T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA BUĞDAY ÇİMİ (*TRITICUM AESTIVUM L.*) EKSTRAKTININ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAMİL TOK

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA BUĞDAY ÇİMİ (*TRITICUM AESTIVUM L.*) EKSTRAKTININ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Hatice YILDIRIM (Tez Danışmanı)
Doç. Dr. Aylin ER
Dr. Öğr. Üy. Sema ÇARIKÇI

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kamil TOK tarafından hazırlanan "**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA BUĞDAY ÇİMİ (*Triticum aestivum* L.) EKSTRAKTININ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 11.06.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Danışman Doç. Dr. Hatice YILDIRIM	.....
Üye Doç. Dr. Aylin ER	.....
Üye Dr. Öğr. Üy. Sema ÇARIKÇI	.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR .....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 2018/181 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA BUĞDAY ÇİMİ (*Triticum aestivum* L.) EKSTRAKTININ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KAMİL TOK
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

Kanser ülkemizde ve dünya çapında çok fazla rastlanan ciddi sorunlarla yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Kanserli hücrelerin yapısı değiştiğinde normal fonksiyonlarını yapamayıp başka fonksiyonlar kazanırlar. Buğdayın (*Triticum aestivum*) gelişmekte olan ülkelerde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Buna bağlı olarak buğday çimeninin önemi de her geçen gün tartışmalara yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar tahıl kökenli beslenmenin birçok hastalığa (kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar) karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, buğday çimi (*Triticum aestivum L.*) ekstresinin (BÇE) farklı konsantrasyonlarının farklı hücre hatları prostat kanser hücre hattı (PC3), insan kordon bağı ven endoteliyal hücre hattı (HUVEC), karaciğer kanser hücre hattı (HEP3B), pankreas kanser hücre hattı (PANC-1) üzerindeki 24, 48 ve 72 saatteki etkileri incelenmiştir. Yapılan canlılık testleri sonucunda en yüksek etkinin PC3 hücrelerinde olduğu belirlenmiştir. BÇE uygulaması PC3 ve HUVEC hücrelerinde morfolojik olarak da değişikliklere sebep olmuştur. PC3 hücrelerine BÇE uygulamasının pro apoptotik BAX ve otofaji ilişkili Beklin 1 gen ekspresyonuna etkileri mRNA seviyesinde Real Time PCR yöntemi kullanılarak ve protein seviyesinde ise Western Blot yöntemi kullanılarak aydınlatılmıştır. Çalışmalarımız sonucunda PC3 hücrelerinde BÇE uygulamasına bağlı olarak meydana gelen hücre ölümünde apoptotik hücre ölüm yolağının etkili olabileceği konusunda veriler elde edilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin kanser tedavisi alanında daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: PC3 hücre hattı, HUVEC hücre hattı, apoptoz, otofaji, buğday çim suyu ekstraktı, Real Time PCR, Western Blot.

ABSTRACT

DETERMINATION OF APOPTOTIC AND OTOFAJIC EFFECTS OF WHEAT GRASS (*Triticum aestivum* L.) EXTRACT IN DIFFERENT CANCER CELL LINES
MSC THESIS
KAMİL TOK
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS
(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. HATİCE YILDIRIM)
BALIKESİR, JUNE 2019

Cancer is a life-threatening disease with serious problems in our country and worldwide. When the structure of cancerous cells change, they cannot perform their normal functions and gain of new other functions. The use of wheat (Triticum aestivum) in developing countries is increasing day by day. Accordingly, the importance of wheat grass leads to controversy. Studies have shown that cereal-based nutrition is protective against many diseases (cancer, diabetes, cardiovascular diseases). In this study, the effect of different concentrations of wheatgrass (Triticum aestivum L.) extract (WGE) on different cell lines prostate cancer cell line (PC3), human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), HEP3B, pancreatic cancer cell line (PANC-1) at 24, 48 and 72 hours time intervals) was investigated. As a result of vitality tests, the highest effect was observed in PC3 cells. WGE application also caused morphological changes in PC3 and HUVEC cells. The effects of WGE administration on PC3 cells on pro apoptotic BAX and autophagy-related Beclin 1 gene expression were elucidated by using Real Time PCR method at mRNA level and by using Western Blot method at protein level As a result of our studies, data have been obtained that apoptotic cell death pathway can be effective in cell death due to WGE application in PC3 cells. It is predicted that the data obtained as a result of this study will shed light on future studies in the field of cancer treatment.

KEYWORDS: PC3 cell line, HUVEC cell line, apoptosis, autophagy, wheat grass extract, Real Time PCR, Western Blot.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
İÇİNDEKİLER iii
ŞEKİL LİSTESİ v
TABLO LİSTESİ vi
SEMBOL LİSTESİ vii
ÖNSÖZ viii
1. GİRİŞ 1
1.1 Genel Bilgiler 1
1.1.1 Kanser 3
1.1.1.1 Prostat Kanseri 5
1.1.2 Hücre Ölümü 10
1.1.2.1 Programlanmış Hücre Ölümü 10
1.1.2.2 Apoptoz 10
1.1.2.3 Otofaji 15
1.1.3 Buğday Çimi 21
2. MATERYAL VE METOD 27
2.1 Materyal 27
2.1.1 Buğday Tohumları 27
2.1.2 Çalışmada kullanılan Laboratuvar Araçlar ve Kimyasalları 28
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar 32
2.2 Metot 33
2.2.1 Buğday Çimi Yetiştirilmesi 33
2.2.1.1 Buğday Çim Ektraktı Eldesi 34
2.2.2 Hücre Kültürü 34
2.2.3 Hücrelerin Açılması 35
2.2.4 Hücrelerin Büyütülmesi 35
2.2.5 Hücrelerin Pasajlanması 36
2.2.6 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı 36
2.2.7 Hücrelerin Dondurulması 36
2.2.8 MTT Hücre Canlılık Testi 37
2.2.9 RNA ve Protein Seviyesinde Apoptotik ve Otofajik Etkilerin Belirlenmesi Amacıyla Hücrelerin Eldesi 38
2.2.10 RNA İzolasyonu 38
2.2.11 RNA Miktar Tayini 38
2.2.12 RNA Jel Elektroforezi 38
2.2.13 Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) 39
2.2.14 cDNA Sentezi 39
2.2.15 PCR 40
2.2.16 Agaroz Jel Elektroforezi 40
2.2.17 Real Time PCR 40
2.2.18 Protein Tabanlı Teknikler 42
2.2.19 Protein Miktar Tayininde Qubit Kullanılması 43
2.2.20 SDS PAGE 43
2.2.21 Proteinlerin Membrana Tranfer Edilmesi 44

2.2.22 Proteinlerin Belirlenmesi 44
2.2.23 UVP Görüntüleme İşlemi 44
2.2.24 Sonuçların Filme Aktarılması 45
3. BULGULAR 46
3.1 Buğday Çiminin Yetiştirilmesi 46
3.2 Çim Ekstraktının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi ... 48
3.3 Çim Ekstraktı Uygulamasının Hücre Morfolojisi ve Davranışı Üzerine Etkisi 53
3.4 PC3 Hücrelerine Çim Ekstraktı Uygulamasının BAX ve Beklin 1 Genlerine Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi 55
3.5 PC3 Hücrelerine Çim Ekstraktı Uygulamasının BAX ve Beklin 1 Genlerine Etkisinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi 59
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 62
5. KAYNAKLAR 66
6. EKLER 82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Apoptoz Yolakları. 15
Şekil 1.2: Otofaji ve selektif otofajinin sınıflandırılması. 18
Şekil 2.1: Karakılçık buğdayı 27
Şekil 2.2: İzlenecek metot tasarımı 33
Şekil 2.3: Kullanılan hücre tipleri 35
Şekil 3.1: Buğday çiminin yetiştirilme aşamaları 46
Şekil 3.2: 30 g olacak şekilde kesilmiş buğday çimleri 47
Şekil 3.3: Buğday çimlerinin ekstraksiyon işlemi 47
Şekil 3.4: A: Santrifujleme sonrası BÇE'nin son hali, B: Filtrasyon sonrası kullanıma hazır BÇE ekstarktı 48
Şekil 3.5: Panc-1 hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 49
Şekil 3.6: Panc-1 hücre hattında 72 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 49
Şekil 3.7: PC3 hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 50
Şekil 3.8: PC3 hücre hattında 72 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 50
Şekil 3.9: Hep3B hücre hattında 24 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 51
Şekil 3.10: Hep3B hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 51
Şekil 3.11: HUVEC hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 52
Şekil 3.12: HUVEC hücre hattında 72 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri 52
Şekil 3.13: Sağlıklı HUVEC hücre hattı 54
Şekil 3.14: Taze BÇE uygulanmış HUVEC hücre hattının son durumu (48 saat) 54
Şekil 3.15: Sağlıklı PC3 hücre hattı 54
Şekil 3.16: Taze BÇE uygulanmış PC3 hücre hatının son durumu (48 saat) .. 55
Şekil 3.17: PC3 hücre hattında BÇE ve su uygulanmış RNA'ların formaldehit agoroz jel elektroforezindeki görüntüsü 56
Şekil 3.18: cDNA Kontrolü- Agoroz Jel Elektroforez görüntüsü 56
Şekil 3.19: BAX geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonu 57
Şekil 3.20: BEKLİN geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonu 58
Şekil 3.21: BAX geninin Western blot analizi 59
Şekil 3.22: BAX geninin protein ekspresyonu 60
Şekil 3.23: BEKLİN geninin Western blot analizi 60
Şekil 3.24: BEKLİN geninin protein ekspresyonu 60

