, B. Kamferol içeriği, C. Mirisetin içeriği ve D. Ellajik asit içeriği.

Tablo 3. Kuşburnu çaylarında fenolik moleküllerin (ng / mL) içeriği, farklı zaman noktalarında kaynama ve demleme ile elde edilmiştir.

A. Demlenmiş Ticari Çay, B. Demlenmiş Meyve, C. Parçalanmış Demlenmiş Meyve, D. Kaynatılmış Ticari Çay, E. Kaynatılmış Meyve, F.Kaynatılmış Parçalanmış Meyve.

A.

Demlenmiş Ticari Çay	1dk (ng/ml)	3dk (ng/ml)	5dk (ng/ml)	7dk (ng/ml)	10dk (ng/ml)
Kaemferol	4.43	22.46	10.84	6.96	6.06
Mirisetin	2.4	66.72	49.25	24.39	22.57
Ellajik asit	4.26	27.94	38.59	24.56	50.16
Kuarsetin	3.1	20.53	22.77	19.39	25.13

B.

Demlenmiş Meyve	1dk (ng/ml)	3dk (ng/ml)	5dk (ng/ml)	7dk (ng/ml)	10dk (ng/ml)
Kaemferol	0.15	0.2	1.28	0.14	1.71
Mirisetin	0.37	0.11	0.13	1.15	0.72
Ellajik asit	0.86	1.84	4.06	1.61	1.92
Kuarsetin	0.41	1.24	3.08	0.65	0.23

C.

Parçalanmış Demlenmiş Meyve	1dk (ng/ml)	3dk (ng/ml)	5dk (ng/ml)	7dk (ng/ml)	10dk (ng/ml)
Kaemferol	1.05	0.38	0.52	1.05	0.62
Mirisetin	0.038	0	0.07	0.025	0.093
Ellajik asit	5.54	2.63	2.57	3.7	4.01
Kuarsetin	4.58	2.91	2.4	2.97	3.32



D.

Kaynatılmış Ticari Çay	1dk (ng/ml)	3dk (ng/ml)	5dk (ng/ml)	7dk (ng/ml)	10dk (ng/ml)
Kaemferol	22.33	41.06	58.13	76.96	0
Mirisetin	49.99	82.25	106.44	149.46	0
Ellajik asit	27.97	83.21	114.38	242.05	0
Kuarsetin	207.51	0	0	0	0

E.

Kaynatılmış Meyve	1dk (ng/ml)	3dk (ng/ml)	5dk (ng/ml)	7dk (ng/ml)	10dk (ng/ml)
Kaemferol	3.87	0.74	2.43	20.39	21.11
Mirisetin	1.44	0.24	0.26	1.14	0.79
Ellajik asit	10.54	4.94	5.05	165.1	79.54
Kuarsetin	8.03	3.08	2.75	48.78	50.68

F.

Kaynatılmış Parçalanmış Meyve	1dk (ng/ml)	3dk (ng/ml)	5dk (ng/ml)	7dk (ng/ml)	10dk (ng/ml)
Kaemferol	6.04	28.12	90.12	0	0
Mirisetin	0.78	2.55	0.89	3.47	1.07
Ellajik asit	35.82	71.02	89.24	0	0
Kuarsetin	51.86	83.58	96.69	0	0

4.2. Fenolik bileşiklerin VCaP ve LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

Tablo 4 ve 5'te VCaP ve LNCaP IC₅₀ değerleri verilmiştir. Buna göre VCaP hücre kültüründeki denemelerde, 72. saatte en düşük konsantrasyon olarak Kamferol en iyi IC₅₀ dozunu vermiştir.

LNCaP hücre kültürlerinde ise Kuarsetin 24 saat içerisinde en düşük konsantrasyon uygulandığında en iyi IC₅₀ dozunu vermiştir.

Tablo 4. VCaP hücre kültüründeki fenolik bileşikler için IC₅₀ değerleri.

	24th h	48th h	72nd h
Kuarsetin	193 µM	343 µM	204 µM
Kamferol	4.17 µM	5.74 µM	2.06 µM
Mirisetin	17 µM	24.5 µM	30.8 µM
Ellajik asit	25.9 µM	45.4 µM	11.8 µM

Tablo 5. LNCaP hücre kültüründeki fenolik bileşikler için IC₅₀ değerleri.

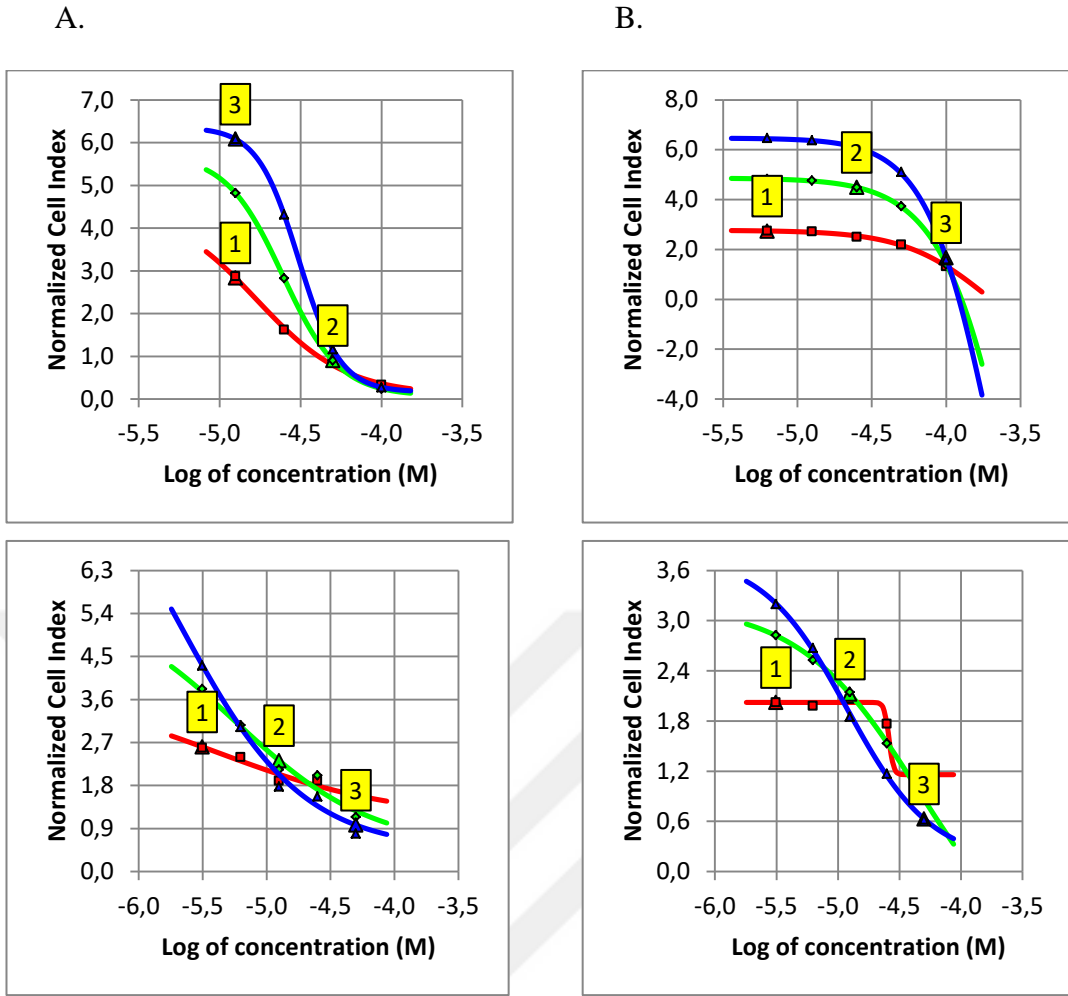
	24th h	48th h	72nd h
Kuarsetin	14.5 µM	31.7 µM	32.2 µM
Kamferol	33.3 µM	28.3 µM	26.2 µM
Mirisetin	53.8 µM	55.3 µM	54.5 µM
Ellajik asit	23.9 µM	24.3 µM	24.7 µM

Kuşburnu çayı örneklerinde hücre kültürüne eklenecek flavonollerin son konsantrasyonları Tablo 6'te sunulmuştur. Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asidinin sitotoksik etkileri, RTCA Software tarafından 24., 48. ve 72. saatlerde normalize edilmiş hücre indeksinin doz-cevap eğrilerine dayanılarak belirlenmiştir. Hesaplanan fenolik bileşiklerin IC₅₀ değerleri Tablo 4 ve 5'te ve doz-cevap eğrileri Şekil 8 ve 9'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Hücre hattına ($\mu\text{mol} / \text{L}$) eklenen çay örneklerinin flavonol konsantrasyonu.

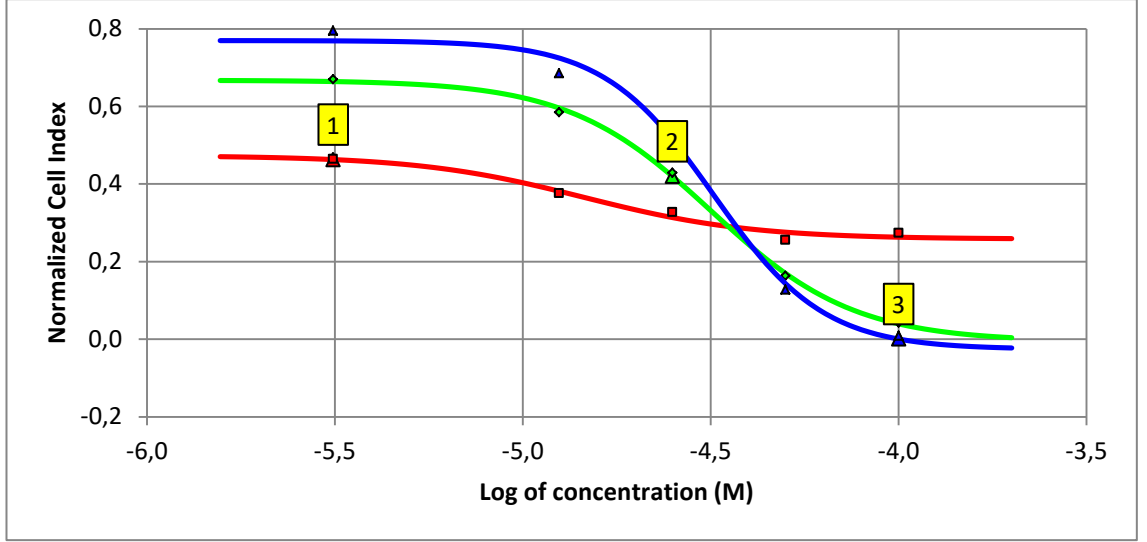
	Kuarsetin	Kamferol	Ellajik asit	Mirisetin
7 dakika kaynamış meyve	9,45	1,38	0,18	0,04
5 dakika kaynamış ve parçalanmış meyve	5,42	2,68	0,11	0,03
7 dakika kaynamış ticari çay	51,8	2,35	1,35	1,95
3 dakika demlenmiş ticari çay	50,4	2,21	1,2	1,85

Tablo 6'te Hücre hattına ($\mu\text{mol} / \text{L}$) eklenen çay örneklerinin flavonol konsantrasyonu görülmektedir. Buna göre 7 dk kaynamış ticari çay ve 3 dk demlenmiş ticari çay tüm flavonolleri en yüksek konsantrasyonda hücreye vermiştir.



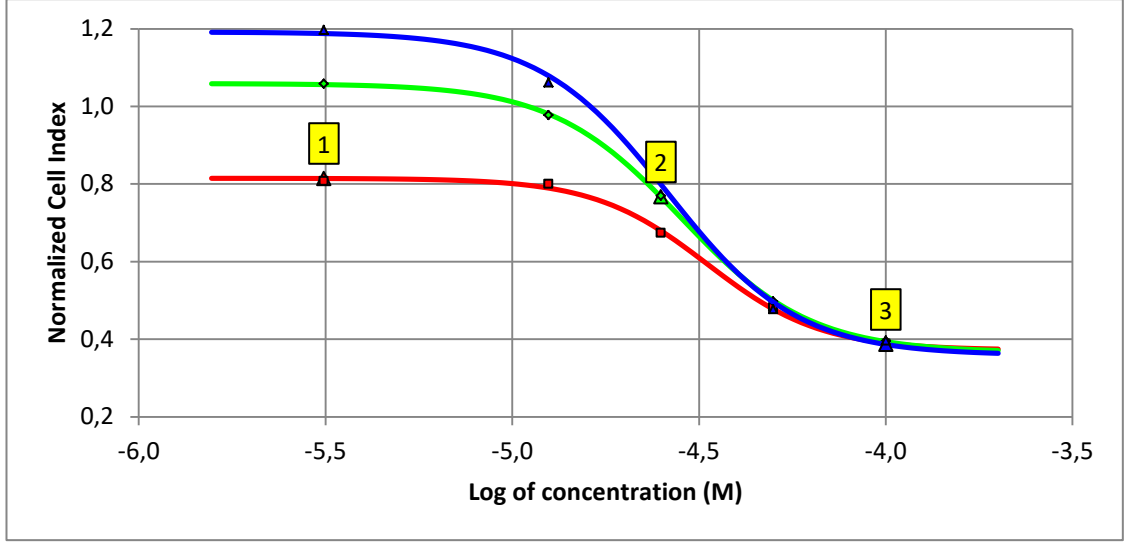
Şekil 8. Fenolik bileşiklerin VCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi. A. Kuarsetin'in IC₅₀ eğrileri, B. kamferol'ün IC₅₀ eğrileri, C. Mirisetin IC₅₀ eğrileri, D. Ellajik asitin IC₅₀ eğrileri. (1; 24 saat, 2; 48 saat ve 3; 72 saat).

Şekil 8'de verilen bilgilere göre, Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asitin sitotoksik IC₅₀ değerleri ve etkileri 24 saat, 48 saat ve 72 saat olarak gözlemlenmiştir. 8A'da görüldüğü gibi, Kuarsetin doz bağımlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. 8B'de ise Kamferolün doza bağımlı olarak hücreleri daha yavaş öldürdüğü gözlemlenmiştir. En etkin maddenin ise Kuarsetin olduğu gözlemlenmiştir. 8C'de süre uzadıkça dozdan bağımsız bir azalma görülmektedir. 8D'de ise Ellajik asit etkinliği görülmemektedir.



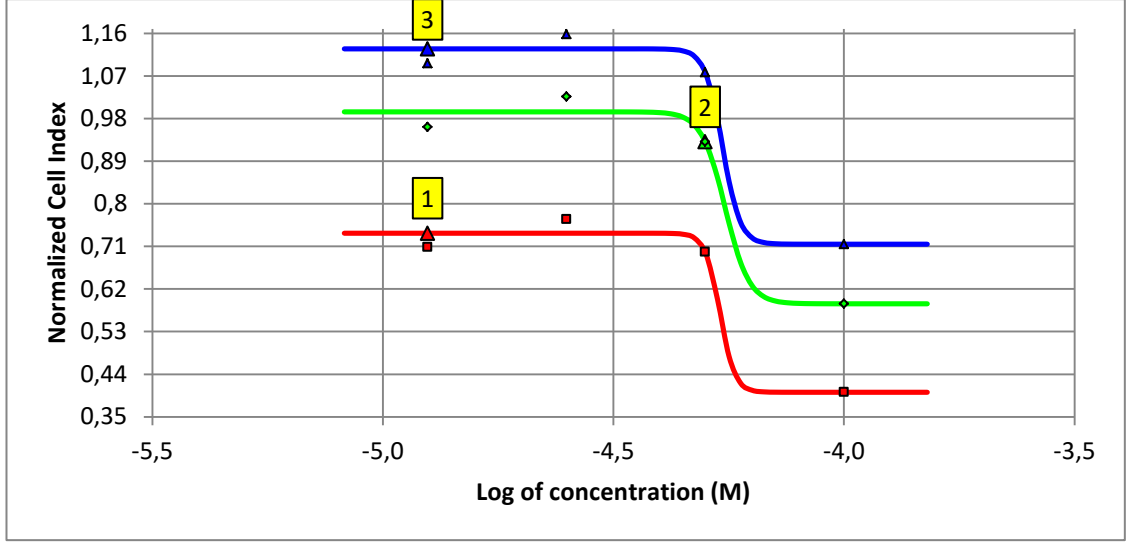
Şekil 9A. Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi. Kuarsetin'in IC₅₀ eğrileri. (1; 24 saat, 2; 48 saat ve 3; 72 saat).

Şekil 9A'da verilen bilgilere göre, 72 saatlik Kuarsetin IC₅₀ dozu belirgin şekilde, 72 saatlik ölçüm için en iyisi olduğu görülmüştür. Burada Kuarsetin dozunun sürece bağlı olarak hücreleri daha yavaş öldürdüğü görülse de etkinliği görülmektedir.