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazlar 28
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan kimyasal listesi 29
Tablo 2.3: RIPA tamponu bileşenleri 32
Tablo 2.4: SDS PAGE jel bileşenleri 32
Tablo 2.5: 1 X FA jel elektroforezi tank tamponu 33
Tablo 2.6: MTT canlılık testi plaka düzeni 37
Tablo 2.7: Hβ2 primerleri için PCR koşulları 40
Tablo 2.8: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler 41
Tablo 2.9: Real Time PCR bileşenleri. 41
Tablo 2.10: Real Time PCR reaksiyon koşulları. 42
Tablo 2.11: Real Time plak deney düzeni 42

SEMBOL LİSTESİ

BÇE : Buğday Çimi Ekstresi
Bcl-2 : B-cell CLL/ Lymphoma 2 geni
Bax : Proapoptotik protein
Bid : Bcl-2 intercting domain
Caspase : Cysteinyl aspartate-spesific protease
CDK2 : Siklin bağımlı kinaz 2
CDK4 : Siklin bağımlı kinaz 4
DISC : Death inducing signaling kompleks
DMEM : Dulbecco" nun modifiye eagle medyumu
DMSO : Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulphoxide)
DNA : Deoksiribonükleik Asit
GDP : Guanidin difosfat
GTP : Guanidin trifosfat
IAP : Inhibitor of apoptosis
IARC : International Agency for Research on Cancer
µg / L : Mikrogram/ Litre
µmol : Mikromol
MAPK : Mitojen ile aktive olan protein kinaz
Mdm2 : Murine double minute 2 gene
MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NF-κB : Nükleer faktör-kappa beta
PBS : Fosfat tamponu
PI : Propidyum iyodid
PI3 : Fosfatidil inozitol-3 vii
TNF-α : Tümör nekroz faktörü-α
Tris-HCl : Tris- Hidroklorik asit
BPH : Benign prostat hiperplazisi
PSA : Spesifik antijen testi
PCD : Programlanmış hücre ölümü
DD : Ölüm domaini
TNRF : Tümör nekroz faktör reseptör
SOD : Süperoksit dismutaz
P53 : Tümör protein 53 geni
PS : Fosfotidilserin
Rpm : Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR : Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
STAT : Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
PI3-K : Fosfotidil inositol 3 kinaz

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim sürecimin deneysel aşamaları Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında tez danışmanım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'ın kontrol ve yönetiminde gerçekleşmiştir.

Çalışmamın her aşamasında bana çalışma ve araştırma olanağı sağlayan, bilgi birikimi, önerileri, maddi ve manevi desteğiyle beni yönlendirirek her zaman yanımda olan en başta danışman hocam Doç. Dr. Sayın Hatice YILDIRIM'a

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimiyle her konuda yardımcı olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Sayın Feray KÖÇKAR'a,

Laboratuvar çalışmalarında her daim yanımda olan ve her konuda destek alabildiğim kardeşlerim dediğim Fk Lab ailesine,

Bu zorlu süreçte bana inanan, güvenen ve her zaman destek olan tüm yakınlarıma,

Tez aşamalarım boyunca bana her zaman her yönden eksiksiz katkı sağlayıp maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan aileme,

Teşekkürlerimi sunuyorum.

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Kanser hastalığı ülkemizde ve dünyada yüksek oranda görülmekte ve ciddi sorunlarla yaşamı tehdit etmesinden dolayı önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Hem sosyal hem de ekonomik olarak insan yaşamını tehdit etmekte ve bu tehdit kitlesel boyutlara ulaşmaktadır. Kanserli hastalarda hastalığı yenmek bir yana seyrinde meydan gelen en ufak düzelmeler hastanın yaşam kalitesini arttırabileceğinden yapılacak çalışmalar çok önemlidir. Birçok farklı kanser tipi mevcut olup kişiden kişiye bile farklılık gösterebilmesi nedeniyle uygulanan tedaviler ilaç madde konsantrasyonları bile büyük farklılıklara sahip ve önemlidir.

T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2015 yılında yaptığı çalışmada kanser daire başkanlığından elde edilen istatiksel verilerine göre erkeklerde en sık görülen kanser tipleri arasında 2. sırada prostat kanseri yer almaktadır. Ölüm oranında bakıldığında yine aynı verilere göre prostat kanseri 5. sırada görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda birçok tedavi yöntemi geliştirilmiş olup bunların başında cerrahi tedavi, radyoterapi ve hormon tedavisi gelmektedir. Yapılan bu tedavi yöntemleri yan etkileri açısından büyük kuşkular uyandırmaktadır. Yan etkilerin azaltılmasına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Hızlı nüfus artışı, bunun sonucu oluşan kirlilik, hızlı sanayileşme daha fazla verim elde edebilme amacıyla kullanım yoğunluğu arttırılan pestisit ve gübre kullanımı, insan kaynaklı kimyasal kontaminasyondaki artış ve bunlara bağlı olarak insan vücuduna ulaşan kanserojen madde oranındaki artışa bağlı olarak diğer kanser türlerinde meydana gelen hastalık görülme riskindeki artış prostat kanserinde de rastlanmaktadır [1, 2]. Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalmalarıyla ön plana çıkmaktadır. Kanser tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır.

Fakat kullanılan tedavilerin yan etkileri ve klinik düzeyde yeterli olmamaları sebebiyle kanser hücrelerinin yayılımını ve hayatta kalmalarını inhibe edecek yeni anti kanser ajanları arayışına yönelinmiştir. Bu yönelim doğrultusunda yeni anti-kanser ajanlarının ortaya çıkarılması bir kez daha önem kazanmıştır. Kanser hastalığının tanımlanması teşhisi ve tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacıyla moleküler düzeyde incelenmesinin gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle yapılan moleküler çalışmalar hangi yolaklarda sorunlara yol açtığı ve bu sorunların nasıl giderileceği esasına dayanmaktadır. Çok hücreli organizmalarda yaşamın devamı için gerekli olan hücre çoğalması gerçekleşirken bir yandan da homeostazı sağlamak için apoptoz, otofaji adı verilen biyokimyasal yolaklarda işlevini yitirmiş ihtiyaç duyulmayan yapısı bozularak anormalleşmiş hücrelerden programlı şekilde kurtulunmaktadır. Apoptoz sağlıklı hücrelerde işlevini devam ettirirken, kanserli hücrelerde bu yolağı başlatacak sinyaller algılanamamaktadır ve buna bağlı olarak kanserli hücre yok edilememekte ve sürekli çoğalmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalar bu ve benzeri yolaklara doğru kaymıştır [3].

Buğday insan yaşamında kullanılan en önemli besleyici temel besin maddeleri içerisinde yer almaktadır. Tam tahıl ürünlerinin birçok hastalığa iyi geldiği ve tedaviye ek gıda olarak tüketildiği bilinmektedir. Tohumun çimlenmesi esnasında dış ortamdan gelebilecek her türlü tehdit ve strese karşı primer, sekonder metabolit ve mineraller sentezlenir [4]. Büyümeye bağlı artan konsantrasyonlarda vitamin, klorofil, antioksidan enzimler, flavonoid, ve birçok mineral bulunmaktadır [5]. Buğday çiminde dikkate değer noktalardan en önemlisi şüphesiz ki kanser hastalarına kemoterapiden sonra verildiğinde ilacın yan etkilerini azalttığı yönündeki gözlemlerdir [6].

Günümüzde yapılan çalışmalar alternatif tıp olarak adlandırılan bitkisel kökenli tedavi üzerine yoğunlaşmaktadır. Yapılan araştırmalar gösteriyor ki dünya çapındaki tüm kanserlerin % 7-31'i yüksek sebze ve meyve diyetiyle azaltılabilmektedir [7, 8]. Bitki kökeninden gelen biyoaktif moleküllerin birçoğunda özellikle ilaçların yan etkilerini azaltma [6], ateroskleroz, diyabet, alzheimer benzeri hastalıkların önlenmesi [9, 10], oksidatif stresin önlenmesi [11, 12], tümör hücrelerinde çoğalmayı engellemede ve apoptozun başlamasında [13] ve oksidatif stres önlenmesi gibi pozitif etkileri olduğu bilinmektedir.

Yapılan çalışmalardan çıkan olumlu sonuçlar alternatif tıp alanında yapılan ve yapılacak çalışmalara önayak olmuştur [8].

Prostat kanseri erkekler arasında dünya genelinde başı çekmektedir. Türkiye'de bu durumun ikinci sıralarda olduğu görülmektedir. Tedavi açısından bakılacak olursa birçok yöntem geliştirilmiş olup farklı yöntemler için arayışlara girişilmiştir. Fitoterapi ismi verilen bitkisel kökenli tedavi yöntemleri günümüzde büyük önem kazanmış ve yaygınlaşmaktadır. Bu alana yönelimin en büyük sebebi ameliyat sonrası iyileşme sürelerindeki uzun sürün süreç ve uygulanan kemoterapötik ilaçların yan etkilerinin insan sağlığı açısından önemli sorunlara yol açabilme potansiyeline sahip olma durumlarıdır [14-17].

1.1.1 Kanser

Kanser genel olarak hücrelerin mutasyonlar sonucu düzensiz çoğalıp farklılaşmasına ve yayılmasına bağlı olarak oluşan kötü urlara verilen isimdir. Sağlıklı hücreler ne zaman ve ne oranda çoğalacağını bilme eğilimindedirler fakat kanser hücreleri sonsuz bölünme yeteneği kazanmış hücrelerdir. Sağlıklı hücrelerin yani sınırlı hücre bölünme yeteneğinde olan ve hücrede sinyal iletimi, DNA onarımı ve apoptoz ve otofaji gibi hücre ölümünde rol alan genlerdeki mutasyona bağlı olarak kontrolsüz çoğalma ve yayılım gösteren hücrelerin oluşturduğu kitleye tümör adını verilir [18]. Bu hücrelerde gözlemlenen kontrolsüz çoğalma yeteneği, kan veya doku sıvılarıyla başka dokulara geçebilme yetisi ve buralarda metastaz yapması kanseri tehlikeli kılan olan karakteristik özelliklerinden bazılarıdır.

Tümör denilen kitleler çoğalma ve başka dokulara sıçrama özelliği göstermezse yani sadece küme halinde kalırlarsa bunlar iyi huylu (benign) tümör olarak adlandırılır. Kan ve lenf sıvıları vasıtasıyla çevre doku ve organlara yayılan tümörlere kötü huylu (malign) tümör adı verilir. Kanserli hücrelerde yapısal anlamda birçok değişiklik olmuştur.

Kanserli hücreler yapısal değişikliğe uğradıklarında normalde yaptıkları fonksiyonları yapamayacak duruma gelirler bunların dışında daha önce yapmadıkları farklı özellikler kazanırlar. Bu durumda baskılanma mekanizmalarını da kaybederek kontrolsüz çoğalma eğilimine geçerler apoptoza giremezler [19]. Bu morfolojisi değişmiş hücrelerde meydana gelen kontrolsüz çoğalım ve yayılım tek başına kanserleşmeye yeterli değildir apoptoz yolaklarında meydana gelen mutasyonlar temel neden içerisine yer almaktadır [19].

Tümörler başladıkları ve köken aldıkları yere bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Epitel hücrelerden (deri, meme, ürogenital sistem) köken alan tümör oluşumlarına karsinom [20], kökeni salgı dokularından geliyor ise adenokarsinom [21], mezoderm kökenliler (kas, kemik, kıkırdak) ise sarkom olarak [22] adlandırılmaktadır.

Her sene yapılmakta olan istatistiklere göre kanserden ölüm ve kanser tanı sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Globocan 2018 verilerine göre 18,1 milyon kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümü ortaya çıkmıştır. Her iki cinsiyette de kanser kaynaklı ölümün başında bulunan kanser olarak akciğer kanseri (tüm kanserlerin % 11,6'sını oluşturmakta) tanımlanmıştır. Ayrıca tüm kanser ölüm oranlarının da % 18,4'ünü oluşturmaktadır. Bunu takiben meme kanseri (% 11.6), prostat kanseri (% 7.1), kolerektal kanser (% 6.1), mide kanseri (% 8.2), karaciğer kanseri (% 8.2) ölüm oranına sahiptir. Akciğer kanseri erkekler arasında en çok görülen kanser tipidir bunu prostat, kalın bağırsak kanseri, karaciğer ve son olarakta mide kanseri izlemektedir. Kadınlar arasında meme kanseri en sık tanı alan kanserdir ve kanser ölümünde başta gelen nedendir, bunu kolorektal ve akciğer kanseri (görülme sıklığı için) ve tam tersi için (ölüm için); rahim ağzı kanseri hem insidans hem de mortalite için dördüncü sıradadır. Kanser görülme sıklığı ve ölüm oranlarındaki artış ülkelerin ekonomik gelişmişlik derecesine ve buna bağlı olarak sosyal ve yaşam tarzı gibi unsurlara bağlı olarak büyük ölçüde farlılık gösterip değiştiği görülmektedir. Bu düşük ve orta gelirli ülkelerde kanıt tabanlı kanser kontrol programlarının mümkün olmayan planlanması ve uygulanması için yüksek kaliteli kanser kayıt verilerinin kayda değer olması dikkat çekicidir.

Kanser Kayıt Geliştirme için Küresel Girişim, ulusal kanser kontrol çabalarına öncelik vermek ve değerlendirmek için daha iyi tahminlerin yanı sıra yerel verilerin toplanması ve kullanılmasını destekleyen uluslararası bir ortaklıktır [23].

1.1.1.1 Prostat Kanseri

Prostat kanseri erkeklerde önemli ölüm oranı ile başlarda gelen kanser tipinden birisidir. Prostat kanseriyle ilgili birçok çalışma olmasına rağmen özellikle Türkiye'de ilaç ve kimyasal önleyici keşfetme adına birçok çalışma devam etmektedir. Bu tür çalışmaların yapılmasına rağmen günümüzde hala erkekleri tehdit eden en önemli hastalıklar içerisinde yer almaya devam etmektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2014 araştırma verilerine göre istatiksel analizler baz alındığında prostat kanseri erkekler için 2. sırada bir tehdit olduğu görülmektedir.

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (Internatioanal Agency for Research on Cancer) erkeklerde görülen prostat kanserinin ilerleyen zamanlarda artacağına dikkat çekilmiş görülme sıklığının bir önceki verilere göre arttığı gözlemlenmiştir. Dünya genelinde erkekler arasında prostat kanserine yakalanma açısından 2. Sırada yer alırken ölüm oranı açısından 5. sıralarda olduğu bilinmektedir [24].

Prostat bezi, pelvik boşlukta bulunan erkek üreme sisteminin bir organıdır. İnce bir fibromüsküler tabaka ile sarılır ve dört bölgeye ayrılabilir: ön bölge, geçiş bölgesi ve çevre bölge. Çoğu benign prostat hiperplazisi (BPH), geçiş bölgesinde ve merkezi bölgede gelişir. Dorsal ve rektuma en yakın periferik bölge, prostat hacminin % 70'ini oluşturur. Çoğu prostat karsinomu periferk zondan kaynaklanır. Ön bölge dışında, prostat bir fibromüsküler stroma içine gömülmüş salgılayıcı prödostratif bir kolumnar epitel ile glandüler dokudan oluşur. Prostatın ana işlevi, hafif asidik (pH=6.4) olan ve semenin % 20'sini (hacimce) oluşturan prostat sıvısını salgılamakadır. Prostat salgıları çinko, sitrat ve PCa biyobelirteç, prostat spesifik antijen (PSA) olmak üzere birçok önemli faktör içerir.

PSA, normal semenize edici fonksiyonel rolü olan prostat epitel hücreleri tarafından salgılanan bir glikoproteindir. PSA ayrıca kan dolaşımına girer ve dolaşımdaki yükselişi prostat kanseri varlığının göstergesidir. Dolaşımdaki PSA seviyesi, prostatın büyüklüğü ile doğru orantılıdır ve BPH' de de yükselebilir [25].

Prostat kanseri prostat adı verilen erkek üreme sitemindeki bezde meydana gelir. Çoğu prostat kanseri yavaş büyüme gösterir ancak bazı tiplerinde hızlı büyümede gözlemlenmektedir [26]. Kanser hücreleri prostattan vücudun diğer bölgelerine, özellikle de kemiklere ve lenf bezlerine yayılabilir. Başlarda semptomlar gözlemlenmeyebilir sonraki aşamalarda idrar yaparken zorluk, idrarda kan ağrı gibi semptomlarla varlığını hissettirmeye başlar. Benign prostat hiperplazisi olarak bilinen bir hastalık benzer semptomlara neden olabilir. Diğer geç semptomalar, kırmızı kan hücrelerindeki düşüş nedeniyle yorgun hissetmeyi içerebilir.

Prostat kanseri riskini arttıran faktörler arasında yaşlılık, hastalığın aile öyküsü ve ırk sayılabilir [26]. Vakaların yaklaşık % 99'u 50 yaşın üstündeki erkeklerde görülür [26]. Birinci dereceden hastalıklı bir akrabaya sahip olmak hastalığa yakalanma riskini iki ila üç kat arttırmaktadır [26]. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Afro-Amerikan popülasyonda, Beyaz Amerikan popülasyonundan daha yaygındır [26]. İlgili diğer faktörler arasında yüksek oranda işlenmiş et, kırmızı et veya süt ürünleri içeren bir diyet veya bazı sebzelerce düşük diyet yer almaktadır [26]. Bel soğukluğuyla da ilişkisi olduğu bulunmuş fakat bu ilişkinin nedeni henüz keşfedilememiştir [27]. Prostat kanseri ayrıca BRCA mutasyonlarıyla da ilişkilidir [28]. Prostat kanseri genelde biyopsi ile teşhis edilir [29]. Kanserin vücudun diğer bölgelere yayılıp yayılmadığı ise tıbbı görüntüleme yollarıyla belirlenebilmektedir [29]. Prostat kanseri taraması tartışmalı bir konudur [30]. Prostat spesifik antijen (PSA) testi kanser tespitini arttırır ancak sonuçları geliştirip geliştirmediği konusunda tartışmalar sürmektedir [30-32]. 5a- redüktaz inhibitörleri düşük dereceli kanser riskini azaltırken, yüksek dereceli kanser riskini etkilemez bu nedenle kanserin önlenmesi için kullanılması önerilmez [26].

Birçok vakada aktif gözlem ve kontrol altında tutmak önemli rol oynamaktadır [33]. Diğer tedavi yöntemleri ise cerrahi, radyasyon tedavisi, hormon tedavisi ve kemoterapinin bir kombinasyonunu içerebilmektedir [33]. Sadece prostat içerisinde meydana geldiğinde tedavi edilebilir.

Hastalığın kemiklere yayıldığı durumlarda ağrı kesici ilaçlar, bifosfonatlar, ve hedefe yönelik tedavi yöntemleri kullanılabilmektedir [33]. Tedaviden alınacak sonuçlar kişinin yaşına, diğer sağlık sorunlarına ayrıca kanserin ne kadar agresif olduğuna göre değişebilmektedir [33].

Prostatlı hastaların çoğu artık yaşamını yitirmemektedir [33]. ABD' de 5 yıllık sağ kalım oranı % 99'dur [34]. Küresel olarak da erkeklerde yakalanma oranı en fazla olan 2.kanser tipi olup ölüm oranında 5. sıralarda yer almaktadır [35].