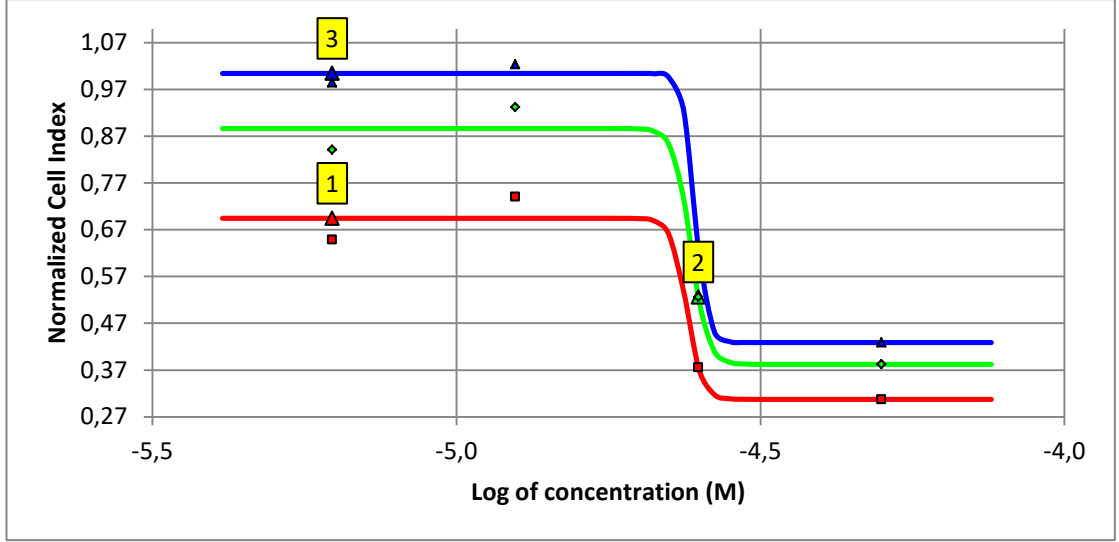
Şekil 9B. Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi. Kamferol'ün IC₅₀ eğrileri. (1; 24 saat, 2; 48 saat ve 3; 72 saat).

Şekil 9B'de ise Kamferolün, daha etkin olduğu IC₅₀ eğrilerinde görülmektedir. Bu şekilden çıkan sonuca göre Kamferol kanser hücreleri üzerinde daha etkin ve öldürücü bir rol oynadığı belirlenmiştir. Böylelikle IC₅₀ doz değerleri olarak Kamferol en iyi etken madde olarak belirlenmiştir.



Şekil 9C. Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi. Mirisetin IC₅₀ eğrileri. (1; 24 saat, 2; 48 saat ve 3; 72 saat).

Şekil 9C’de ise mirisetin etken maddesinin IC₅₀ doz değerlerine bakıldığında ise hücrelerin doz bağımlı süreçte, sabit bir fazda seyrettiği görülmektedir. Sabit faz sonrasında ise hücrelerin doza bağımlı mı, yoksa bir süre sonra kendiliğinden apoptoza uğrayıp öldüğü sorusu ise belirsizdir. Bu nedenle mirisetinin etkinliğinin bu hücre hatlarında olmadığı görülmüştür.



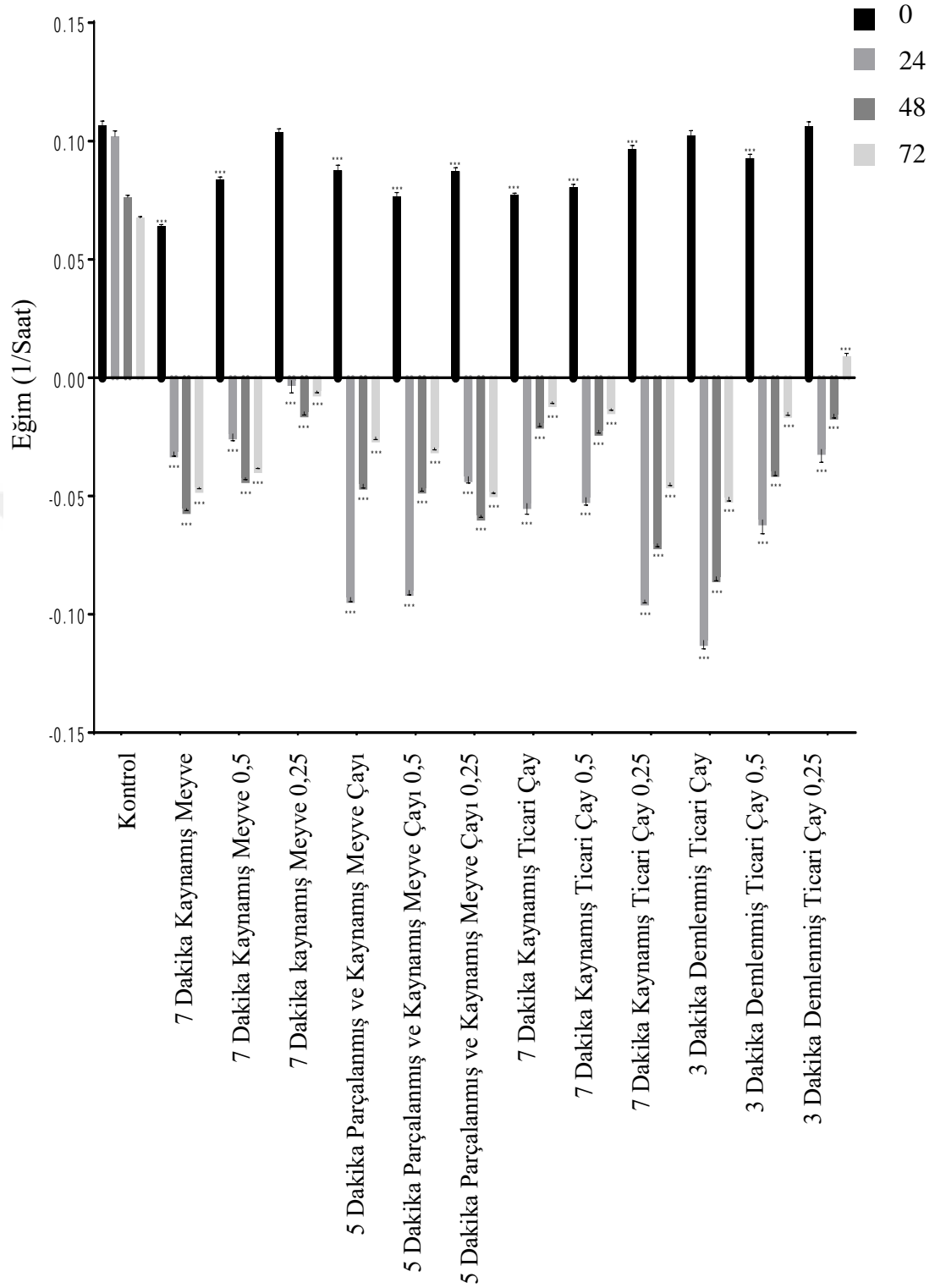
Şekil 9D. Fenolik bileşiklerin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi. Ellajik asitin IC_{50} eğrileri. (1; 24 saat, 2; 48 saat ve 3; 72 saat).

Şekil 9D'de ise ellajik asitin, Şekil 9C'de verilen eğrilerdekine benzerlikte bir etkinliğinin olmadığı görülmektedir. Burada da bir durgunluk fazı söz konusudur. Bu şekilde bakıldığında hedef kanser hücrelerinde doz bağımlı bir azalma söz konusu değildir.

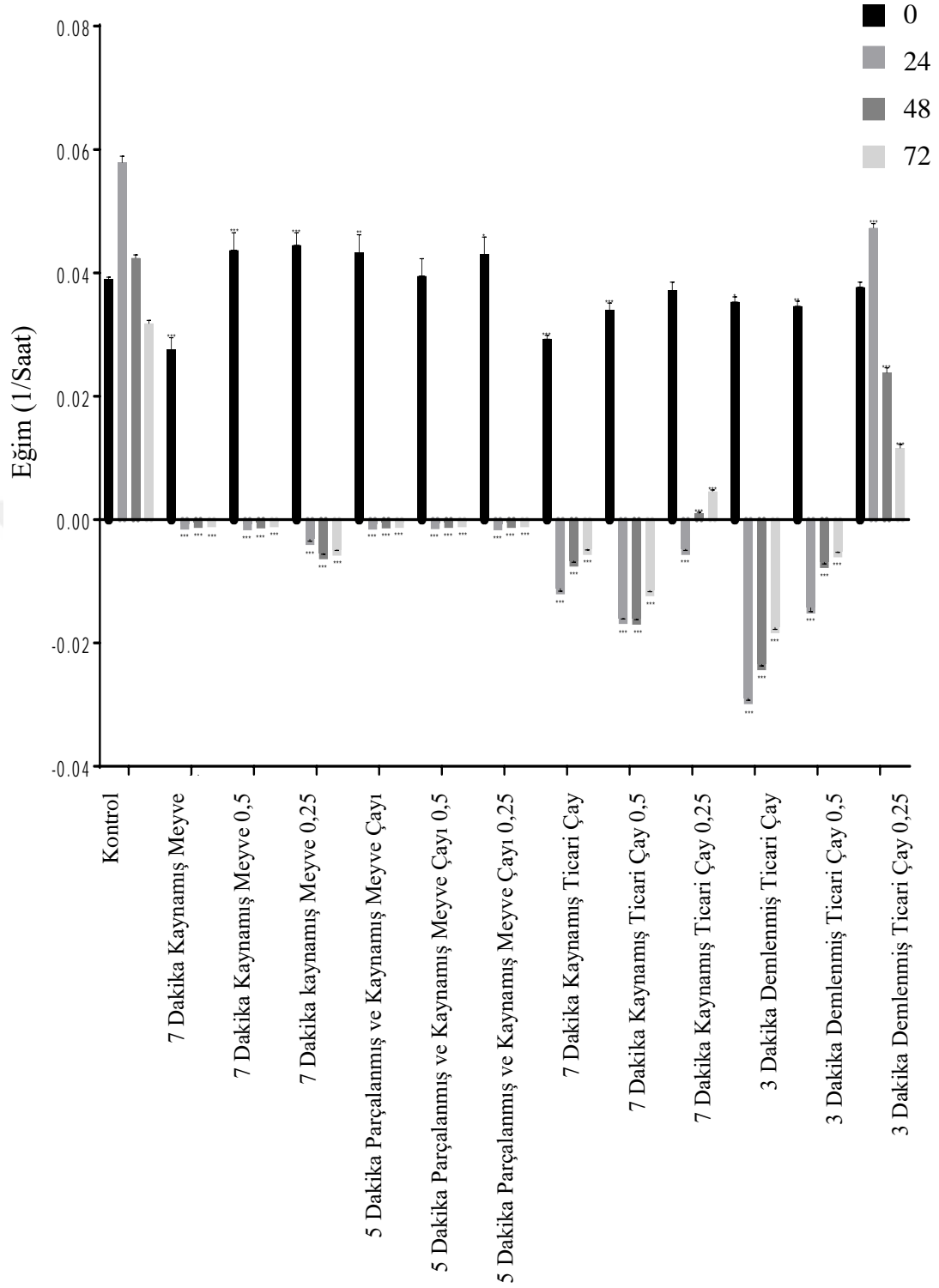
Bu çalışmalar sonucunda, Kuarsetin ve Kamferolün etkinliği gözle görülür bir şekilde belirlenmiştir. Bu iki etken madde arasında ise Kamferolün etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Dolayısıyla kanser tedavisinde etken madde olarak kullanılabilme potansiyeli yüksektir.

4.3. Kuşburnu çaylarının büyüme inhibisyon etkileri

Kuşburnu çaylarının büyüme inhibisyon etkileri, RTCA yazılımı kullanılarak zamana ve doza bağlı şekilde hücre indeks değişikliklerine göre değerlendirilmiştir. Daha düşük eğim (1/h) grafikleri, Kuşburnu çaylarının büyüme inhibisyonu etkileri Şekil 10 ve 11'de gösterilmiştir. Şekil 10'da kuşburnu çayı, hücre indeksini ve VCaP hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı görülmüştür. Eğim (1/h), kuşburnu çayı muamelesinden sonra (24 saat) hücreler için hücre endeksinin değişim oranını, 0-24 saat, 24-48 saat, 48-72 saat ve 72-96 saat arasında hesaplanmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, bu etkilerin ekstraksiyon işleminin devam etmesi ve parçalamanın flavonolların daha fazla açığa çıkmasından sonra uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Şekil 11'de gösterilen kuşburnu çayının hücre indeksi ile LNCaP hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Eğim (1/h), kuşburnu çayı muamelesinden sonra (24 saat) hücreler için hücre endeksinin değişim oranını, 0-24 saat, 24-48 saat, 48-72 saat ve 72-96 saat arasında hesaplanmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir.



Şekil 10. Eğim (1 / h), kuşburnu çayı muamelesinden sonra (24 saat) VCaP hücreler için hücre endeksinin değişim oranını, 0-24 saat, 24-48 saat, 48-72 saat ve 72-96 saat arasında hesaplanmasını göstermiştir (*p<0,01, **p<0,001 ve ***p<0,0001).



Şekil 11. Eğim (1/ h), kuşburnu çayı muamelesinden sonra (24 saat) LnCap hücreler için hücre endeksinin değişim oranını, 0-24 saat, 24-48 saat, 48-72 saat ve 72-96 saat arasında hesaplanmasını göstermiştir (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ ve *** $p < 0,0001$).

4.4. Apoptozun belirlenmesi için kullanılan AnnexinV-FITC Analiz Sonuçları

4.4.1. LNCaP AnnexinV-FITC Analiz Sonuçları

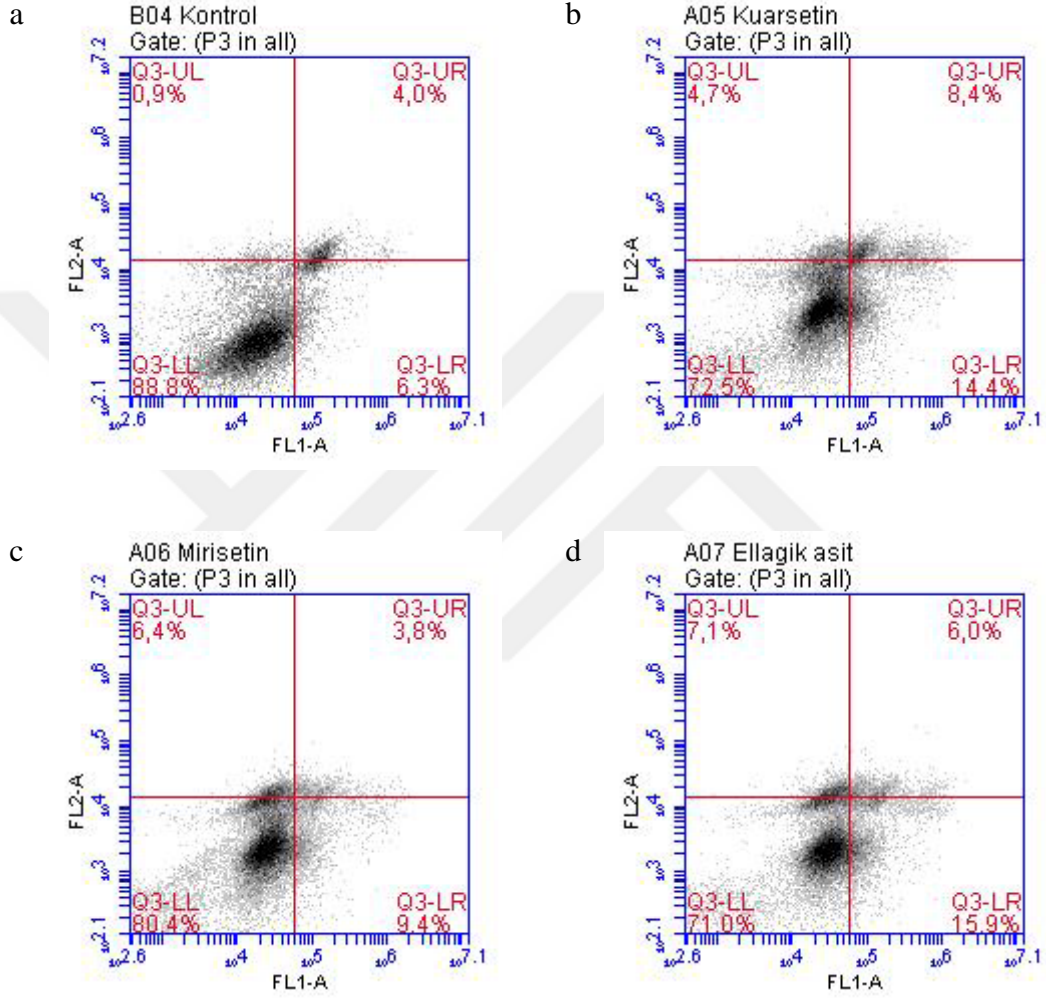
Tabloda verilen değerler flow görüntülerindeki hücre yüzdeleridir. Apoptozda kat değişimi değerlendirilirken erken ve geç Apoptotik hücre yüzdeleri toplanmıştır ve toplam Apoptotik hücre yüzdesi şeklinde kullanılarak Apoptotik kat değişimleri hesaplanmıştır.

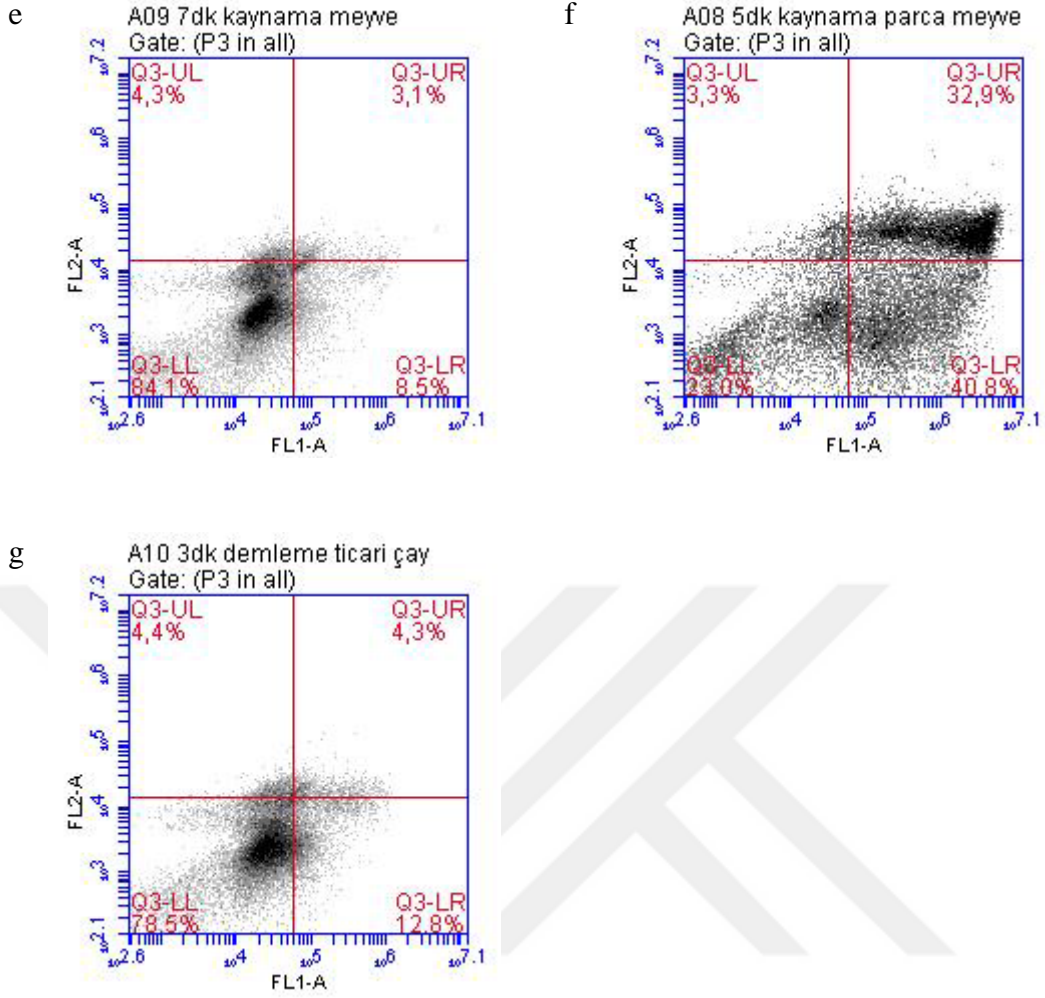
Tablo 7. 24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz sonuçları

	LL	LR	UR	UL
	Canlı hücre yüzdesi	Erken Apoptotik hücre yüzdesi	Geç Apoptotik hücre yüzdesi	Nekrotik hücre yüzdesi
Kontrol	% 88,76	%6,34	%4,00	%0,90
Kuarsetin	% 72,50	%14,35	%8,42	%4,73
Mirisetin	% 80,42	%9,43	%3,76	%6,39
Ellajik asit	% 70,98	%15,94	%5,97	%7,11
7dk kaynama meyve	% 84,13	%8,53	%3,09	%4,26
5dk kaynama parça meyve	% 22,98	%40,84	%32,88	%3,31
3dk demleme ticari çay	% 78,50	%12,82	%4,27	%4,41

Tablo 7’da verilen sonuçlara göre, AnnexinV ölçülerek apoptotik hücrelerin yüzdeleri belirlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, mirisetinin çok düşük apoptotik etki göstermiştir. Kuarsetin ve Ellajik asit ise özellikle erken apoptotik hücrelerin sayısını artırarak kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık 2,2 ve 2 kat olmak üzere apoptozu uyarılmışlardır. Nekrotik hücre sayısı da etken maddenin hedeflenen sistemde etkin olduğunu göstermektedir. Mirisetin uygulamasında ise apoptoz değil nekrozun tetiklendiği görülmektedir. Kuşburnu ekstraktlarının da

hücre kültürlerindeki sonuçlarına bakıldığında, kuşburnu meyvesinin parçalanması ile elde edilen ekstraktlarda, flavonollerin daha fazla açığa çıkmasından sonra, apoptotik hücrelerin artışı görülmüştür. Burada meyvelerin parçalanmasından sonra daha fazla flavonole maruz kalmasından ötürü daha fazla hücrenin apoptotik sürece girdiği görülmüştür.



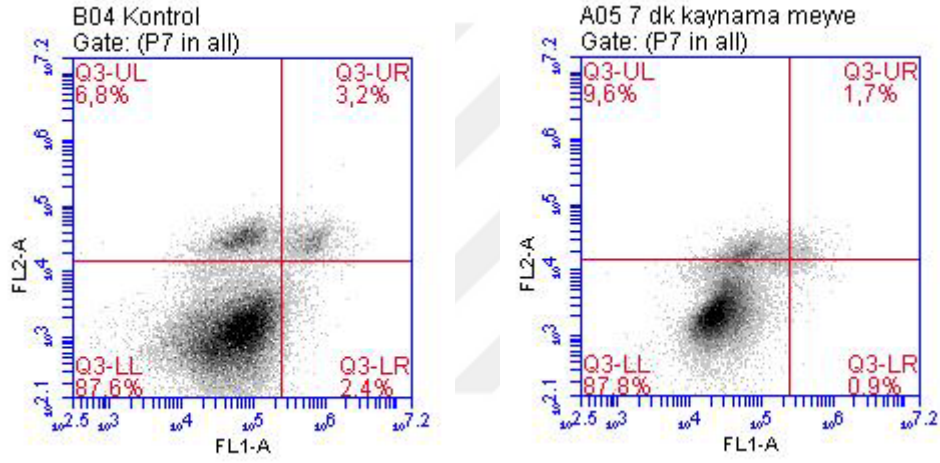


Şekil 12. 24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri

Şekil 12’de görülen, flavonollerin ve kuşburnu uygulanmış hücre hatlarının Apoptotik davranışları flow sitometrisi ile izlenmiştir. Kuşburnu bitkisinin parçalanması ile elde edilen ekstraktın 5dk kaynatma işleminden sonra, daha fazla flavonol açığa çıkması ile hücreleri Apoptotik yola götürdüğü şekil f’de görülmektedir. Burada Q3-LR kısmında görüldüğü gibi, erken Apoptotik döneme giren hücrelerin yoğun olduğunu (% 40,8), aynı zamanda, Q3-UR kısmında da % 32,9’lık bir kısmın da geç Apoptotik döneme yani hücre bütünlüğünün bozulduğu bir döneme girdiğini görebilmekteyiz.

Tablo 8. 48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz sonuçları

	LL	LR	UR	UL
	Canlı hücre yüzdesi	Erken Apoptotik hücre yüzdesi	Geç Apoptotik hücre yüzdesi	Nekrotik hücre yüzdesi
Kontrol	%87,58	%2,37	%3,25	%6,81
7 dk kaynama meyve	%87,81	%0,91	%1,66	%9,62

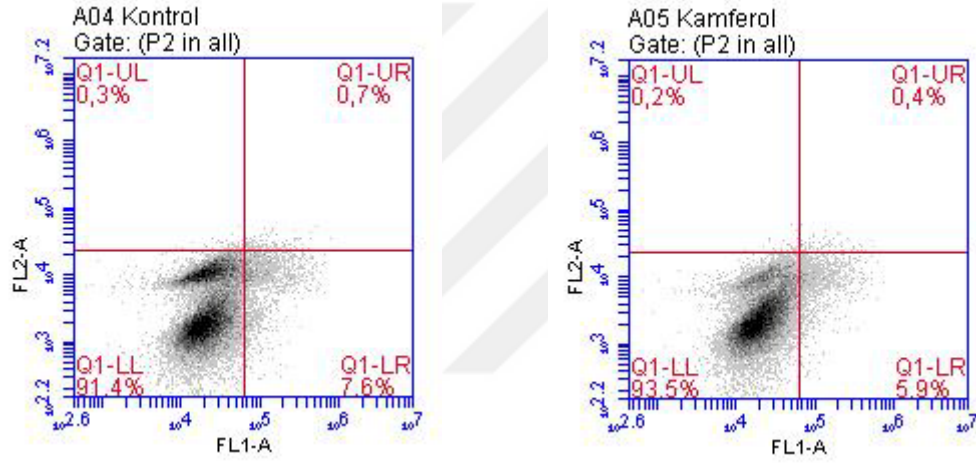


Şekil 13. 48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri

Tablo 8' AnnexinV-FITC ve Şekil 13'te görülen verilere göre, kuşburnu bitkisinin 7dk kaynatılmış meyvenin (parçalanmadan kaynatılmış meyve) 48 saatlik uygulamasından sonra Apoptotik süreç üzerinde uyarıcı bir etkisinin olmadığı ve ekstraksiyon işleminin başarısız olduğu, bu nedenle de işlemin uygulanabilirliğinin olmadığı görülmüştür.

Tablo 9. 72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz sonuçları

	LL	LR	UR	UL
	Canlı Hücre Yüzdesi	Erken Apoptotik Hücre Yüzdesi	Geç Apoptotik Hücre Yüzdesi	Nekrotik Hücre Yüzdesi
Kontrol	%91,38	%7,56	%0,70	%0,35
Kamferol	%93,47	%5,94	%0,40	%0,19



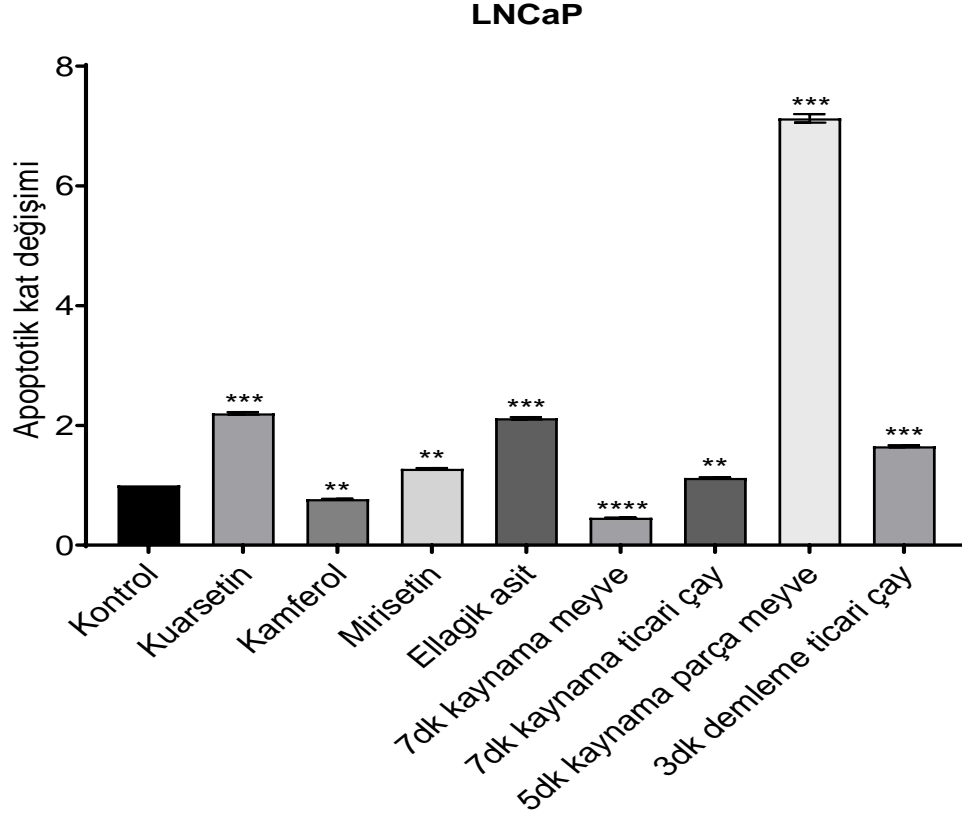
Şekil 14. 72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri

Tablo 9 ve Şekil 14'te elde edilen verilere göre, Kamferolün 72 saatlik uygulama sonrasında kontrol grubuna kıyasla apoptotik değişim görülmemiştir.

Tablo 10 ve şekil 15’da ise, LNCaP hücre hattındaki apoptotik kat değişimi 5 dakika parçalanmış kaynatılmış kuşburnu meyvesinin apoptotik aktiviteyi 7,13 kat artırdığı gözlenmiştir.

Tablo 10. LNCaP hücre hattındaki Apoptotik Kat Değişimi.

	Apoptotik Kat Değişimi	p değerleri
Kontrol	1	
Kuarsetin	2,202128	0,0003
Kamferol	0,767554	0,0011
Mirisetin	1,275629	0,0021
Ellajik asit	2,118956	0,0004
7dk kaynama meyve	0,457295	<0,0001
7dk kaynama ticari çay	1,123791	0,0081
5dk parça kaynama meyve	7,129594	0,0001
3dk demleme ticari çay	1,652805	0,0006



Şekil 15. LNCaP hücrelerinde fenolik bileşiklerin ve kuşburnu çay uygulamalarının kontrol grubuna göre Apoptotik kat değişimleri (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$).

Şekil 15’da elde edilen veriler ıŐığında, LNCaP hücrelerinde fenolik bileşiklerin ve kuşburnu çay uygulamalarının kontrol grubuna göre Apoptotik kat değişiminlerindeki istatistiksel anlamlılık GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) yazılımı ile test edildi. “p” değerleri “Dunnett's multiple comparisons” testi uygulanarak tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile hesaplandı.

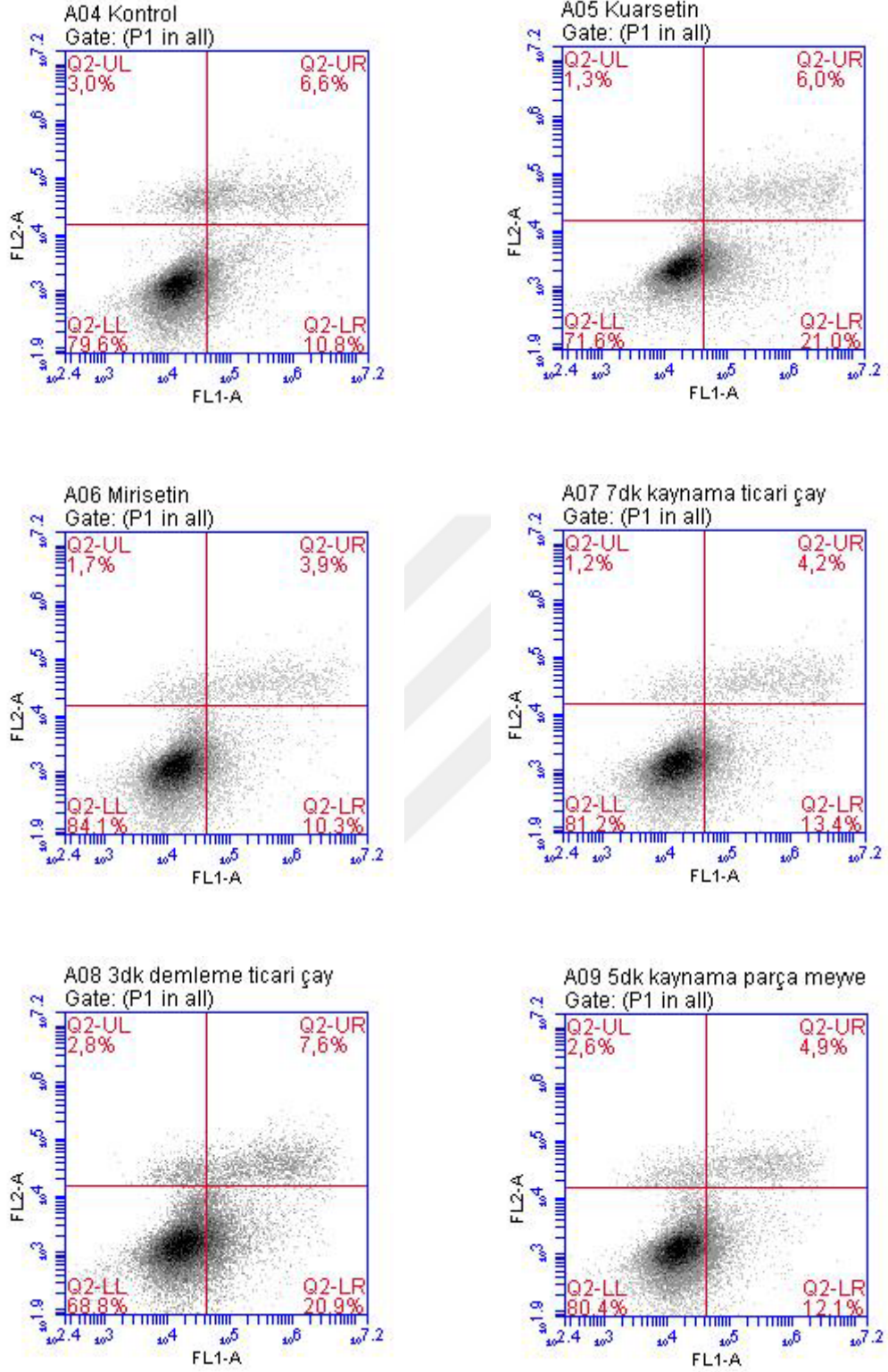
4.4.2. VCaP AnnexinV-FITC Analiz Sonuçları

Tablo 11’da verilen değerler flow görüntülerindeki hücre yüzdeleridir. Apoptozda kat değişimi değerlendirilirken erken ve geç apoptotik hücre yüzdeleri toplandı ve toplam apoptotik hücre yüzdesi şeklinde kullanılarak apoptotik kat değişimleri hesaplandı.