Erken dönemdeki prostat kanseri genellikle belirgin bulgulara sahip değildir. Bazen prostat kanseri, iyi huylu prostat hiperplazisi gibi hastalıklara benzer semptomlar gösterebilmektedir. Bunlar arasında sık idrara çıkma, nokturi (gece idrara çıkmada artış olması durumu), idrarı başlatma ve sürdürme zorluğu, hematüri (idrarda kan) ve dizüri (ağrılı idrara çıkma) bulunur. ABD'de 1998 de Hasta Bakım Değerlendirmesine dayanan bir çalışmada, prostat teşhisi konan hastaların yaklaşık üçte birinde bir veya daha fazla semptom olduğunu, üçte ikisin de ise hiçbir semptom olmadığını tespit etmiştir [36].

Prostat bezi prostatik üretrayı çevrelediği için üriner disfonksiyon ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, bez içerisindeki değişiklikler idrar fonksiyonunu etkiler. Çünkü vaz deferans (meni kanalı) prostatik üretra içine seminal sıvı bıraktığından ve prostat bezinden salgılanan sıvılarda semen içeriğine dahil edildiğinden, prostat kanseri ayrıca ereksiyon veya ağrılı boşalma gibi zorluklara yani cinsel fonksiyon ve performans sorunlarına nedende olmaktadır [36]. Vücudun diğer bölümlerine yayılmış olan metastatik prostat kanseri, ek semptomlara neden olabilir. En sık görülen semptom kemik ağrılarıdır, genellikle omurlarda (omurganın kemikleri), pelvis veya kaburgalarda görülmektedir. Kanserin femur gibi diğer kemiklere yayılması genellikle kemiğin proksimal veya yakın kısımlarında gözlenir. Omurgadaki prostat kanseri ayrıca omuriliği sıkıştırarak karıncalanma, bacak güçsüzlüğü, istem dışı idrar ve dışkı kaçırmaya neden olabilmektedir [37].

1.1.1.1.1 Risk Faktörleri

Prostat kanseri nedenlerini hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır [38]. Birincil risk faktörleri arasında obezite, yaş ve aile öyküsü bulunmaktadır. Prostat kanseri, 45 yaşından küçük erkeklerde çok nadir görülür, ancak ilerleyen yaşta daha yaygın hale gelir. Tanı sırasındaki ortalama yaş 70'tir. Çoğu erkek, prostat kanseri olduğunu asla bilemez [39].

Bunu destekleyici bilgi olarak da başka nedenlerden dolayı ölen Çin, Alman, İsrail, Jamaika, İsveç ve Ugandalılarla yapılan otopsi çalışmalarında, ellili yaşlardaki erkeklerin % 30'unda, yetmişli yaşlardaki erkeklerin % 80'inde prostat kanserinin bulunmuş olması gösterilebilir [40].

Birinci derece aile üyelerinde prostat kanseri olan erkeklerin, ailede prostat kanseri olmayan erkeklerle karşılaştırıldığında hastalığa yakalanma riskinin iki katı olduğu görülmektedir [41]. Bu risk, prostat kanserine yakalanmış bir erkek kardeşi olan erkekler için prostat kanserine yakalanmış bir babası olan erkeklerden daha büyük görünmektedir [42]. Ayrıca kan basıncı yüksek olan erkeklerde prostat kanseri gelişme olasılığının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [43]. Egzersiz eksikliği ile ilişkili olarak da prostat kanseri riskinin az da olsa bir artış gösterdiği belirtilmiştir [44].

Prostat kanserinden tek bir gen sorumlu değildir, birçok farklı gen söz konusudur. Kadınlarda yumurtalık kanseri ve meme kanseri için önemli risk faktörleri olan BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonların da prostat kanserinde rol oynadığı belirtilmiştir [45]. Ayrıca diğer ilişkili genler arasında Kalıtsal Prostat kanseri geni 1 (HPC1), androjen reseptörü ve D vitamini reseptörü de bulunmaktadır [46]. Tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler) prostat kanserine bağlayan iki büyük genom çapında ilişkilendirme çalışması 2008'de yayımlanmıştır. Bu çalışmalar, bazı SNP'lerin prostat kanseri riskini büyük ölçüde etkilediğini ortaya koymuştur [47, 48]. Son olarak, obezite ve kandaki yüksek testosteron seviyeleri prostat kanseri riskini arttırmada rol oynadığı tespit edilmiştir [49, 50].

Prostat, seminal sıvının hazırlanmasına ve depolanmasına yardımcı olan erkek üreme sisteminin bir parçasıdır. Yetişkin erkeklerde, tipik bir prostat yaklaşık 3 santimetre uzunluğunda ve yaklaşık 20 gram ağırlığındadır. Pelviste, idrar kesesinin altında ve rektumun önünde bulunur. Yerinden dolayı, prostat hastalıkları sık sık idrara çıkma, boşalma ve nadiren dışkılamayı etkiler. Prostat, semen oluşturan sıvının yaklaşık % 20'sini yapan birçok küçük bez içerir. Prostat kanserinde bu prostat bezlerinin hücreleri kanser hücrelerine dönüşür. Prostat bezlerinin düzgün çalışması için androjenler olarak bilinen erkek hormonları gerekir. Androjenler testislerde yapılan testosteronu; adrenal bezlerde yapılan dehidroepiandrosteronu ve prostatın içindeki testosterondan dönüştürülen dihidrotestosteronu içerirler.

Androjenler ayrıca yüz kılı ve artmış kas kütlesi gibi sekonder cinsiyet özelliklerinden de sorumludurlar [51-53].

Prostat kanserlerinin çoğu, normal semen salgılayan prostat bezi hücrelerinin kanser hücrelerine dönüşmesiyle başlayan adenokarsinomlar veya glandüler kanserler olarak sınıflandırılır. Adenokarsinomun en yaygın olduğu prostat bezi bölgesi, periferik bölgedir. Başlangıçta, küçük kanser hücresi kümeleri, in situ karsinoma olarak bilinen veya prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) olarak bilinen bir durumla normal prostat bezleriyle sınırlı kalır. PIN'in bir kanser öncüsü olduğuna dair kanıt olmamasına rağmen, kanserle yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Zamanla, bu kanser hücreleri çoğalır ve çevresindeki bir prostat dokusuna (stroma) yayılarak tümör oluşumuna neden olur.

Sonunda, tümör seminal veziküller veya rektum gibi organları istila etmeye yetecek kadar büyüyebilir veya tümör hücreleri kan dolaşımında ve lenfatik sistemde seyahat etme yeteneğini geliştirebilir. Prostat kanseri, vücudun diğer alanlarını istila edebilen bir hücre kütlesi olduğu için malign bir tümör olarak kabul edilir. Bu diğer organların istilasına metastaz denir. Prostat kanseri en sık kemiklere, lenf bezlerine metastaz yapar ve lokal ilerlemeden sonra rektum, mesane ve alt üreterleri istila edebilir [52].

Kanser baskılayıcı genlerin kaybı, prostatik karsinojenezin başlarında, *8p*, *10q*, *13q* ve *16q* kromozomlarında lokalize edilmiştir. Primer prostat kanserinde P53 mutasyonları nispeten düşüktür ve metastatik ortamlarda daha sık görülür, bu nedenle, p53 mutasyonları prostat kanseri patolojisinde geç dönemde gerçekleşebilir. Prostat kanserinde rol oynadığı düşünülen diğer tümör baskılayıcı genler arasında PTEN ve KAI1 de bulunur.

RUNX2 transkripsiyon faktörünün, kanser hücrelerinin apoptoz geçirmesini önlediği ve böylece prostat kanseri gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [54]. PI3K/Akt sinyalleşme kaskadının, prostat kanseri hücresinin hayatta kalmasını ve apoptoza karşı korunmasını sağlamak için TGF-β/SMAD sinyal kaskadı ile birlikte çalıştığı belirtilmiştir [55]. X'e bağlı apoptozis inhibitörü (XIAP), prostat kanseri hücresinin hayatta kalmasını ve büyümesini teşvik ettiği tespit edilmiştir [56].

Makrofaj inhibitör sitokin-1'in (MIC-1), prostat kanseri hücresinin büyümesine ve hayatta kalmasına yol açan fokal adezyon kinazı (FAK) sinyal yolunu uyardığı belirlenmiştir [57].

1.1.2 Hücre Ölümü

Hücre ölümü, işlevlerini yerine getirmeye bırakan hücreler için biyolojik bir olaydır. Bu durum yaşlanan hücrelerin doğal yollarla ölüp yerine yeni hücrelerin gelmesiyle olabildiği gibi hastalık lokalize yaralanma yada hücrenin parçası olduğu organizmasının ölümü gibi faktörlerden dolayı da olabilir. Apoptoz veya Tip I hücre ölümü ve otofaji veya Tip II hücre ölümü, programlanmış hücre ölüm mekanizmasının her iki formudur, nekroz yaralanma veya enfeksiyon sonucu ortaya çıkan fizyolojik olmayan bir süreçtir [58].

1.1.2.1 Programlanmış Hücre Ölümü

Programlanmış hücre ölümü (PCD) , hücre içi bir program vasıtasıyla gerçekleşen hücre ölümüdür [59, 60]. PCD, bir organizmanın yaşam döngüsü sırasında genellikle avantaj sağlayan düzenlenmiş bir süreçte gerçekleştirilir. Örneğin, gelişmekte olan bir insan embriyosunda el ve ayak parmaklarının farklılaşması, parmaklar arasındaki hücrelerde apoptoz nedeniyle meydana gelir. PCD, hem bitki hem de metazoa yani çok hücreli hayvanlarda doku gelişimi sırasında temel işlevler hizmet etmektedir[59, 61].