Tablo 11. 24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz sonuçları

	LL	LR	UR	UL
	Canlı Hücre Yüzdesi	Erken Apoptotik Hücre Yüzdesi	Geç Apoptotik Hücre Yüzdesi	Nekrotik Hücre Yüzdesi
Kontrol	%79,63	%10,78	%6,60	%2,99
Kuarsetin	%71,63	%21,04	%6,00	%1,33
Mirisetin	%84,10	%10,33	%3,87	%1,70
7dk kaynama ticari çay	%81,18	%13,40	%4,24	%1,17
3dk demleme ticari çay	%68,77	%20,87	%7,58	%2,79
5dk kaynama parça meyve	%80,40	%12,14	%4,86	%2,61

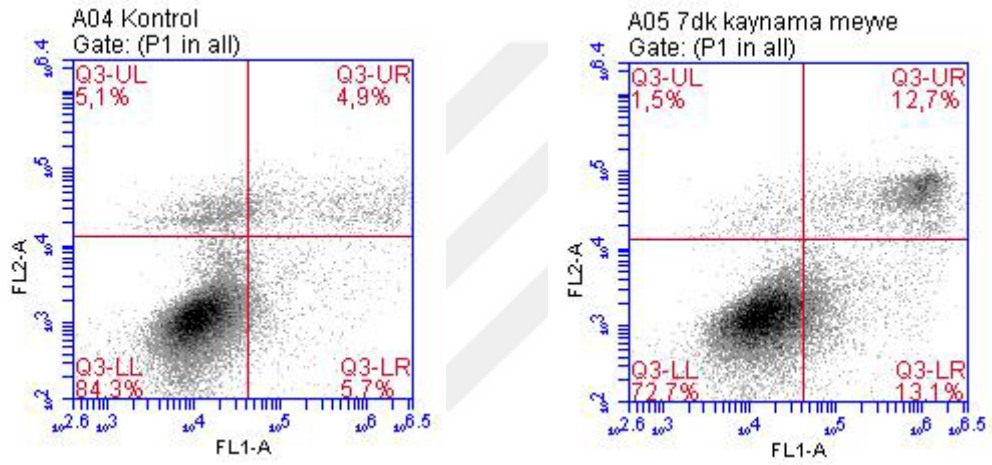
Tablo 11 ve Şekil 16’da görünen 24 saatlik uygulama sonrasında, flow sitometri analizlerine göre 3 dk demlenmiş ticari çay en fazla apoptotik aktiviteye sebep olan flavonol kaynağı olarak belirlenmiştir. Kuarsetin kontrol grubuna göre yaklaşık 1.5 kat olmak üzere apoptozu uyarmıştır.



Şekil 16. 24 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri

Tablo 12. 48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz sonuçları

	LL	LR	UR	UL
	Canlı hücre yüzdesi	Erken Apoptotik hücre yüzdesi	Geç Apoptotik hücre yüzdesi	Nekrotik hücre yüzdesi
Kontrol	%84,34	%5,70	%4,86	%5,10
7dk Kaynama Meyve	%72,68	%13,08	%12,72	%1,51

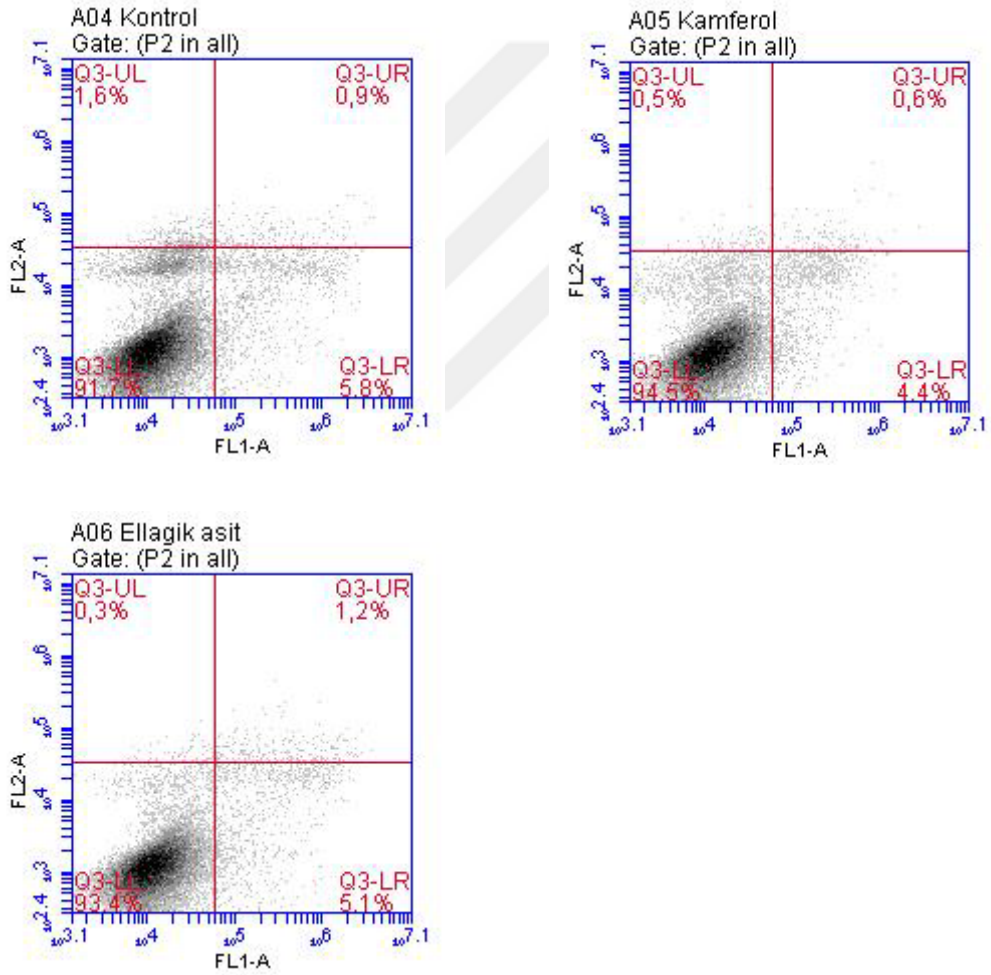


Şekil 17. 48 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri

Önceki verilerden de elde edildiği gibi, Tablo 12 ve Şekil 17’de flow sitometrisi diyagramında elde edilen veriye göre, 48 saatlik doz uygulaması sonrasında, 7 dakika kaynatılan kuşburnu meyve , %25,8 oranında apoptotik aktivite göstermeye neden olmuştur.

Tablo 13. 72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz sonuçları

	LL	LR	UR	UL
	Canlı hücre yüzdesi	Erken apoptotik hücre yüzdesi	Geç apoptotik hücre yüzdesi	Nekrotik hücre yüzdesi
Kontrol	%91,67	%5,79	%0,90	%1,64
Kamferol	%94,51	%4,39	%0,64	%0,46
Ellajik asit	%93,43	%5,06	%1,18	%0,34



Şekil 18. 72 saatlik uygulama sonrası flow sitometri analiz görüntüleri

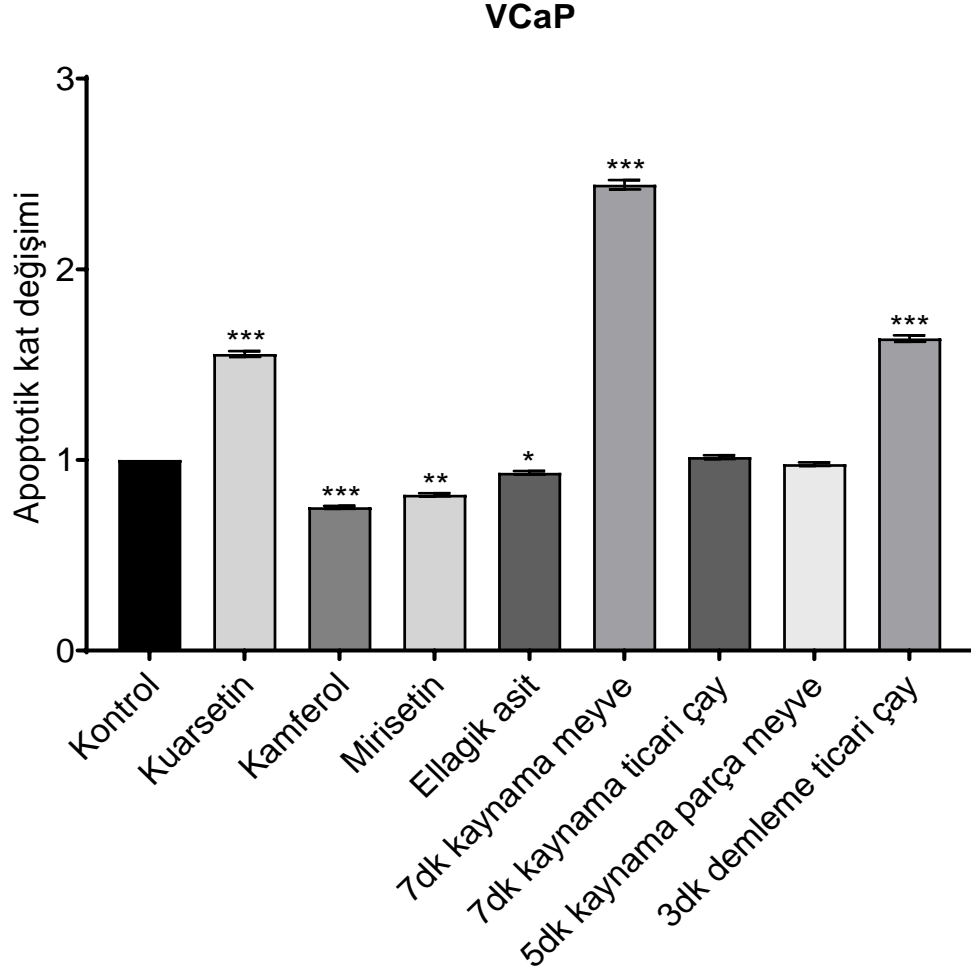
Tablo 13 ve Şekil 18’de görülen 72 saatlik Kamferol ve Ellajik asit uygulamasında ise apoptotik olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli oranda bir

değişiklik gözlenmemiştir. Erken apoptotik hücre yüzdesi kontrol grubunda %5,79, Kamferol uygulandığında %4,39 ve ellajik asit uygulandığında ise %5,06 olarak belirlenmiştir. Bu iki uygulamada apoptotik sürecin uyarılmadığı gözlenmiştir.

Tablo 14 ve şekil 19’da ise, VCaP hücre hattındaki apoptotik kat değişimi 7 dakika olarak kaynatılmış kuşburnu meyvesinin apoptotik aktiviteyi 2,44 kat artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte Kuarsetin ve 3 dakika olarak demlenmiş ticari çayında önemli apoptotik aktivite artışına neden olduğu belirlenmiştir.

Tablo 14. VCaP hücre hattındaki Apoptotik Kat Değişimi

	Apoptotik Kat Değişimi	p değerleri
Kontrol	1	
Kuarsetin	1,555811	0,0008
Kamferol	0,751868	0,0009
Mirisetin	0,817031	0,0020
Ellajik asit	0,932735	0,0187
7dk kaynama meyve	2,443182	0,0003
7dk kaynama ticari çay	1,01496	0,3365
5dk kaynama parça meyve	0,978136	0,1715
3dk demleme ticari çay	1,636939	0,0007



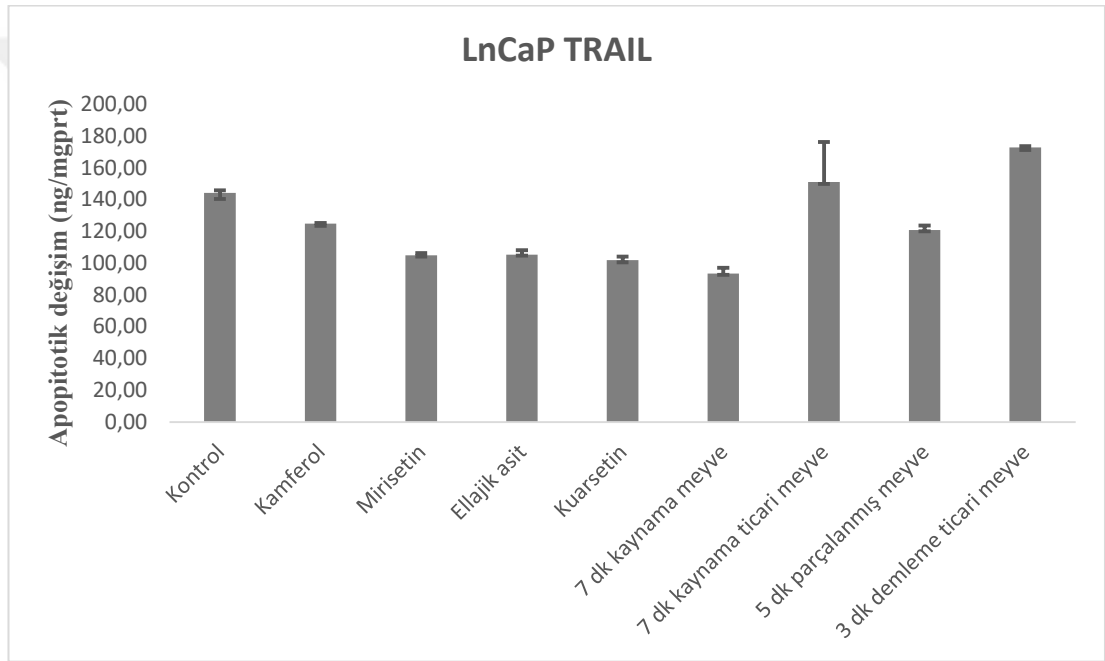
Şekil 19. VCaP hucelerinde fenolik bileşiklerin ve kuşburnu çay uygulamalarının kontrol grubuna gore Apoptotik kat değişimleri (* $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$).

Şekil 19’da elde edilen veriler iŐiđında, VCaP hucelerinde fenolik bileşiklerin ve kuşburnu çay uygulamalarının kontrol grubuna gore apoptotik kat deęiŐiminlerindeki istatistiksel anlamlılık GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) yazılımı ile test edildi. “p” değerleri “Dunnett's multiple comparisons” testi uygulanarak tek yonlu varyans analizi (one-way ANOVA) ile hesaplandı.

Bu sonuçlar ele alındığında, 7dk sureyle kaynatılmış parçalanmış kuşburnu meyveleri, kontrole gore 2,4 kat apoptozu indukleyerek VCaP hucelerinde apoptoz için en etkin uygulama olduğu bulunmuştur.

4.5. Apoptozun belirlenmesi için kullanılan ELISA kit sonuçları

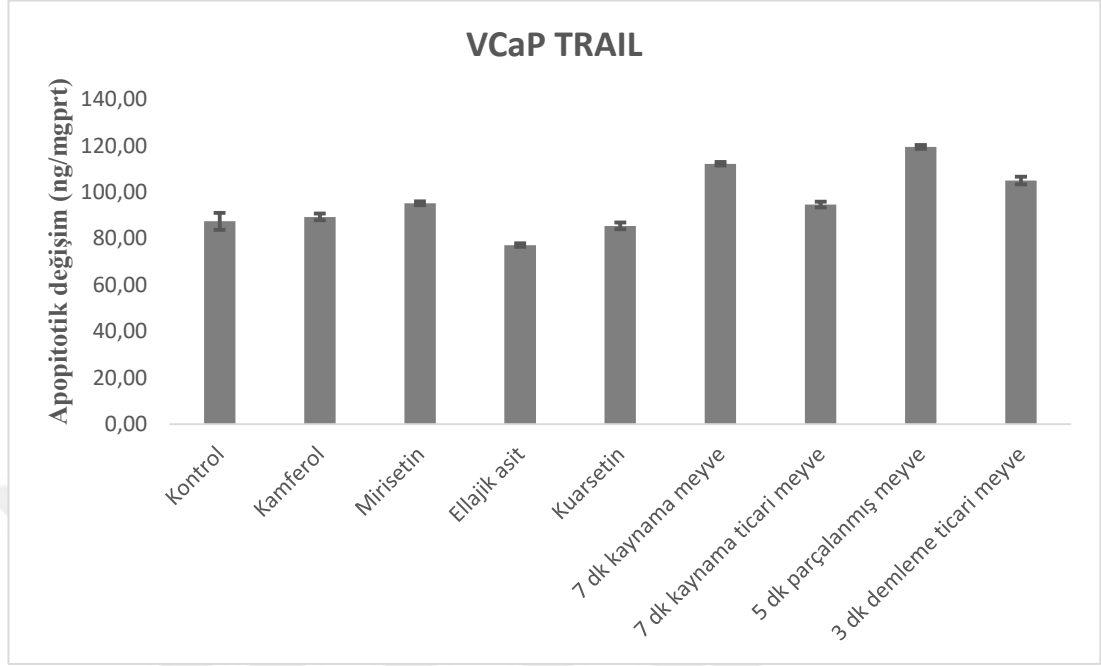
Şekil 20 olarak gruplandırılan verilere bakıldığında, kaspaz-8, kaspaz-3, sitokrom-C, TRAIL ve Apaf-1'in ölçülmesi ile apoptotik aktivite değerlendirilmiş ve bu şekilde flavonoidler ve kuşburnu çayı uygulanarak hedef biyobelirteçlerin artışına bağlı olarak apoptotik faaliyetlerin gerçekleştiği gösterilmiştir. TRAIL, Apaf-1, Sitokrom-C, Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 sonuçları Şekil 20, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J K ve L de gösterilmiştir (*p<0,1, **p<0,01 ve ***p<0,001).



Şekil 20 A. Apoptotik LNCaP değişiminin TRAIL ile gösterimi

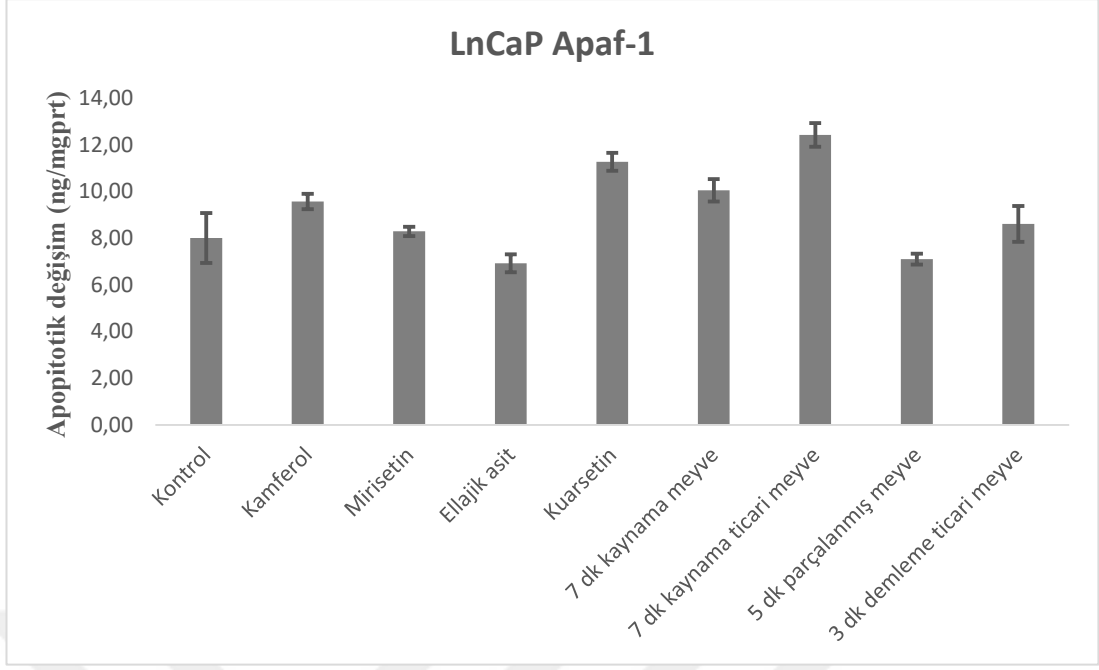
TRAIL ELISA KIT sonuçları TRAIL standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 125,019; 104,982; 105,488; 101,975; 93,476; 151,166; 121,040; 172,963 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafikte de görülmektedir ki en yüksek değer 172,963 ng/mgprt etken madde 3 dakika demlenmiş ticari meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 144,293 ng/mgprt

olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 3 dakika demlenmiş ticari meyve ve 7 dakika kaynamış ticari meyve ekstraktları anlamlı yüksek bulunmuştur.



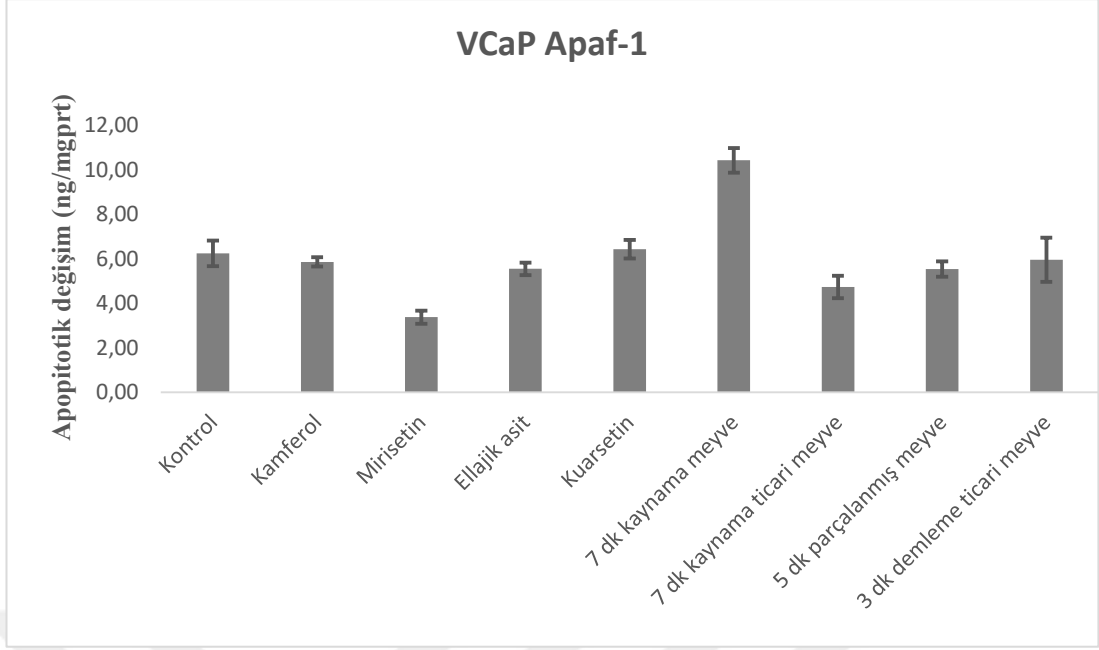
Şekil 20 B. Apoptotik VCaP değişiminin TRAIL ile gösterimi

Tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 89,391; 95,224; 77,255; 85,551; 112,332; 94,751; 119,538; 105,112 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 119,538 ng/mgprt 5 dakika kaynamış parçalanmış meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 87,512 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 5 dakika kaynamış parçalanmış meyve ve 7 dakika kaynamış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve ekstraktları anlamlı yüksek bulunmuştur.



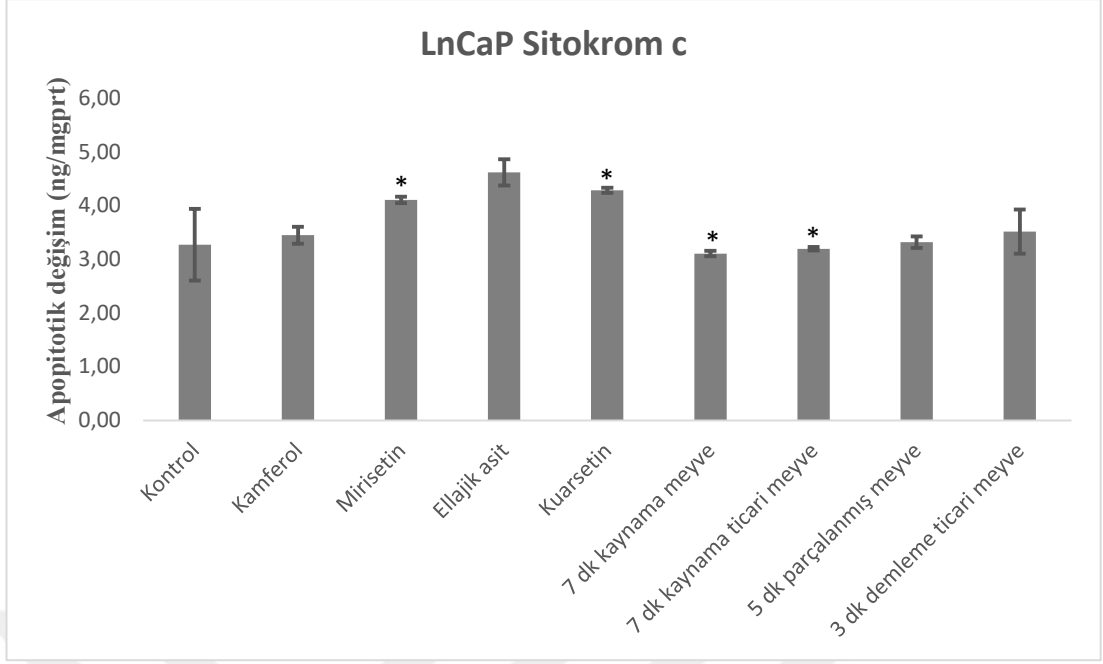
Şekil 20 C. Apoptotik LNCaP değişiminin Apaf-1 ile gösterimi

Apaf-1 ELISA KIT sonuçları Apaf-1 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 9,572; 8,295; 6,926; 11,269; 10,051; 12,424; 7,103; 8,613 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 12,424 ng/mgprt etken madde 7 dakika kaynamış ticari meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 8,005 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 7 dakika kaynamış ticari meyve ekstraktları ve kuarsetin anlamlı yüksek bulunmuştur.



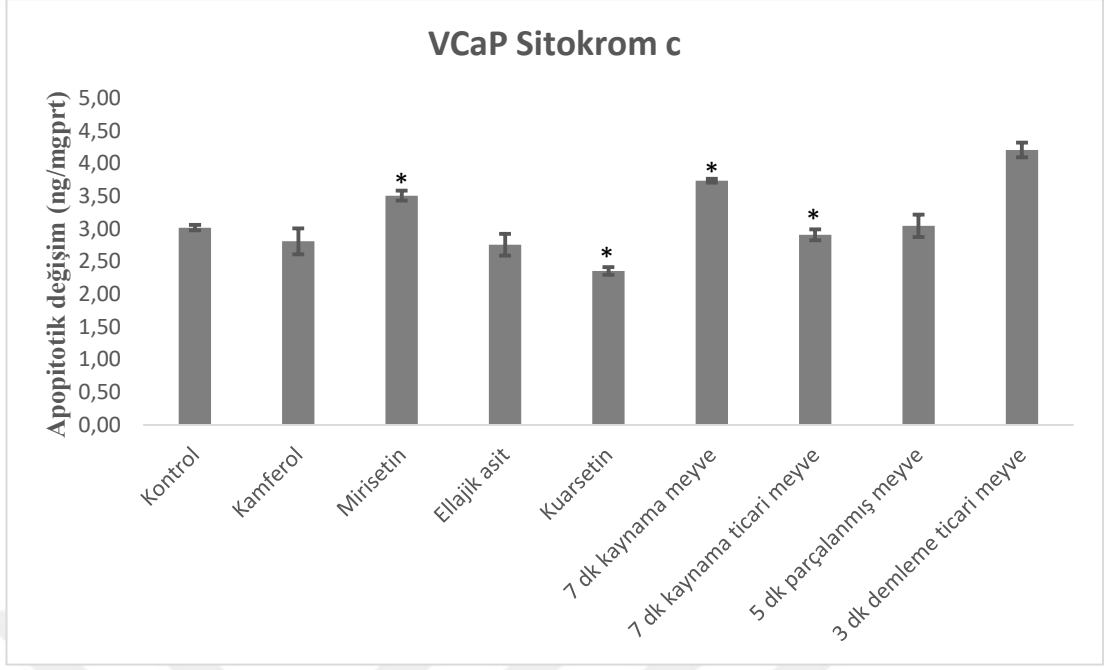
Şekil 20 D. Apoptotik VCaP değişiminin Apaf-1 ile gösterimi

Tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 5,860; 3,377; 5,554; 6,432; 10,430; 4,737; 5,540; 5,957 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 10,430 ng/mgprt 7 dakika kaynamış meyve ekstraktları olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 6,249 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 7 dakika kaynamış meyve ekstraktları anlamlı yüksek bulunmuştur.



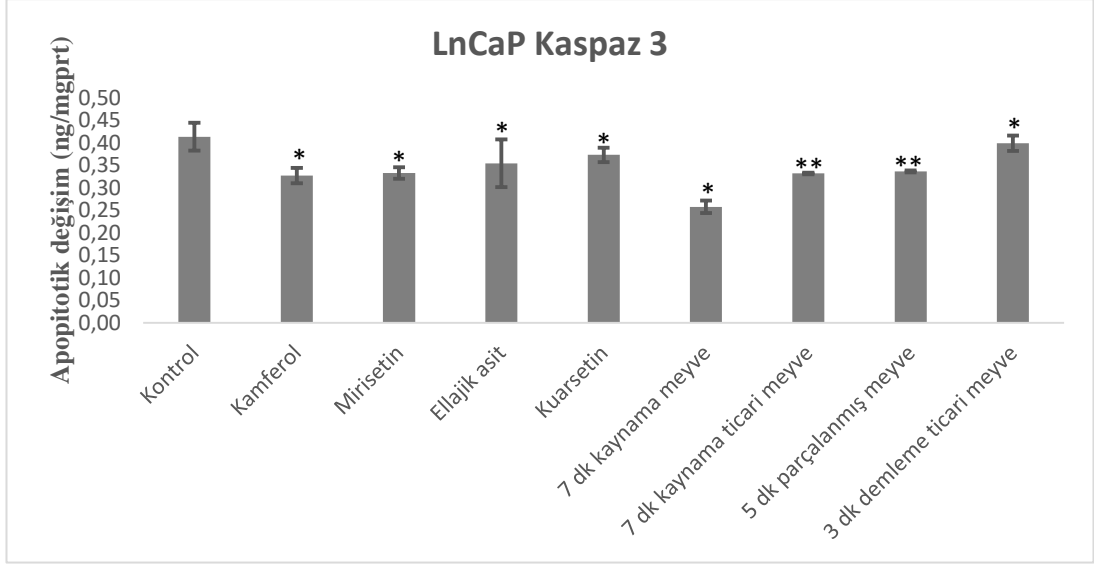
Şekil 20 E. Apoptotik LNCaP değişiminin Sitokrom-C ile gösterimi

Sitokrom-C ELISA KIT sonuçları Sitokrom-C standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 3,449; 4,106; 4,621; 4,283; 3,107; 3,197; 3,319; 3,519 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 4,621 ng/mgprt ellajik asit etken maddesi olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 3,273 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre ellajik asit ve kuarsetin anlamlı yüksek bulunmuştur.



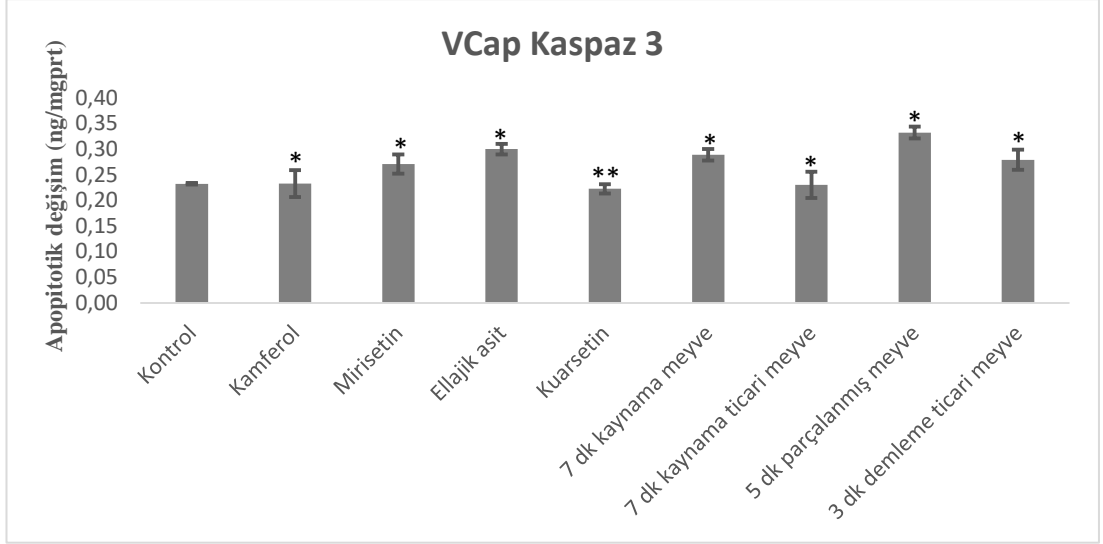
Şekil 20 F. Apoptotik VCaP değişiminin Sitokrom-C ile gösterimi

Tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 2,809; 3,508; 2,755; 2,355; 3,736; 2,910; 3,046; 4,208 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 4,208 ng/mgprt 3 dakika demlenmiş ticari meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 3,019 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 3 dakika demlenmiş ticari meyve ve 7 dakika kaynamış meyve ekstraktları anlamlı yüksek bulunmuştur.



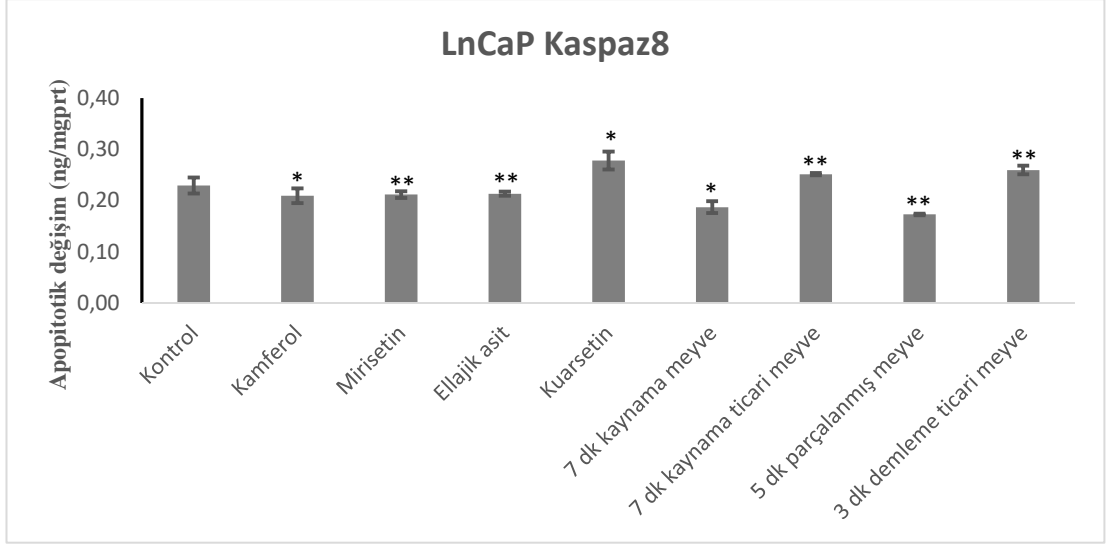
Şekil 20 G. Apoptotik LNCaP değişiminin Kaspaz-3 ile gösterimi

Kaspaz-3 KIT sonuçları Kaspaz-3 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 0,328; 0,334; 0,355; 0,374; 0,258; 0,332; 0,337; 0,400 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 0,414 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre anlamlı sonuç bulunamamıştır.