1.1.2.2 Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından klasik bir bildiride, apoptoz kavramının bazı bileşenleri daha önce açıkça belirtilmiş olmasına rağmen, morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tanımlamak için kullanılmıştır [62]. Memeli hücrelerinde apoptozis sürecinde yer alan mekanizmaların anlaşılması, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında ortaya çıkan programlanmış hücre ölümünün araştırılmasından doğmuştur [63].

Apoptoz o zamandan beri, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş bir şekilde elimine edilmesini içeren, ayırt edici ve önemli bir programlanmış hücre ölümü şekli olarak kabul edilmiştir [64]. Apoptoz normal gelişim ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar.

Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak veya hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar görmesiyle de ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücrelerin aynı uyarana yanıt olarak mutlaka ölmesi gerekmez. Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde p53'e bağımlı bir yolak üzerinden apoptotik ölüme yol açabilecek DNA hasarına neden olur. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar da, bazı hücrelerde apoptotik ölüme neden olabilirler [65]. Bazı hücreler ligand bağlama ve protein çapraz bağlama yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF (Tümör nekroz faktör) reseptörlerini eksprese eder. Diğer hücreler, hormon veya büyüme faktörü gibi faktörlerce engellenmesi gereken varsayılan bir ölüm yoluna (nekroz) sahiptir. Apoptozun nekrozdan ayırt edilmesinde, aynı anda hem sırayla, hem de bağımsız olarak gerçekleşebilecek iki işlem söz konusudur [66]. Bazı durumlarda, hücrelerin apoptoz veya nekrozla ölüp ölmeyeceğini belirleyen uyaranların tipi ve / veya uyaranların derecesidir. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar apoptozu indükleyebilir, ancak bu aynı uyaranlar daha yüksek dozlarda nekroz ile sonuçlanabilir. Son olarak, apoptozis, "kaspazlar" adı verilen bir sistein proteaz grubunun aktivasyonunu ve başlangıç uyarıcılarını hücrenin nihai ölümüne bağlayan karmaşık olaylar kaskadını içeren koordine ve sıklıkla enerjiye bağlı bir prosestir [67].

1.1.2.2.1 Apoptoziste Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

Morfolojik açıdan apoptotik hücreler, karakteristik bir sitoplazmik hücre büzülmesini, plazma zarının tomurcuklanmasını, kromatin yoğunlaşmasını ve DNA fragmantasyonunu gösterirler [68, 69].

Plazma zarı tüm proses boyunca bozulmadan kalır. Fosfatidilserinin hücre zarının dış katmanlarında ekspresyonu, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasını sağlar ve proinflamatuar hücresel bileşenlerin salınmasına gerek duyulmadan fagositoz ile sonuçlanır [70]. Apoptozisin ilerleyen aşamalarında, morfolojik değişiklikler, membran yüzeyinde çıkıntı oluşumu, sitoplazmik organellerin ultrastrüktürel modifikasyonu ve membran bütünlüğünün kaybı şeklinde karşımıza çıkar [71]. Genellikle fagositik hücreler, apoptotik cisimler meydana gelmeden önce apoptotik hücreleri içine çeker [72].

Apoptozis esas olarak kaspazlar (sisteinil, aspartata özgü proteazlar) olarak bilinen proteaz ailesi tarafından gerçekleştirilir [73]. Kaspazlar, hem başlatıcılar (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) hem de uygulayıcılar (Kaspaz-3, -6 ve -7) olarak hücre ölümünün gerçekleştirilmesinden sorumludurlar [74]. İnaktif proteinler (zimojenler veya pro-kaspazlar) olarak üretildikten sonra, başlatıcı kaspazlar, spesifik adaptör molekülleri ile etkileşime girerek kolaylaştırılan bir işlem olan oto proteoliz yoluyla otomatik olarak aktive olurlar [75]. Başlatıcı kaspazlar aktive edildiğinde nihai apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanan belirli hücresel substratların kritik bölünmesini gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlardan ayrılır. Bu kaspazların aktivitesi, kromatin yoğunlaşması, plazma zarı asimetrisi ve hücresel kanama gibi apoptotik işaretlerden sorumludur [76]. Uygulayıcı kaspazlarının aracılık ettiği geniş ve geri döndürülemez proteolitik aktivite, hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik yolların nihai sonucunu temsil eder. Böylece, her iki yol da apoptozda tipik morfolojik değişiklikleri indükleyen DNA ve hücresel bileşenlerin bozulmasına izin veren kaspaz-3, -6 veya -7 üzerinde birleşir [77].

1.1.2.2.2 Ekstrinsik Apoptotik Yolak

Ekstrinsik apoptotik yol (ölüm reseptörüne bağlı olarak), tümör nekroz faktörü reseptörünün (TNFR) süperailesine ait hücre yüzeyine ekpoze edilen ölüm reseptörlerinin, ilgili TNF ailesi ligandları ile etkileşime girmesiyle başlatılır [78]. Ölüm reseptörleri yapısal olarak apoptoz indükleyici sinyalizasyona kritik bir şekilde dâhil olan, ölüm bölgesi (DD) adı verilen hücre içi bir protein-protein etkileşimi domainiyle tanımlanır [79].

Ölüm reseptörlerinin daha geniş bir şekilde karakterize edilmiş sinyalizasyon sistemleri arasında TNFR1-TNF-α, FAS (CD95, APO-1) - FasL, TRAILR1 (DR4) - TRAIL, TRAILR2 (DR5) - TRAIL bulunur. Ölüm reseptörünün karşılık gelen ligand tarafından uyarılması üzerine, aynı reseptör, diğer DD içeren proteinlerle homotipik etkileşimleri desteklemek ve sitoplazmik DD'yi ortaya çıkarmak için oligomerizasyona ve konformasyonel bir değişikliğe uğrar [78]. Apoptozisin ekstrinsik fazını tanımlayan olayların sırası, en iyi FasL / FasR ve TNF-a / TNFR1 modelleri ile tanımlanır.

Bu modellerde, alıcı kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanma vardır. Ligand bağlanması üzerine, reseptörlerle bağlanan karşılık gelen ölüm domainlerini sergileyen sitoplazmik adaptör proteinleri kullanılır.

Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör proteini FADD'ye bağlanmasıyla ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması, TRADD adaptör proteinine FADD ve RIP'i rekruite ederek bağlanmasıyla sonuçlanır [80-82]. FADD daha sonra ölüm efektör bölgesinin dimerizasyonu ile prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in otomatik katalitik aktivasyonuyla sonuçlanan ölüm indükleyici bir sinyal kompleksi (DISC) oluşur [83]. Kaspaz-8 aktive edildiğinde, apoptozun yürütme fazı tetiklenir. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz, FADD ve kaspaz-8'e bağlanacak ve onları etkisiz hale getirecek olan c-FLIP adlı bir protein tarafından inhibe edilebilir [84, 85].

1.1.2.2.3 İntrinsik Apoptotik Yolak

İçsel apoptotik yolağa (mitokondriye bağımlı), farklı stres koşullarına (radyasyon, kemoterapötik ajanlarla muamele, vb.) cevap olarak mitokondriyal seviyede birleşen hücre içi sinyaller aracılık eder [86]. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca^{+} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi içsel uyaranlar, iç mitokondriyal yolağın başlamasının tetikleyicileridir [87]. Bcl-2 familyasının (Bax, Bak) apoptotik BH3-üyelerinin daha sonraki aktivasyonu, antiapoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'i nötralize ederek, mitokondriyal membranın dış membran geçirgenliğinin (MOMP) bozulmasına neden olur.

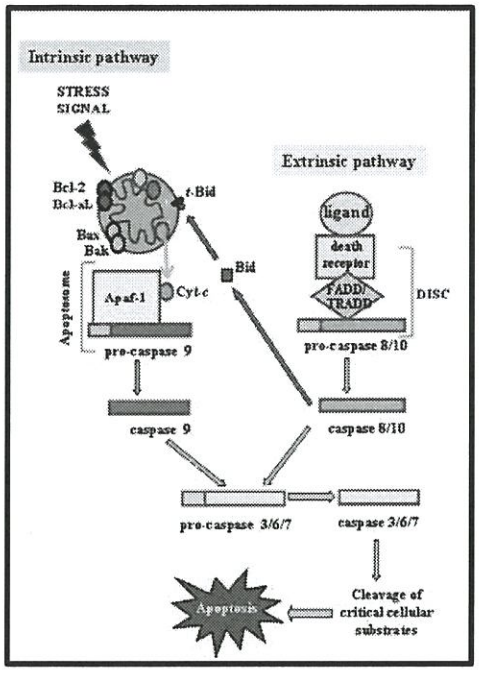
Böylece normalde hücreler arası boşlukta sınırlı kalan proteinler sitozole yayılma fırsatı bulurlar. Bu proteinler, sitozolde mitokondriyal bağımlı ölümü aktive etmede önemli rol oynayan sitokrom-c gibi apoptojenik faktörleri içerir [88]. Sitokrom-c, sitozolik Apaf-1'e (apoptoz proteaz aktive edici faktör-1) bağlanır ve başlatıcı prokaspaz 9'u kaspaz alım bölgesine (CARD) rekruit eden, otoaktivasyona ve ardından proteolize izin veren apoptozom adlı bir kompleks oluşumunu tetikler. Proses sırayla apoptotik hücre ölümüne yol açan hücresel substratların bölünmesi için downstream yürütücü kaspazlar-3, -6 ve -7'yi aktive eder [89, 90].

1.1.2.2.4 B Hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) Ailesi Proteinleri

İntrinsik yol, hücre içi proteinlerin B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi tarafından düzenlenir. Bu protein ailesi, MOMP'nin değişimini kontrol eden hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik intrinsik yolakları düzenler [91].

Bu nedenle Bcl-2 proteinleri, mitokondriyal zarın geçirgenleştirilmesine aracılık ederek, apoptotik bir anahtar olarak görev yapar [92]. Bcl-2 proteinleri, BH1 ila BH4'te listelenen tipik BH (Bcl-2 Homoloji) domain adlarının bileşimine bağlı olarak, bir grubu anti-apoptotik ve iki grubu da pro-apoptotik fonksiyona sahip olmak üzere üç alt gruba ayrılır [93, 94].

Pro-apoptotik proteinlerle dimerizasyon için BH1 ve BH2 Bcl-2 domainlerine ihtiyaç duyulurken, BH3 domaini pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim için çok önemlidir ve tüm aile üyelerinde mevcut olarak bulunur [95]. Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salıverilmesini bloke ederek apoptozu düzenlerken, proapoptotik proteinler, bu salıvermeyi teşvik ederek etki eder. Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ve protein-protein etkileşimleri, bir hücrenin hücre sağkalımı veya apoptoz geçirip geçirmediğini belirlemek için gereklidir. Bax ve Bak'ın aktivasyonu, mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştiren sonda homo-oligomerik protein komplekslerinin oluşumunu tetikleyen konformasyonel değişiklikleri içerir [96, 97].



Şekil 1.1: Apoptoz Yolakları [98].

1.1.2.3 Otofaji

Otofaji, mayadan insana kadar tüm ökaryotik hücreli canlıları kapsıyan hücresel stres yanıt mekanizmasıdır. Hücre içerisinde sorunlu olan, yanlış katlanmış, birikimi olmuş proteinlerin, hasara uğramış organellerin, hücre içerisindeki uzun ömürlü proteinlerin sindirilip geri dönüşümünde ve kalitesinin kontrolünde görev alan bir sistemdir. Otofaji bu geri dönüşüm mekanizması dışında stres durumlarında hücre canlılığı için temel yapıtaşlarının üretilmesinden de sorumludur ve bu amaçla da aktive olur [99].

Yunanca kendini yemek anlamına gelen otofaji terimi, ilk olarak 40 yıl önce Christian de Duve tarafından ve büyük ölçüde, pankreatik bir hormon olan glukagon ile perfüze edilen sıçan karaciğerinin lizozomlarındaki mitokondri ve diğer hücre içi yapıların gözlemlenen bozulmasına dayandırılarak keşfedildi [100]. Karaciğerde glukagonla indüklenen otofaji mekanizması, moleküler seviyede hala tam olarak anlaşılmamıştır, bunun dışında, kinetik-A'nın siklik AMP kaynaklı aktivasyonunu gerektirmektedir ve dokuya spesifiktir [101].

Son yıllarda, bilim dünyası, moleküler anlayışımıza ve sayısız laboratuvardan gelen bu sürecin fizyolojik önemini takdir etmemize sunduğu büyük katkılarla, otofajiyi yeniden keşfetti [102, 103]. Otofajinin önemi memeli sistemlerinde iyi tanınmasına rağmen, otofajinin moleküler düzeyde nasıl düzenlendiğini ve uygulandığını belirleyen mekanik atılımların çoğu ilk olarak mayada yapılmıştır [102, 104]. Halen, 32 farklı otofajiye bağlı gen, mayadaki genetik tarama ile tanımlanmıştır ve önemli ölçüde, bu genlerin birçoğu balçık küflerinde, bitkilerde, kurtlarda, sineklerde ve memelilerde korunmakta olup, filogenetikte açlığa karşı tepkilerde otofajik sürecin önemini vurgulamaktadır [102]. Hepsi lizozomdaki sitozolik bileşenlerin proteolitik parçalanmasını destekleyen tanımlanmış üç tür otofaji vardır: makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon aracılı otofaji. Makro-otofaji, bir otolizozom oluşturmak için lizozomla kaynaşan, bir otofagozom olarak adlandırılan, bir çift membran bağlı vezikül aracısı vasıtasıyla lizozoma sitoplazmik kargo sağlar. Buna karşılık Mikro-otofajide, sitozolik bileşenler lizozomal membranın invajinasyonuyla doğrudan lizozom tarafından alınır. Hem makro hem de mikro-otofaji, seçici ve seçici olmayan mekanizmalar yoluyla büyük yapıları içine alabilir. Şaperon-aracılı otofajide, hedeflenen proteinler, lizozomal zar reseptörü lizozomal-ilişkili zar proteini 2A tarafından tanınan, çözülmelerine ve bozulmalarına yol açan bir kompleks içinde, lizozomal zar boyunca yer değiştirir [105].

1.1.2.3.1 Temel Otofaji Sistemi

Otofaji, endoplazmik retikulum ve / veya trans Golgi ve endozomların katkıda bulunduğu lipid çift katmanından türetilen bir fagofor olarak da bilinen bir izolasyon membranı ile başlar, bununla birlikte memeli hücrelerinde fagoforun tam kökeni tartışmalıdır [106, 107]. Bu fagofor, protein agregatları, organeller ve ribozomlar gibi hücre içi kargoları içine alacak şekilde genişler, böylece kargoyu çift membranlı bir otofagozom içinde sekestre eder [108]. Yüklenen otofagosom, lizozomla füzyon yoluyla olgunlaşır ve bu, otofagozomal içeriğinin lizozomal asit proteazlarla bozunmasını sağlar. Lizozomal permeazlar ve taşıyıcılar, amino asitleri ve diğer bozunma ürünlerini, sitoplazmaya geri gönderirler, burada makromoleküller oluşturmak ve metabolizma için tekrar kullanılabilirler [108].

Dolayısıyla, otofaji, ATP üretme yoluyla enerji verimliliğini destekleyen ve işlevsel olmayan proteinleri ve organelleri kaldırarak hasar kontrolüne aracılık eden hücresel bir 'geri dönüşüm fabrikası' olarak düşünülebilir.

Bu karmaşık işlem moleküler düzeyde 5 aşamada düzenlenir.

Bunlar (a) fagofor oluşumu veya çekirdeklenme (b) Atg5-Atg12 konjugasyonu, Atg16L ile etkileşim ve fagoforda multimerizasyon (c) LC3 prosesi ve uzayan fagofor zarına insersiyonu (d) degredasyon için rastgele veya seçici hedeflerin yakalanması ve (e) otofagozomun lizozomla füzyonu, ardından yutulmuş moleküllerin lizozomal proteazları ile proteolitik degredasyonu.

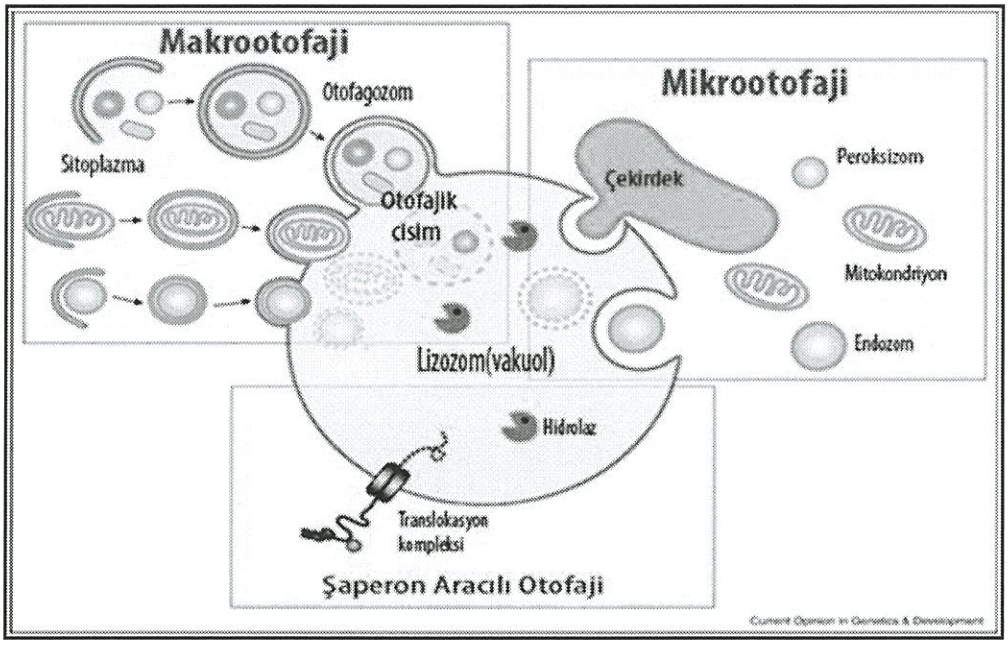
1.1.2.3.2 Seçici Otofaji Sistemi

Seçici otofaji, hasarlı organeller, yanlış katlanmış proteinler veya istilacı patojenler gibi belirli kargo tiplerinin tanınması ve indirgenmesi işlemi anlamına gelir. Seçici otofajinin üç formu vardır: mayaya özgü sitoplazmadan vaküole otofaji (Cvt), seçici makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA) [109].

Selektif makrootofaji, otofajide yaygın olarak bilinen bir selektivite formudur [110]. LC3 ile etkileşime giren bölgeleri içeren bağlanma reseptörleri veya bağdaştırıcıları vasıtasıyla belirli yükleri otofagozoma yöneltme, tanıma mekanizması tarafından düzenlenir [111].

Selektif makrofatofaji, patojenlerin yıkılması, lipidlerin yıkımı ve protein agregatlarının yıkımı gibi spesifik yüklerinin doğasına bağlı olarak birkaç tipte sınıflandırılabilir. Buna ek olarak, organellere özgü makroatofaji, endoplazmik retikulum otofajisi, peroksizomların otofajik yıkımı ve otofajinin mitokondri yıkımı olarak sınıflandırılabilir [112]. Seçici otofaji birçok hastalıkta ortaya çıkar. Örneğin agrefaji, Alzheimer ve Parkinson da dâhil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklara bağlı patojenik protein agregatlarının temizlenmesi için kritik bir role sahiptir [113]. Patojenleri degredasyonu (Xenophagy) doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile ilişkilidir ve akciğer hastalıkları ile ilişkilendirilir [114].