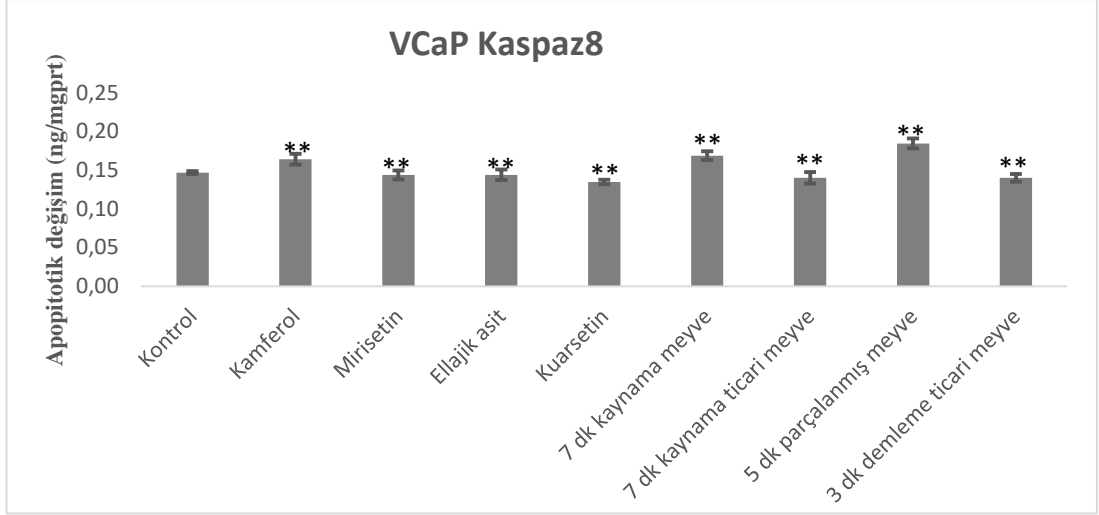
Şekil 20 H. Apoptotik VCaP değişiminin Kaspaz-3 ile gösterimi

Kaspaz-3 ELISA KIT sonuçları Kaspaz-3 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 0,233; 0,223; 0,271; 0,223; 0,290; 0,231; 0,333; 0,280 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 0,333 ng/mgprt etken madde 5 dk kaynamış parçalanmış meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 0,233 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 5 dakika kaynamış parçalanmış meyve, Ellajik asit ve 7 dk kaynama meyve ekstraktları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.



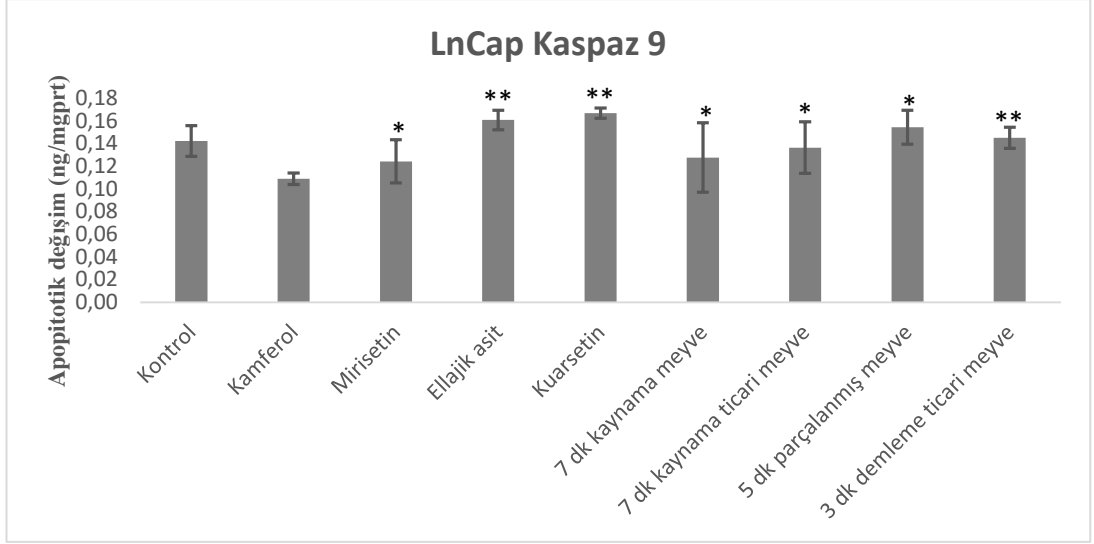
Şekil 20 I. Apoptotik LNCaP değişiminin Kaspaz-8 ile gösterimi

Kaspaz-8 ELISA KIT sonuçları Kaspaz-8 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 0,209; 0,212; 0,213; 0,278; 0,187; 0,252; 0,173; 0,260 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 0,278 ng/mgprt etken madde Kuarsetin olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 0,230 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre Kuarsetin, 3 dk demleme ticari meyve ve 7 dk kaynama ticari meyve ekstraktları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.



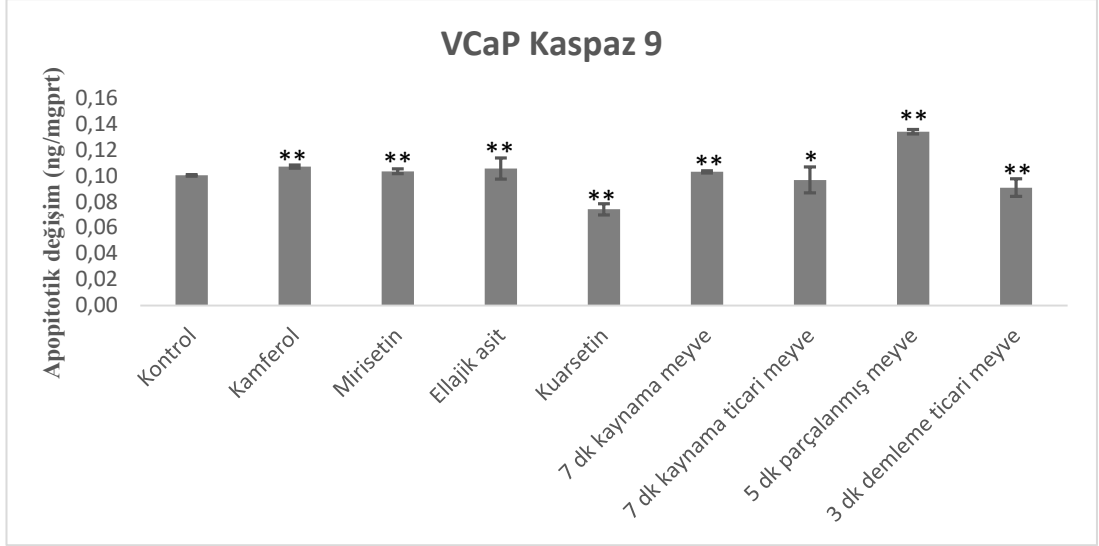
Şekil 20 J. Apoptotik VCaP değişiminin Kaspaz-8 ile gösterimi

Kaspaz-8 ELISA KIT sonuçları Kaspaz-8 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 0,164; 0,144; 0,144; 0,135; 0,169; 0,140; 0,185; 0,140 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 0,185 ng/mgprt etken madde 5 dk kaynamış parçalanmış meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 0,147 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre Kamferol, 7 dk kaynama meyve ve 5 dk kaynamış parçalanmış meyve ekstraktları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.



Şekil 20 K. Apoptotik LNCaP değişiminin Kaspaz-9 ile gösterimi

Kaspaz-9 ELISA KIT sonuçları Kaspaz-9 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 0,109; 0,124; 0,161; 0,167; 0,128; 0,136; 0,154; 0,145 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 0,167 ng/mgprt etken madde Kuarsetin olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 0,142 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre Kuarsetin ve ellajik anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.



Şekil 20 L. Apoptotik VCaP değişiminin Kaspaz-9 ile gösterimi

Kaspaz-9 ELISA KIT sonuçları Kaspaz-9 standart grafiğine göre hesaplanmış olup tek başına uygulanan Kamferol, Mirisetin, Ellajik asit, Kuarsetin, 7dk kaynama meyve, 7 dk kaynama ticari meyve, 5 dk parçalanmış meyve ve 3 dk demleme ticari meyve sırasıyla 0,107; 0,104 ;0,106 ; 0,074 ; 0,103 ; 0,097 ; 0,134 ; 0,091 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Grafik'te de görülmektedir ki en yüksek değer 0,134 ng/mgprt 5 dakika kaynamış parçalanmış meyve olduğu görülmektedir. Etken madde eklenmeyen kontrolümüzün değeri 0,100 ng/mgprt olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre 5 dakika kaynamış parçalanmış meyve ekstraktları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

5. Tartışma

Prostat kanseri erkekler arasında en sık görülen kanserdir, altı erkekte birine yaşamları boyunca prostat kanseri teşhisi konacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, çalışmalar prostat kanserinin tedavisi ve önlenmesine odaklanmaktadır. Prostat kanserinin büyümesi, yayılması ve metastazının flavonoller (Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asid) tarafından inhibe edildiği, özellikle fisetin ve androjene bağımlı prostat kanserini tedavi etmek için potansiyel kullanımın halen araştırıldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kuşburnu çayının yukarıda belirtilen flavonolleri (Kuarsetin, Kamferol, Mirisetin ve Ellajik asid) içeren anti-proliferatif etkilerini prostat kanseri hücre dizisi üzerindeki olası etkisini araştırdık.

Doğal antioksidanlar arasında, flavonoidler günlük gıdalarımızda en fazla miktarda bulunur. Flavonoidlerin ortak yapısı, üç halkada (fenilkromanon yapısı, C6-C3-C6) düzenlenmiş 15 karbon atomundan oluşan flavan çekirdeğidir. A ve B halkaları benzen halkalarıdır ve C halkası heterosiklik bir piran ya da pirondur.

Flavonoller Kamferol, Mirisetin ve Kuarsetin flavonoid alt sınıfının üyeleridir ve soğan ve çay gibi birçok gıdada bulunurlar. Her ne kadar yenilebilir bitkilerde bu büyük flavonollerin baskın bileşenlerini Kuarsetin, Mirisetin ve Kamferol takip etse de, üçünün de ayrıca antioksidan kapasitesi vardır. Bununla birlikte, kamferol, kuarsetin ve mirisetin kendi içinde karşılaştırıldığında nispeten bu etkiler farkedilmiştir.

Bir bitki ürününün kimyasal bileşimi, ekstraksiyon için çeşitli çözücüler kullanılarak nitel kimyasal analizlerle belirlenir. Ekstraksiyon için kullanılan yöntem ve çözücü seçimi, ekstraktta optimal bir doğal bileşik konsantrasyonu elde etmek için özellikle önemli bir adımdır. Flavonoid bileşiklerin yüksek performansını ve artan stabilitesini sağlamak için etkili bir ekstraksiyon yöntemi ve uygun çalışma aşamaları seçmek önemlidir (Ignat, Volf, & Popa, 2011).

Polifenollerin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemler, bitkinin kabuğundaki polifenollerin tipine göre organik çözücüler (aseton, etanol, metanol, etil asetat) ile kombinasyon halinde su kullanır (Sultana, Anwar, & Przybylski, 2007). Bazı çalışmalar, ekstraksiyon sıcaklığındaki artışın verimliliğin artmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmiştir (Chew ve ark., 2011). Ekstraksiyon süresi de dikkate alınması gereken bir faktördür. Uzun süreli ekstraksiyon süresi polifenollerin

oksidasyon sürecini etkileyebilir, böylece prosedürün verimini ve ekstrakte edilen bileşiklerin türünü azaltabilir (Dai & Mumper, 2010). Katı-sıvı ekstraksiyonu, polifenoller elde etmek için kullanılan yaygın bir yöntemdir (Koleva, 2015; Rhazi ve ark., 2015). Fakat, uzun ekstraksiyon süresi, artan solvent miktarı, solventin geri kazanılması için azaltılmış potansiyel kullanımı gibi yüksek eksiklikler ve daha yüksek toksisite gibi çeşitli sorunlar olabilir. Ekstraksiyon verimini, süresini ve kullanılan çözücü miktarını arttırmak için, ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyon veya hızlandırılmış solvent ekstraksiyon gibi bazı geleneksel (modern) yöntemler tercih edilir (Chemat, Zill-e-Huma, & Khan, 2011).

Ancak bizim uygulamış olduğumuz ekstraksiyon yöntemi fenol bileşikleri elde etme açısından toksik bir etkiye sahip değildir ve fazla ısıl işleme tabi tutulmadığından fenolik bileşiklerin bozulma olasılığını ortadan kaldırmış durumdayız. Jun He ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada parçalanmış ökse otu meyveleri (10 g) kısımları, 8:2 metanol / su çözeltisi (50 mL) ile oda sıcaklığında ultrason destekli karıştırma kullanılarak ekstrakte edildi ve Kuarsetin, mirisetin ve kamferol iz miktarlarda bulunmuş veya bulunamamıştır (Pietrzak, Nowak, Gawlik-Dziki, Lemieszek, & Rzeski, 2017). Aseton ekstraktı yapılan bir çalışmada ise Kuarsetin $296,5 \pm 11,69$ $\mu\text{g/kg}$, Kaemferol $53,38 \pm 1,76$ $\mu\text{g/kg}$, Mirisetin $25,23 \pm 1,12$ $\mu\text{g/kg}$, Ellajik asid $444,61 \pm 17,36$ $\mu\text{g/kg}$ olarak bulunmuştur (Tumbas ve ark., 2012). Bizim yaptığımız çalışmada bu dört flavanol yaklaşık aynı miktarda elde edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada Kuşburnunun hem klinik hem de in vitro olarak anti-kanser, anti-enflamatuar ve antioksidan aktiviteler gösterdiği öne sürülmüştür. Geleneksel olarak kuşburnu ekstraktları, sıcak su ile hazırlanan çay olarak kullanılmaktadır, son araştırmalar, demleme koşullarının fenolik bileşik içeriğini ve antioksidan kapasiteyi etkilediğini öne sürmüştür. Çalışmamız en yüksek miktarda fenolik bileşiğin kaynatmayla elde edildiğini göstermiştir. Ancak kuşburnu çayında fenolik bileşiklerin seviyeleri yedi dakikadan fazla kaynatıldıktan sonra azalmıştır. Ellajik asit konsantrasyonu kaynatılarak artarken, Mirisetin konsantrasyonu azalmıştır. En yüksek Mirisetin içeriğinin 7 dakikada kaynatılmış ticari çay ve 3 dakikalık demlenmiş ticari çay elde edildiğini gördük. Toplam fenolik içeriğin (TPC) zamanla belli bir dereceye kadar arttığını ve ardından biraz değiştiğini gözlemledik. TPC 5,5 ila 10 dakika arasındaki ve 77 ila 86⁰C arasındaki

sıcaklıklarda en yüksek iken, antioksidan aktivite, demleme süresinde 6-8 dakika ve 84-86 ° C sıcaklıklarda en yüksek olduğunu belirledik.

Apoptoz, gereksiz veya potansiyel olarak zararlı hücrelerin yok edilmesini sağlayan bir programlanmış hücre ölümü türüdür. Kaspazlar, apoptotik programın başlatılması ve yürütülmesine katılan sistein proteaz ailesini oluşturmaktadır. Apoptotik kaskadlar, başlatıcı kaspazların (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) proteolizi ile aktive olur; bunlar, kaspazları (kaspaz-3, -6 ve -7) proteolize ve aktive etmektedir. İki ana apoptotik yol vardır: dışsal ve içsel (veya mitokondrial) apoptotik yollardır. Bu apoptotik yollar, sonuçta hücrenin ölümüne yol açan bir substrat bolluğunu proteolize eden uygulayıcı kaspazların aktivasyonunda birleşmektedir. Tümör hücrelerinin karakteristiği olan apoptozun engellenmesi apoptoz düzenleyicilerin seviyelerinde ve işlevlerinde değişiklik yapılması ile ortaya çıkmaktadır (Jiang, Wang, Ganther, & Lu, 2001; R. Watson, Coffey, O'Neill, & Fitzpatrick, 1999; R. W. G. Watson & Fitzpatrick, 2005).

Antioksidan özelliklere sahip olan flavonoidlerin kanser kemoterapisi için yeni ve olası stratejiler bulunmuştur. Kamferol ile yapılan antioksidan enzim aktivasyonunun, insan akciğerinde küçük olmayan karsinom H460 hücrelerinde apoptoziste önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Ek olarak, birçok çalışma, Kamferol'ün, in vitro kanser hücresi büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmiştir ve bu büyüme inhibisyonunun, apoptozise yol açan sinyal iletim yolunu uyardığı bildirilmiştir. Lösemi hücreleri, akciğer kanseri hücreleri ve glioblastoma gibi çeşitli hücrelerde apoptozise neden olduğu gösterilmiştir, Kamferol ile indüklenen hücre döngüsü durdurma ve apoptozis etkisinin altında yatan hücrel mekanizmalar hala belirsizdir (Shay ve ark., 2015).

Farklı kuşburnu ekstraktı fraksiyonlarının hücre büyümesi aktivitesi, 62,5 ile 1000 ng/mL arasındaki konsantrasyonlarda üç insan kanseri hücre hattı, HeLa (serviks epitelooid karsinomu), MCF7 (meme adenokarsinomu) ve HT-29 (kolon adenokarınoma) panelinde in vitro olarak değerlendirilmiştir. Kuarsetin, kolon karsinoması HT29 ve CACO2 hücrelerini bölmek için seçici bir sitotoksik etki uygulamış ve büyümenin inhibe edilmesinin ardından insan lösemi HL60 hücrelerinde apoptozu tetiklemiştir. Kuarsetin ayrıca insan lösemisi HL60 hücrelerinde DNA sentezini de inhibe etmiş, hayvan çalışmaları, kanserojen kaynaklı meme tümörleri insidansının, Kuarsetin diyeti uygulamasıyla azaldığını göstermiştir.

Kanser hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesinin ve hücre ölümünün (apoptoz) düzenlenmesine aracılık eden ellajik asidin potansiyel antikanser özellikleri hakkında kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Tumbas ve ark., 2012).

Yapılan başka bir çalışmada, Kuarsetin'in TNBC hücre hattı üzerindeki etkisini belirlemek için, MDA-MB-231 hücre hattı 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca çeşitli Kuarsetin konsantrasyonlarında (2.5~80 uM) uygulanmıştır. Kuarsetin, MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığının azalması üzerine doza ve zamana bağlı etkiler gösterdiği görülmüştür (Varghese ve ark., 2018). Farklı bir çalışmada ise Kuarsetin uygulama sonrası CT-26, LNCaP, MOLT-4 ve Raji hücre hatlarının apoptozisin belirlenmesi devamında, Kuarsetinin (yani, CT-26 ve LNCaP, ayrıca MOLT-4 ve Raji'ye karşı) yüksek ve düşük hassasiyetli 4 hücreli bir paneldeki apoptotik hızı incelenmiştir. Sonuçlara göre, Kuarsetinin bu hücrelerde apoptotik süreci doza bağlı bir şekilde başlattığını ortaya koymuştur (Hashemzaei ve ark., 2017).

Bizim yaptığımız çalışmada apoptosiz reseptörleri ve kaspazlara bakıldığında kuarsetin prostat kanseri LNCaP hücre hattında Apaf-1, sitokrom-C, kaspaz-8 ve kaspaz-9 da etkili bulunurken, VCaP hücre hattında sadece Apaf-1 üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Kuarsetinin prostat kanseri LNCaP hücre hattı üzerinde daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 20).

Kuşburnu (*Rosa canina*) genellikle bitkisel ilaç olarak kullanılır. Önceki çalışmalar kuşburnu bitkilerinden yapılan ekstraktların, kanser hücrelerinin hücre çoğalmasını azaltabildiğini göstermiştir. Bir başka çalışmada kuşburnu ekstraktlarının A-172, U-251 MG ve U-1242 MG hücre hatlarında üç insan glioblastom hücre hattında hücre proliferasyonunu önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. Daha önemlisi, kuşburnu ekstraktları, glioblastomalar için mevcut kemoterapötik uygulamalara bir alternatif veya tamamlayıcı olarak hizmet edebilecektir (Cagle ve ark., 2012).

Kamferol'ün kolon kanseri, yumurtalık, pankreas kanseri, mide kanseri, mesane kanseri dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattında ümit verici bir anti-kanser ajanı olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, Kamferol, p53 ekspresyonunu arttırdığı ve daha sonra serin 15' te p53 fosforilasyonunu indüklediği de görülmüştür. Çeşitli çalışmalar serin 15'te fosforile edilmiş p53'ün kanser hücrelerinde apoptoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Ito ve ark., 2002). Bizim yaptığımız çalışmada da Kamferolün, prostat kanseri hücre hatları olan VCaP ve LNCaP hücre hatları

üzerinde apoptotik mekanizmaları tetiklemesi ile potansiyel terapötik madde olarak düşünülebileceğini çalışmanın sonuçları doğrultusunda belirtilmiştir. Kamferol kanser hücre hatları VCaP ve LNCaP hücre hatları üzerinde daha etkin ve öldürücü bir rol oynadığı belirlenmiştir. Böylelikle IC₅₀ doz değerleri olarak Kamferol en iyi etken madde olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla apoptozis üzerinde olumlu bir rol oynadığı görülmüştür (Tablo 4 ve 5).

Bir başka çalışma, Ellajik asidin hücre ölümü ve pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmayı ve ellajik asidin hücre canlılığını etkileyen mekanizmayı belirlemeyi amaçlamıştır. Bu bağlamda pankreas kanserinin karakteristik özelliği olan K-ras ve p53 mutasyonlarını gösteren, malign farklılaştırılmış MIA PaCa-2 ve orta derecede farklılaşmış PANC-1 insan pancreas karsinoma hücre hatlarına Ellajik asit uygulanmıştır. Sonuç olarak, Ellajik asitin apoptozu uyardığını ve pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini; bildirmiştir. Ayrıca sitokrom-C salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili mitokondriyal ölüm yolağını mitokondriyi doğrudan etkilemeden aktive ettiğini ve pankreas kanseri hücrelerinde NF-kB aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. (Malik, Afaq, Shahid, Akhtar, & Assiri, 2011). Bizim yaptığımız çalışmada ise prostat kanseri LNCaP hücre hattında sitokrom-C ve Kaspaz-9 üzerinde etki ederken, prostat kanseri VCaP hücre hattında Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 üzerinde etkili olduğu görülmektedir (Şekil 20) .

Mirisetin, prostat kanseri, hepatoselüler karsinom, mide kanseri ve insan skuamöz hücreli karsinomu da dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde de önemli ölçüde etkili olduğu gösterilmiştir. Mirisetin ayrıca, hedef kanser hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirerek bazı antikanser ilaçların kemoterapötik potansiyelini artırabilmektedir. Hali hazırda mevcut geleneksel kemoterapötik ajanların, yumurtalık kanserli hastaların genel hayatta kalma oranlarını arttırdığı gözlemlenmediğinden, hastalıkla savaşmak için yeni ilaç kombinasyonları gerektirmektedir (Maggioni ve ark., 2014; Yi ve ark., 2015). Bizim yaptığımız çalışmada Mirisetin prostat kanseri VCaP hücre hattında TRAIL, sitokrom-C, kaspaz-3 ve kaspaz-9 üzerine etki ederken, LNCaP hücre hattında sadece Sitokrom-c üzerinde etkisi belirtilmektedir. Mirisetin prostat kanseri VCaP hücre hattında LNCaP hücre hattına göre daha etkili olduğu görülmektedir (Şekil 20).

Görüldüğü gibi verilen örneklerde, bu dört etken maddenin apoptoza etkisi uzun süredir incelenmektedir. Bizde yaptığımız çalışmada, bu bileşenlerin etki mekanizmalarını ölçmeyi amaçladık.

Verilerimiz, her bir zaman diliminde aynı fenolik bileşik konsantrasyonunun hücre canlılığını etkilediğini göstermiştir (Tablo 4, 5). LNCaP hücre kültürlerinde Kuarsetin 24 saat içerisinde en düşük konsantrasyon uygulandığında en iyi IC₅₀ dozunu vermiştir. Kuarsetin'in LNCaP hücresinde (IC₅₀ =20 µM) VCaP hücre hattından (IC₅₀ =200 µM) daha etkili olduğunu belirledik. VCaP hücrelerindeki eğilim, LNCaP hücrelerinde gözlenenenden tamamen farklıydı. 48 saatte Kuarsetin, Kamferol ve Ellajik asidin IC₅₀ konsantrasyonu 24 saat ve 72 saatten daha yüksekti, ancak 72 saatte mirisetin IC₅₀ durumunda maksimum IC₅₀ değerleri görülmüştür (Tablo 5). VCaP hücre kültüründeki denemelerde, 72. saatte en düşük konsantrasyon olarak Kamferol en iyi IC₅₀ dozunu vermiştir. Bu çalışmada, kamferol'un VCaP hücresinde (IC₅₀ =2 µM) LNCaP hücre hattından (IC₅₀ =30 µM) daha etkili olduğunu belirledik (Tablo 4).

Çay numuneleri, kültür ortamı ile seyreltilerek hazırlanan üç farklı konsantrasyonda (direkt, ½ ve ¼) hücre kültürüne eklenmiş ve hücre canlılığı, numunelerin eklenmesinden sonra 24 saat, 48 saat ve 72 saat içinde izlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler VCaP hücreleri için Şekil 10'te ve LNCaP hücreleri için Şekil 11'de sunulmuştur.

sonuçlar gösterdi ki 3 dk demlenmiş ticari çay ile ilgili LNCaP hücre hatlarında diğer deney gurublarına göre özellikle 24 saatin üzerinde, hücre indeksinin ve proliferasyon hızının baskılanması önemli ölçüde yüksektir. 3 dk demlenmiş ticari çay, 5 dk parçalanmış ve kaynatılmış çay, 5 dk parçalanmış ve kaynatılmış çay (1/2), 7 dk kaynatılmış ticari çay (1/4) LNCaP hücrelerinde hücre indeksi ve proliferasyon hızının baskılanmasında en yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 11). 3 dakikalık demlenmiş ticari çay (1/4) ile kontrol grupları arasında fark yoktur. 7 dk kaynatılmış ticari çay, 7 dk kaynatılmış ticari çay (1/2), 3 dk demlenmiş ticari çay, 3 dk demlenmiş ticari çay (1/2) ve 7 dk kaynatılmış meyvelerin (1/4), VCaP hücrelerinde hücre indeksi ve proliferasyon hızının azaltılmasında en yüksek etkiye sahip olduğu sonucuna vardık (Şekil 10). En yüksek Ellajik asit, kuarsetin ve

mirisetin içeriğine sahip 7 dakika kaynatılmış ticari çay ve 3 dakika demlenmiş ticari çay en etkili çay örnekleridir.

EA'nın in vitro olarak insan androjenden bağımsız prostat kanseri olan PC3 hücrelerinin istilasını inhibe ettiği gözlenmiştir (Lansky EP ve ark., 2005). Ellajik asidin prostata afinitesi yüksek olduğundan, EA prostat dokusunda birikebilir, bu yüzden prostat için antikanser ajan olarak önerilmiştir. Kollajenaz / jelatinaza karşı inhibe edici özelliklere sahip olan Ellajik asit, LNCaP hücre çizgisinin, hareketliliğini ve hücre istilasını azaltarak tümörün metastazını önleyebilir, LNCaP hücre çizgisi, androjene duyarlı bir prostat kanseri hücresidir, androjen reseptörü ve androjenin uyarılabilir genlerini ifade eder. Kuarsetin, özellikle Inositol 1,4,5 trifosfatın sinyal iletim yollarını bloke ederek anti-proliferatif etkiye sahiptir. Bu çalışmada, Kuarsetin'in LNCaP hücresinde ($IC_{50} = 20 \mu M$) VCaP hücre hattından ($IC_{50} = 200 \mu M$) daha etkili olduğunu belirledik. Xing ve diğ. Kuarsetin işleminin, LNCaP hücrelerinde Androjen reseptörlerinin transkripsiyonunu inhibe ettiğini ve tümör hücresi büyümesini, istilasını ve osteoblastik metastazı düzenleyen androjenle ilişkili proteinleri (Prostat spesifik antijen, İnsan glandüler kallikrein) aşağı regüle ettiğini göstermiştir (Xing ve ark., 2001). Her ne kadar demleme ve batılı ticari çay örneklerinde Mirisetin ve Ellajik asit düzeylerinin en yüksek olduğu bulunmuş olmasına rağmen, bu konsantrasyonlar IC_{50} seviyelerine göre nispeten düşüktür. Bu nedenle bu çay örneklerinin antiproliferatif etkisinin Kuarsetin ve kamferol içeriği ile ilişkili olabileceği sonucuna vardık. Bu öneri verilerimizle kanıtlanmıştır, fenolik moleküllerin VCaP hücreleri (Şekil 8) üzerindeki etkisinin IC_{50} seviyelerine göre LNCaP hücrelerinden biraz daha güçlü olduğunu göstermiştir (Tablo 4 ve 5). Şekil 10'den görülebileceği gibi, kaynatılmış parçalanmış meyve numunesi aynı kamferol konsantrasyonuna sahip fakat daha düşük konsantrasyonda Ellajik asit, Mirisetin ve Kuarsetin ile diğer çay numunelerinde (Tablo 6), VCaP hücrelerinde hücre büyümesini kuvvetle inhibe etmektedir. Kamferol'ün 5 α -redüktaz izoenzimi 2'yi inhibe ederek testosteron seviyelerini azaltabileceği gösterilmiştir (Boam, 2015).

İlginç bir şekilde, zamana bağlı olarak (24'ten 72'ye kadar) hücre endeksi ve proliferasyon hızı her iki hücre hattında da biraz iyileşmiştir; bilinmeyen genleri ve hücre sinyal yollarını aktive ederek fenolik moleküllere cevap olarak hücre direncinin kazanılması nedeniyle olabilir. Başka bir açıklama, fenolik bileşiklerin zaman içinde ayrışması olabilir.

Her flavonolün prostat kanserindeki etkisi ne olursa olsun, kombine etkinin, her flavonolün bireysel etkisinden daha güçlü olduğu varsayılabilir. Bu nedenle yapay moleküller yerine tedavi stratejileri için doğal kaynakların kullanılması önerilir. Şekil 15'te görüldüğü gibi, kontrol grubu ile kıyaslanan flavonol denemelerinde, parçalanmış kuşburnu bitkisinden elde edilen ekstraktın, apoptotik değişim üzerindeki artırıcı etkisi belirlenmiştir. Apoptozu yedi katın üzerinde artırdığı (Tablo 10) bu şekilde kullanıldığında kanser hücre hattında ve kanser tedavisinde potansiyel bir kullanım alanı olduğu belirlenebilmektedir. Bu şekilde uygulanmasından sonra hedef hücre hatlarındaki apoptotik değişim ile birlikte bu tezin hipotezini doğruladığı görülmektedir. Buna göre apoptotik aktivitenin indüklenebilmesi için söz konusu maddelerin hedef kanser hücre hattında potansiyel flavonoid olarak kullanılabilir. Bu sonuçlar ele alındığında, 7dk süreyle kaynatılmış parça kuşburnu meyveleri, kontrole göre 2,4 kat apoptozu indükleyerek VCaP hücrelerinde apoptoz için en etkin uygulama olduğu bulunmuştur (Tablo 14).

LNCaP hücre hattına genel olarak bakıldığında apoptozise sürükleyen etkili ekstraktların 5 dk kaynamış parçalanmış meyve, kuarsetin ve ellajik asit en etkili fenol olduğu görülmektedir. VCaP hücre hattında ise etkili olan ekstraktların başında 3 dk demleme ticari ve 7 dk kaynama ticari meyve ve fenoller içinde kuarsetin görülmektedir. Tek tek ele alacak olursak LNCaP ve VCaP hücre hatlarında TRAIL apoptosiz reseptörü için en etkili kuşburnu çay ekstraktı 3 dk demleme ticari çay örneği ortaktır. Apaf-1 apoptosiz reseptörü için her iki hücre hattında etkili olan ortak çay ekstraktı 7 dk kaynamış meyve olarak görülmektedir. Sitokrom-C apoptosiz reseptörü için her iki hücre hattında ortak etkili olan çay ekstraktı 3 dk demleme ticari çay örneği olduğu görülmektedir (Şekil 20).

Apoptosiz kaskadlarına bakıldığında ise Kaspaz-3 için LNCaP hücre hattında etkili bir çay ekstraktı bulunmamış olmasına rağmen VCaP hücre hattında etkili olan çay örnekleri 7 dk kaynamış meyve ve 5 dk kaynamış parçalanmış meyve olduğu görülmektedir. Kaspaz-8 için LNCaP hücre hattında etkili çay örneği 3 dk demleme ticari meyve ve VCaP hücre hattında etkili olan çay örneği 5 dk kaynamış parçalanmış meyve olduğu görülmektedir. Kaspaz-9 için her iki hücre hattında etkili olan ortak çay ekstraktı 5 dk kaynamış parçalanmış meyve olduğu belirtildi (Şekil 20) .

6. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, çalışmamızda kuşburnu çayının androjene duyarlı prostat kanseri hücre hattında hücre büyümesini ve proliferasyonunu azalttığı ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bu çalışma flavonoidlerin antiproliferatif ve apoptotik özellikleri nedeniyle kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak kullanılabilceği görüşünü desteklemektedir.