Mitofaji, mitokondriyal kalite kontrol aracıdır ve Parkinson ile ilişkilendirilmiştir [115]. CMA, Hsc70 ve CMA fonksiyon bozukluğu olan hedef proteinler üzerindeki spesifik bir motifin tanınması ile ciddi hastalıkların, özellikle de nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin patogenezinde kilit rol oynar [116].



Şekil 1.2: Otofaji ve selektif otofajinin sınıflandırılması [117].

1.1.2.3.3 Otofajiyi Düzenleyen Sinyal Yolları

Otofaji, hücre içi organellerin ve proteinlerin bütünlüğünün korunmasında temizlik görevini üstlendiği düşünülen çoğu hücre tipinde bazal seviyelerde aktiftir [118]. Bununla birlikte, otofaji, genellikle açlık durumunda uyarılır. Hücrelerin ve organizmaların, besinler tekrar mevcut oluncaya kadar hayatta kalmayı teşvik eden besin yoksunluğuna adaptif tepkisinin kilit bir bileşenidir.

TOR kinaz besinlerin algılanmasında ve hücre büyümesinin ve otofajinin düzenlenmesinde önemli bir oynar. Bununla birlikte büyüme faktörü reseptörü sinyalinin, hipoksinin, ATP seviyelerinin ve insülin sinyalinin altında bir sinyal kontrol noktası olma görevini de üstlenir.

TOR kinazı, Akt kinazının, PI3-kinazın ve büyüme faktörü reseptörünün downstreaminde aktive edilir, besinler mevcut olduğunda sinyal verir ve ribozomal protein ekspresyonunun indüksiyonu ve artan protein translasyonu yoluyla büyümeyi teşvik etmek üzere hareket eder. Daha da önemlisi, TOR, bu gibi büyümeyi teşvik edici koşullar altında otofajiyi inhibe eder ve bunun maya ve Drosophila'daki Atg1 kinaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkilerine aracılık ettiği bilinirken, memeli hücrelerinde nasıl gerçekleştirildiği henüz açık değildir. TOR kinazı, hipoksi dahil olmak üzere besin yoksunluğunu algılayan sinyallerle represe edilir [119]. TOR'un upstream bölgesinde, düşük ATP seviyelerine karşılık olarak adenosin 5′-monofosfat (AMP) ile aktifleştirilmiş protein kinazın (AMPK) aktivasyonu, mTOR aktivitesi için gerekli olan küçük bir GTaz olan Rheb üzerindeki Tsc1 / Tsc2 tümör baskılayıcı proteinlerinin inhibe edici aktivitesini arttırır [120]. Büyüme faktörü reseptör aktivitesine cevaben azalmış Akt aktivitesi, Tsc kinazını Tscl ve Tsc2 yoluyla da baskılamakta, TOR ise, rapamisin ile hücrelerin işlenmesiyle yapay olarak inhibe edilebilmektedir [119]. Böylece azalmış TOR aktivitesi; hücrenin değişen büyüme ortamına, artan büyüme ve artan katabolizma yoluyla uyum sağladığından emin olarak, otofajiye neden olur. TOR, Akt gibi onkogenlerin downstreaminde rapamisin kullanımı, kanser tedavisine yönelik klinik deneylerde test edilmiştir, burada protein translasyonunu bloke ederek ve otofajiyi indükleyerek tümör büyümesini inhibe etme eylemi olduğu varsayılmıştır [121].

Bununla birlikte TOR; TORC1 ve TORC2 olarak bilinen iki farklı kompleksin katalitik bileşeni olarak işlev görebilir ve rapamisin, hem TORC1 hem de TORC2'yi hedef alan "rapalog" denen TORC1'e karşı daha fazla inhibe edici aktiviteye sahip olarak görünmektedir [122]. Hipoksi ayrıca, hem hipoksi indüklenebilir faktörün indüklediği hedef genlere bağlı olan hem de AMPK, REDD1 ve Tsc1 / Tsc2'nin aşağısındaki TOR inhibisyonu ile aracılık edilen HIF'in bağımsız etkileri yoluyla otofajiyi aktive eder [120, 123, 124]. Hipoksinin katlanmış protein yanıtı üzerinden ER stresini indüklediği ve mitokondrinin hipoksi altında oksidatif fosforilasyonda azalmış işlevi olduğu göz önüne alındığında, otofajinin indüklenmesi, hücrenin sıkıştırılmış ER bölümlerini ortadan kaldırmasına ve oksijenin olmadığı zamanlarda solunum zincirinden serbest elektronları almasına izin vererek mitokondriyal kütleyi azaltabilir.

Hipoksiye verilen bu adaptif cevap, ER'de gereksiz ATP tüketimini önler ve mitokondride reaktif oksijen türlerinin üretimini sınırlar. Artan otofaji, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretiminin sınırlı olduğu bir zamanda hücrenin katabolizmadan ATP üretmesini de sağlar.

Otofajideki spesifik HIF hedefleri, hücre ölümü düzenleyicilerinin Bcl-2 üst ailesinin kanonik olmayan üyeleri olan BNIP3 ve BNIP3L'yi içerir [125, 126].

Hücre ölümüyle bağlantılı olmasına rağmen, bu proteinlerin normal fonksiyonu mitofajide görünmektedir [125, 126]. BNIP3L-NIX, olgunlaşan retikülositlerden mitokondriyal klirenste fizyolojik bir rol oynar [127, 128], BNIP3 ise oksidatif strese yanıt olarak kalp ve iskelet kası üzerinde benzer bir role sahiptir [129, 130].

BNIP3 / BNIP3L'nin, Bcl-2 ile etkileşiminin kesilmesi yoluyla Beclin-1'in derepresyonunda BNIP3'ün rolünü de içeren mitofajide nasıl çalıştığını açıklamak için çeşitli modeller önerilmiştir [131]. Bununla birlikte, BNIP3L'nin, LC3 ile ilişkili molekül GABARAP [γ-aminobutyric type A ($GABA_A$)-receptor associated protein] ile etkileşime girerek mitokondriyal klirensi arttırmada daha doğrudan bir rolü olduğu da gösterilmiştir [132, 133].

Otofajinin hücre döngüsü durmasını tetiklediği bilinmektedir ve bunun büyük ölçüde TOR aktivitesinin besin yoksunluğuna bağlı inhibisyonu ve siklin D1 gibi anahtar hücre döngüsü genlerinin translasyonu üzerindeki aşağı yönde etkileri tarafından ortaya çıkabileceği görülmüştür.

Bu, otofajinin tümörün ilerlemesinde nasıl ve hangi aşamada etkili olduğunu anlamak için önem verdiği dikkate alındığında, büyük ilgi çekecek bir araştırma alanıdır [134].

1.1.3 Buğday Çimi

Buğday tohumu temel gıda olarak dünya çapında ekimi fazlaca yapılan tek yıllık otsu bir bitkidir [135-137]. Birçok buğday türü *Triticum* cinsini oluşturmaktadır.

En yaygın yetiştirilen *T. aestivum*'dur. Buğday yetiştiriciliği arkeolojik kazılar göz önünde bulundurulduğunda M.Ö 9600'lere kadar dayanmaktadır. Buğday çekirdeği karyopsis meyve olarak adlandırılan kuru meyve türüne girmektedir. Buğday tüm gıda mahsulleri içerisinde tarlada en fazla yetiştirilendir (220,4 milyon hektar, 2014 FAOSTAT). Buğdayda dünya ticareti diğer ürünlere göre çok fazladır [138]. 2016 yılında dünya buğday üretimi 749 milyon tondu ve mısırdan sonra en fazla üretilen tahıl haline geldi. Buğday üretimi 1960'dan bu yana 3 kat arttı ve 21.yy ortalarına doğru artması da beklenmektedir [139-141].

Buğday önemli bir karbonhidrat kaynağıdır [142]. Küresel olarak, insan gıdalarında önde gelen bitkisel protein kaynağıdır. Protein içeriği yaklaşık %13 olup diğer tahıllara göre fazladır. Fakat esansiyel aminoasitlerin sağlanması için protein kalitesi açısından nispeten düşüktür [143]. Günümüzde genelde buğdayın mutant formaları kullanılmaktadır. Bunun yapılmasındaki temel amaç buğdayın tekrar tekrar hızlı hasat verebilmesidir. Yerli buğdayda tahıllar daha büyüktür ve tohumlar daha kalın ve serttir. Mutant formlar daha kırılgan ve ezilmesi daha kolay olduğu için çiftçiler tarafından tercih edilmektedir. Buğdayı bir besin kaynağı olarak geliştiren özellikler aynı zamanda bitkinin doğal tohum dağılım mekanizmalarının da içerdiğinden oldukça evcilleşmiş mutant buğday türleri vahşi doğada hayatta kalamamaktadır [144].

Buğdayda yapraklar sürgün apikal meristemden, teleskobik bir biçimde üreme çiçeklenmesine geçene kadar ortaya çıkar [145]. Bir buğday bitkisi tarafından üretilen son yaprak, bayrak yaprağı olarak bilinir. Gelişmekte olan bu yaprak karbonhidrat sağlamak için daha yoğundur ve diğer yapraklara oranla daha yüksek fotosentetik hıza sahiptir.

Ilıman ülkelerde bayrak yaprağı bitkideki ikinci ve üçüncü en yüksek yaprak ile birlikte, tahıldaki karbonhidratın büyük kısmını sağlar ve büyümenin tamamlanması için çok önemlidir [146, 147].