Bu çalışmada diğer çay çalışmalarından farklı olarak hem demleme hem de kaynatma yöntemleri ile ekstraktlar hazırlanması ve 1-10 dakika arasındaki farklı zaman aralıklarında ekstrakta geçen kuarsetin, kamferol, mirisetin, ellajik asit miktarı belirlemektir. Özellikle biyolojik aktiviteleri ile bilinen kuarsetin, kamferol, mirisetin ve ellajik asit ve kuşburnu çayı içerisindeki miktarı hangi teknik ve kaç dakika maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir. Daha önce hiç kullanılmamış olan kuşburnu bitkisinin kurutulmuş meyve, parçalanmış meyve ve kuru meyve kullanılmıştır. Bununla birlikte, ekstrakta edilen fenolik molekül miktarı hazırlama teknikleri ve zamanlama ile ilgili olarak değişir, tedavi için kullanmadan önce mümkün olan en yüksek flavonol konsantrasyonunu elde etmek için en uygun koşulların belirlenmesi önerilir.

Bu çalışmada VCaP ve LNCaP Prostat kanser hücre hattı kullanılacak olup kuşburnu bitkisinin ve kuarsetin, kamferol, mirisetin ve ellajik asit ile hücre canlılığı ve sitotoksik aktivitesi ve apoptosiz etkilerine yönelik bulgular elde edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde kuşburnu içerisindeki farklı fenolik bileşiklerde kombine veya tekli olarak araştırma söz konusu olabilir.

Ayrıca Apoptosiz intrinsek ve ekstrinsek yollardaki Kaspaz-3, -8, -9 ve sitokrom-c, Apaf-1 ve TRAIL aktivasyonuna bakılmıştır ve mümkün olan apoptosiz yolları aydınlatılmıştır. Daha net ve belirgin apoptosiz yollarını tespit etmek için daha çok apoptosiz markırlarına bakılabilir.

Her ne kadar hücresel seviyelerde yükselen flavonoller tarafından hücre büyümesinin inhibe edilmesinin altını çizme mekanizmasını araştırmamamıza rağmen, verilerimiz kuşburnu çayının flavonollerin doğal bir kaynağı olarak prostat kanseri tedavisinde

önerilebileceğini açıkça göstermiştir. Kuşburnu çayının, prostat kanserinin in vivo tedavisi için değerini belirlemek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

7. Kaynaklar

- Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J., & Strasser, A. (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
- Baek, B., Lee, S. H., Kim, K., Lim, H.-W., & Lim, C.-J. (2016). Ellagic acid plays a protective role against UV-B-induced oxidative stress by up-regulating antioxidant components in human dermal fibroblasts. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 20(3), 269. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.3.269>
- Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3(6), 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>
- Boam, T. (2015). Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Ecancermedicalscience*, 9, 585. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.585>
- Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., & Snyder, S. H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1051–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb1063>
- Cagle, P., Idassi, O., Carpenter, J., Minor, R., Goktepe, I., & Martin, P. (2012). Effect of Rosehip (<i>Rosa Canina</i>) Extracts on Human Brain Tumor Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Cancer Therapy*, 03(05), 534–545. <https://doi.org/10.4236/jct.2012.35069>
- Cassidy, A., & Minihane, A.-M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(1), 10–22. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136051>

- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, A. Y., & Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4), 2099–2107. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.139>
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Aida, W. M. W., & Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427–1435. [https://doi.org/18\(4\):1427-1435.2011](https://doi.org/18(4):1427-1435.2011)
- Chou, C.-C., Yang, J.-S., Lu, H.-F., Ip, S.-W., Lo, C., Wu, C.-C., ... Chen, D.-R. (2010). Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33(8), 1181–1191. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0808-y>
- Chwieralski, C. E., Welte, T., & Bühling, F. (2006). Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*, 11(2), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-3486-y>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Devi, K. P., Rajavel, T., Habtemariam, S., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2015). Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. *Life Sciences*, 142, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.004>
- FAN, T.-J., HAN, L.-H., CONG, R.-S., & LIANG, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. (2010). Quercetin Modulates NF- κ B and AP-1/JNK Pathways to Induce Cell Death in Human Hepatoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 62(3), 390–401. <https://doi.org/10.1080/01635580903441196>

- Hagiwara, Y., Kasukabe, T., Kaneko, Y., Niitsu, N., & Okabe-Kado, J. (2010). Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. *International Journal of Hematology*, 92(1), 136–143. <https://doi.org/10.1007/s12185-010-0627-4>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., ... Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 38(2), 819–828. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5766>
- Ho, C.-C., Huang, A.-C., Yu, C.-S., Lien, J.-C., Wu, S.-H., Huang, Y.-P., ... Chung, J.-G. (2013). Ellagic acid induces apoptosis in tsg8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Environmental Toxicology*, 29(11), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/tox.21857>
- Hollman, P. C. H. (2004). Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 42(sup1), 74–83. <https://doi.org/10.3109/13880200490893492>
- Hu, M., Wu, B., & Liu, Z. (2017). Bioavailability of Polyphenols and Flavonoids in the Era of Precision Medicine. *Molecular Pharmaceutics*, 14(9), 2861–2863. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00545>
- HUANG, H., CHEN, A. Y., YE, X., LI, B., ROJANASAKUL, Y., RANKIN, G. O., & CHEN, Y. C. (2015). Myricetin inhibits proliferation of cisplatin-resistant cancer cells through a p53-dependent apoptotic pathway. *International Journal of Oncology*, 47(4), 1494–1502. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3133>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.12.026>

- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277–288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 735–745. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2011.03.010>
- Ito, K., Hibi, K., Ando, H., Hidemura, K., Yamazaki, T., Akiyama, S., & Nakao, A. (2002). Usefulness of Analytical CEA Doubling Time and Half-life Time for Overlooked Synchronous Metastases in Colorectal Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 32(2), 54–58. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyf011.2002>
- Jeong, J.-H., An, J. Y., Kwon, Y. T., Li, L.-Y., & Lee, Y. J. (2008). Quercetin-induced ubiquitination and down-regulation of Her-2/ neu. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(2), 585–595. <https://doi.org/10.1002/jcb.21859>
- Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H., & Lu, J. (2001). Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Research*, 61(7), 3062–3070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-01-1501>
- Kasibhatla, S., & Tseng, B. (2003). Why target apoptosis in cancer treatment? *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(6), 573–580. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813137>
- Kelly, G. S. (2011). Quercetin. Monograph. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 16(2), 172–194. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21649459>
- Khorsandi, L., Orazizadeh, M., Niazvand, F., Abbaspour, M. R., Mansouri, E., & Khodadadi, A. (2017). Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratislava Medical Journal*, 118(02), 123–128. https://doi.org/10.4149/BLL_2017_025
- Kim, M. E., Ha, T. K., Yoon, J. H., & Lee, J. S. (2014). Myricetin induces cell death of human colon cancer cells via BAX/BCL2-dependent pathway. *Anticancer Research*, 34(2), 701–706. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511002>

Kim, W., Yang, H. J., Youn, H., Yun, Y. J., Seong, K. M., & Youn, B. (2010). Myricetin inhibits Akt survival signaling and induces Bad-mediated apoptosis in a low dose ultraviolet (UV)-B-irradiated HaCaT human immortalized keratinocytes. *Journal of Radiation Research*, *51*(3), 285–296. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339252>

Knickle, A., Fernando, W., Greenshields, A. L., Rupasinghe, H. P. V., & Hoskin, D. W. (2018). Myricetin-induced apoptosis of triple-negative breast cancer cells is mediated by the iron-dependent generation of reactive oxygen species from hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology*, *118*, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.005>

Koleva, V. (2015). raSolid Liquid Extraction of Phenolic and Flavonoid Compounds from *Cotinus coggygria* and Concentration by Nanofiltration. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, *28*(4), 545–551. <https://doi.org/10.15255/cabeq.2014.2006>

Lansky, E. P., Harrison, G., Froom, P., & Jiang, W. G. (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs*, *23*(2), 121–2. <https://doi.org/10.1007/s10637-005-5856-7>

Li, W., Du, B., Wang, T., Wang, S., & Zhang, J. (2009). Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, *177*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2008.10.048>

Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, *134*(12), 3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>

Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, *112*(6), 957–962. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.85>

Maggioni, D., Nicolini, G., Rigolio, R., Biffi, L., Pignataro, L., Gaini, R., &

- Garavello, W. (2014). Myricetin and naringenin inhibit human squamous cell carcinoma proliferation and migration in vitro. *Nutrition and Cancer*, 66(7), 1257–1267. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.951732>
- Makarova, N. M. (2011). [Bioavailability and metabolism of flavonoids]. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia*, 74(6), 33–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21870774>
- Malik, A., Afaq, S., Shahid, M., Akhtar, K., & Assiri, A. (2011). Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation : A caspase- dependent pathway. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(7), 550–555. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60144-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60144-2)
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Manzl, C., Krumschnabel, G., Bock, F., Sohm, B., Labi, V., Baumgartner, F., ... Villunger, A. (2009). Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *The Journal of Cell Biology*, 185(2), 291–303. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811105>
- Momeni, H. R. (2011). Role of calpain in apoptosis. *Cell Journal*, 13(2), 65–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507938>
- Niu, G., Yin, S., Xie, S., Li, Y., Nie, D., Ma, L., ... Wu, Y. (2011). Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(1), 30–37. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq107>
- Opferman, J. T., & Kothari, A. (2018). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 37–45. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.170>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M. K., & Rzeski, W. (2017). LC-ESI-MS/MS Identification of Biologically Active Phenolic Compounds in Mistletoe Berry Extracts from Different Host Trees. *Molecules*, 22(4), 624.

<https://doi.org/10.3390/molecules22040624>

- Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P., & Ajeet, A. (2013). Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *American Journal of Pharmacological Sciences*, *1*(6), 104–115. <https://doi.org/10.12691/ajps-1-6-1>
- Promsong, A., Chung, W. O., Satthakarn, S., & Nittayananta, W. (2015). Ellagic acid modulates the expression of oral innate immune mediators: potential role in mucosal protection. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *44*(3), 214–221. <https://doi.org/10.1111/jop.12223>
- Ranganathan, S., Halagowder, D., & Sivasithambaram, N. D. (2015). Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, *10*(10), e0141370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141370>
- Rathore, R., McCallum, J. E., Varghese, E., Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2017). Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, *22*(7), 898–919. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1375-1>
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(12), 2821–2831. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2013.10.004>
- Rhazi, N., Hannache, H., Oumam, M., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A., & Charrier-El Bouhtoury, F. (2015). Green extraction process of tannins obtained from Moroccan Acacia mollissima barks by microwave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2015.04.032>
- Safarzadeh, E., Sandoghchian Shotorbani, S., & Baradaran, B. (2014). Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *4*(Suppl 1), 421–427. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.062>
- Seo, C.-S., Jeong, S.-J., Yoo, S.-R., Lee, N.-R., & Shin, H.-K. (2016). Quantitative Analysis and In vitro Anti-inflammatory effects of gallic acid, ellagic acid, and quercetin from radix sanguisorbae. *Pharmacognosy Magazine*, *12*(46), 104.

<https://doi.org/10.4103/0973-1296.177908>

- Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., & Hüttemann, M. (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (–)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/181260>
- Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S., & Monteith, G. R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.08.016>
- Sultana, B., Anwar, F., & Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104(3), 1106–1114. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.019>
- Sun, S., Gong, F., Liu, P., & Miao, Q. (2018). Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway. *Gene*, 664, 50–57. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.04.045>
- Tapas, A., Sakarkar, D., & Kakde, R. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089–1099. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14693>
- Thilakarathna, S., Rupasinghe, H., Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. P. V. (2013). Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367–3387. <https://doi.org/10.3390/nu5093367>
- Tumbas, V. T., Čanadanović-Brunet, J. M., Četojević-Simin, D. D., Četković, G. S., Dilas, S. M., & Gille, L. (2012). Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1273–1281. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4695>
- Varghese, E., Samuel, S., Abotaleb, M., Cheema, S., Mamtani, R., Büsselberg, D., ... Büsselberg, D. (2018). The “Yin and Yang” of Natural Compounds in

- Anticancer Therapy of Triple-Negative Breast Cancers. *Cancers*, 10(10), 346. <https://doi.org/10.3390/cancers10100346>
- Wang, P., Heber, D., & Henning, S. M. (2012). Quercetin Increased the Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate in Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 64(4), 580–587. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.661514>
- Watson, R., Coffey, R., O'Neill, A., & Fitzpatrick, J. (1999). Caspase protease manipulation: a novel approach to apoptotic induction in prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2(S3), S34–S34. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500359>
- Watson, R. W. G., & Fitzpatrick, J. M. (2005). Targeting apoptosis in prostate cancer: Focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. *BJU International, Supplement*, 96(2), 30–34. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05944.x>
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S. H., & Young, C. Y. (2001). Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 22(3), 409–14. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.3.409>
- XU, Y., XIE, Q., WU, S., YI, D., YU, Y., LIU, S., ... LI, Z. (2016). Myricetin induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress and DNA double-strand breaks in human ovarian cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2094–2100. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4763>
- Yi, J.-L., Shi, S., Shen, Y.-L., Wang, L., Chen, H.-Y., Zhu, J., & Ding, Y. (2015). Myricetin and methyl eugenol combination enhances the anticancer activity, cell cycle arrest and apoptosis induction of cis-platin against HeLa cervical cancer cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(2), 1116–1127. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972998> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4396221>

Zhang, L., Ying, G.-G., Wang, G.-W., & Zhang, L. (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular Medicine Reports*, 5(6), 1453–1456. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.845>

Zhao, M., Tang, S.-N., Marsh, J. L., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2013). Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. *Cancer Letters*, 337(2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.009>

Teşekkür

Çalışmam Ege Üniversitesi bünyesinde gerçekleştirilmiş olup, bu çalışmada görev almış herkese ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalının tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

İzmir, 7.07.2020

Ramin ASLAMİNABAD

Özgeçmiş

Ad Soyad Ramin aslaminabad

Doğum Tarihi 21/09/1984

Doğum Yeri Tehran

Medeni Durumu Evli

İletişim Bilgileri: Cep 0537 443 53 13

E-Posta ra_asl@yahoo.com

Uzmanlık Alanları

1-mamalian cell culture techniques 2-DNA and RNA extraction and purification 3-protein purification and proteomics techniques 4-bacterial culture 5-PCR 6-ELISA 7-handling with laboratory animals 8-familiar with surgical techniques of animals.

Eğitim Bilgileri

İranın İslam Azad Üniversitesi Tabriz biriminde veterinerlik öğrenim programını 2011 yılında doktora derecesi ile bitirmiştir.

Seminerler ve Kurslar

1-bioinformatics 2-immuno biotechnology 3-sertifikalar (Royan international congress on stem cell biology & technology-advanced vitrification techniques: what to vitrify and when to vitrify- reproductive biomedicine- embryology training- mesenchymal stem cells: Isolation, purification and differentiation- vitrification techniques-scientific writing- bioinformatics- spss- bioinformatics & biology)

Atölyeler

Advanced Vitrification Techniques: What to vitrify and When to vitrify, Chairperson: Dr. Joe Conghan, September 2, 2013, Royan Institute, Tehran, Iran.

Mesenchymal stem cells: isolation, purification and differentiation, Chairperson: Dr. Eslaminejad, M. September 1, 2013, Royan Institute, Tehran, Iran.

Raminaslaminabad has been executive member workshop of advanced vitrification techniques, Scientific director: Dr J. Conaghan, September 3, 2013 Royan Institute, Tehran, Iran.

Advanced Vitrification Techniques: What to vitirify and When to vitirify, Chairperson: Dr. Joe Conghan, September 2, 2013, Royan Institute, Tehran, Iran.

Embryology training, Chairperson: Solveig Anne-Helene Jakobson, October 26, 2013, Royan Institute, Tehran, Iran.

Color doppler and sonography in infertility, Chairperson: Kujak, A and Ahmadi, F. September 4, 2013, Royan Institute, Tehran, Iran.

Öretim faaliyetle

Dr. RaminAslAminabad has given lectures in workshop entitled “Plagiarism” held for 2 hours during the spring semester in 2013

Dr. RaminAslAminabad has given lectures in workshop entitled “bioinformatics and biology” held for 2 hours during the spring semester in 2012

Dr. RaminAslAminabad has given lectures in workshop entitled “scientific writing” held for 2 hours during the spring semester in 2013

Dr. RaminAslAminabad has given lectures in workshop entitled “bioinformatics” held for 2 hours during the spring semester in 2013

Projeler

□ Karaciğer Hücre Kültürlerinde Hidrojen Peroksitle Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı Ganoderma Lucidum’un Nrf2 Transkripsiyon Faktörü ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisinin Araştırılması.

□ İnsan Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Paraquat İle İndüklenen Hasara Karşı Resveratrolün Etkisinin Araştırılması.

Yayınlanan Poster ve Yayınlar

- Perceptions of Molecular Life Science Master's Students on Their Scientific and Academic Competencies And Prospective Plans for Professional Development
- İdrar 5-Hidroksi Metil Urasil ve 8-Deoksi Guanozin Düzeyleri Embriyonik Nöral Kök Hücre Tedavi Etkinliğinin Göstergesi Olabilir Mi?
- The effect of ascorbic acid on protection of hepatic injury consequence effective of pentanedioic acid in rats
- Evaluation of carbinoxamine effect on improvement of orally ketamine influence on CNS suppression in animal model

Yabancı Dil

İngilizce	yazma orta, konuşma orta
Farsça	yazma çok iyi, konuşma çok iyi
Türkçe	yazma iyi, konuşma iyi

Yetkinlikler

Bilgisayar Microsoft Office

Referanslar

Prof.Dr.K.Shams Ssenjan (assistant professor of hematology):iranian blood transfusion organization, tabriz, iran Email: k,shams@Ibto.ir -phone: [+98-9146427690]

Prof.Dr.E.Issabeagloo(assistant professor of medical biology): medical sciences faculty, tabriz, iran Email: dr.e.issabeagloo@gmail.com -phone: [+98-9144079927]