Buğday yaprağının üst tarafında alt tarafa göre daha fazla stomaya sahip olan alışılmadık duruma sahip olan bir bitkidir [148]. Bu durumun sebebinin herhangi bir bitkiden daha uzun süre evcilleştirilip ekilmesiyle ilişkili olabileceği teorize edilmiştir [149]. Kışlık buğday, genel olarak sürgün başına 15 yaprak ve 9'a kadar buğday üretir [150]. Buğday kökleri ekilebilir mahsullerin en derine inenleri arasındadır ve bu derinlik 2 metreyi bulabilmektedir [151]. Buğday genetiği diğer türlerin çoğundan daha karmaşıktır. Bazı buğday türleri iki küme kromozomlu diploiddir, ancak birçoğu dört küme kromozomlu (tetraploid) veya altı (hekzaploid) ile stabil poliploittir [152]. Buğday genlerinin belirli varyasyonlarının varlığı, mahsul verimi için önemli olmuştur. Evcilleştirme sırasında antik dönemde seçilen genlerin mutant versiyonlarının yanı sıra, büyüme özelliklerini etkileyen kasıtlı bir allel seçimine de gidilmiştir.

İlk olarak japon buğday yetiştiricileri (Norman Borlaug Nr) tarafından kısa saplı buğday üretmek için kullanılan cüce özelliğine sahip genler, dünya genelinde buğday verimi üzerine önemli etkiye sahipti ve Meksika ve Asya'daki Yeşil Devrim'in başarısında önemli bir etken oldu. Dwarfin genleri, fotosentez sırasında tutulan karbonun tohum üretimine yönelimini sağlar ve aynı zamanda konaklama sorunun ortadan kalkmasında rol oynamaktadır. Buğdaylar ağır azotlu gübreleme sonucu fazla uzar bu uzama sonunda rüzgârın etkisiyle başak kısmı düşer ve çürür. Fakat 1997 yıllara gelindiğinde gelişmekte olan dünya tarafından %81 oranında kullanılmaya başlanan yarı cüce buğdaylar ile hem verim artışı hem de azotlu gübreden daha iyi verim alınmasıyla bu sorun büyük oranda azaltıldı. *Triticum* cinsi bu cinse ait yabani otlar ile çavdar benzeri otlar 1930'lardan beri ekili buğday yetiştiriciliği için pek çok hastalığa direnç özelliği kaynağı olmuştur [153]. Heteroz ve hibrit canlılık (mısırın bilinen F1hibritlerinde olduğu gibi), yaygın olarak (hekzaploid) buğdaylarda ortaya çıkar, ancak buğday çiçekleri mükemmel olduğu için ticari ölçekte (mısırda olduğu gibi) hibrit çeşitlerin tohumunu üretmek zordur ve normalde kendi kendine tozlaşır. Ticari hibrit buğday tohumları, kimyasal hibritleme ajanları kullanılarak üretilmiştir, bu kimyasallar selektif olarak polen gelişimine veya doğal olarak oluşan sitoplazmik erkek kısırlık sistemlerine müdahale eder.

Hibrit buğday, Avrupa (özellikle Fransa), Amerika Birleşik Devletleri ve Güney Afrika'da sınırlı bir ticari başarı olmuştur.

2010 yılında BBSRC (Biyoteknoloji ve Biyolojik Bilimler Araştırma Kurulu, Biotechnology and Biological Sciences Research Council) tarafından finansa edilen bir Birleşik Krallık bilim insanlarından oluşan bir ekip, ilk defa buğday genomunu deşifre ettiklerini açıkladı [154]. 29 Kasım 2012'de, esasen eksiksiz bir gen seti yayınlandı (*Triticum aestivum için*) [155]. Total DNA ve cDNA'ların rastgele atış tekniği ile *T. aestivum chinese spring* için (CS42) Rosche 454 dizileme cihazı kullanılmıştır. Cihazın GS FLX Titanium ve GS FLX+ platformunda 85gb'lık (genomun 5 katı kadar) sekansı bulunan (200 okuma), ve genomun yaklaşık 94.000 96.000 arası geni tanımladığı belirlenmiştir [156]. Bu sekans verileri, diğer tahıllardan ortolog gen setlerine dayanarak, yaklaşık 96.000 gene doğrudan erişim sağlar ve sistematik bir biyoloji anlayışı ve tahıl mahsulünü değerli özellikleriyle tasarlama yolunda atılmış önemli bir adımdır.

Tahıl genetiği ve ıslahındaki etkileri genom varyasyonunun incelenmesini, doğal popülasyonları kullanarak birleşme haritasının oluşturulmasını, transkriptomalarda ekspresyon ve nükleotid polimorfizmini incelemeyi, popülasyon genetiğini ve evrimsel biyolojiyi incelemeyi, ve epigenetik modifiksyonları incelemeyi içerir. Ayrıca, NGS (Yeni nesil dizilime) teknojisi ile üretilen büyük ölçekli genetik belirteçlerin mevcudiyeti, özellik eşleşmesini kolaylaştıracak ve marker destekli ıslah çok daha uygulanabilir hale getirecektir [155]. Üstelik elde edilen veriler sadece heterosis ve epigenetikler gibi karmaşık olayların deşifre edilmesini kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda yetiştiricilerin, hangi atadan elde edildiğini tahmin etmeyi sağlayabilir. Ayrıca araştırmacılar, bu bilgilerden faydalanarak enerji üretimi, metobolizma ve transgenik buğdaydan alınabilecek verim ile büyümeye etki eden genleri sınıflandırıp tespit etmişlerdir [155].

Başlıca ekimi yapılan buğday türleri;

Hexaploid Türler;

T. aestivum (Common Wheat, Ekmeklik Buğday): Dünyada en yaygın şekilde yetiştirilen hexaploid türdür ve verimi yüksektir [156, 157].

T. spelta (Spelt): Sınırlı miktarda yetiştirilen hexaploid türündendir.

Tetraploid Türler;

T. durum (Durum);Günümüzde yaygın alarak kullanılan buğdayın bir tetraploid formu ve ikinci en yaygın ekili buğdaydır.

T. dicoccon (Emmer); Eski zamanlarda yetiştirilen günümüzde yaygın olmayan buğday türlerindendir.

T. turanicum (Khorasan); Eski buğday türlerindendir. Günümüzde Afkanistan ve İran'ın kuzeyindeki tarihi bölgeyi ifade etmektedir. Modern buğdayın iki katı büyüklüğünde ve zengin fındık aromasıyla tanınmaktadır.

T. monococcum (Einkorn); Vahşi ve evcilleştirilmiş formları mevcuttur. Ayrıca Emmer buğday olarak evcilleştirilmiştir.

Besin değerleri bakımından incelemek gerekirse 100 g da 327 kilokalori sağlar; bunun yanı sıra fosfor, manganaz, niasin gibi temel besin maddelerini içerirken aynı zamanda da iyi bir lif ve protein kaynağıdır. Buğday % 13 su, % 71 karbonhidrat ve %13 protein içeriği çoğunlukla glütendir. (buğdaydaki proteinin % 75-80'i) [158].

Buğday gelişmekte olan ülkelerde kullanımı yoğun şekilde artmaktadır. Buna bağlı buğday çimeninin önemi de her geçen gün tartışmalara yol açmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar tahıl kökenli beslenmenin birçok hastalığa (kanseri diyabet, kardiyovasküler hastalıklar) karşı koruyucu olduğu bulunmuştur [159, 160].

Buğday özellikle ilk çimlenme evresinde 6-10 günlük geçen süreçte dışardan gelebilecek her türlü tehdite karşı; yeni oluşan ve oluşmakta olan hücreleri koruma amacıyla maksimum antioksidan aktivite durumuna geçer. Bunu primer sekonder metobolit ve mineralleri çok sayıda salgılayarak elde eder [161]. Ayrıca buğday çimi büyüme aşamasında A,C,E,B vitaminlerini, farmokolojik etkilerden sorumlu olan SOD (süper oksit dismutaz) 'ı, bor, molibden, selenyum krom, çinko, demir, gibi mineralleri içinde bulundurur [5]. Buğday çimi kullanılarak yapılan çalışmalar birçok hastalığa karşı buğday çimi suyunun farklı farklı etkiler gösterdiğinin kanıtı niteliğindedir. Bunlar içinde anti-ülser [162], talasemide kan yapıcı [163], anti kanser [164], anti-artrit [165] , anti oksidan [161] gibi aktiviteler görülmüştür.

Buğday çimi suyunun bilinen özelliklerinden biriside yüksek oranda klorofil içermesidir. İçeriğindeki klorofilin karsinojenlerin aktivasyonunu inhibe ettiği ve bu nedenle önemli olduğu araştırmalar neticesinde bilinmektedir [164, 166-168]. Klorofilin yeşil kan olarak da ifadesi birçok literatürde geçmektedir. Bunun başlıca nedenleri içinde en önemli etken insandaki hemoglabine anatomik olarak benzemesidir. Buğday çimi ekstratı bu nedenle hemolatik anemi, talasemi gibi vakalarda içerdiği Fe, Mg ve klorofil ile bu açığı kapatabilirliği tespit edilmiştir [163, 166, 169].

Çeşitli metobolik olaylar sonucunda ROS (reaktif oksijen türleri) canlı organizmalarda yan ürün olarak oluşmaktadır. ROS' nın yüksek konsantrasyonları moleküler düzeyde ele alınacak olursa oksidatif yıkıma yol açtığı bilinmektedir. Az konsantrasyonun da hücre faaliyetlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Yol açtığı oksidatif hasarla kanser arasında bağlantı olduğu kanser oluşumuna ön ayak olduğu bilinmektedir. Buğday çimi ekstraktı içerdiği fenolik bileşikler ile antioksidan aktivite özelliklerinden dolayı ROS' un bu aşırı konsantrasyon artışına bağlı etkisini azaltıp kanser oluşumunu engellemede katkısı olduğu bilinmektedir [170, 171].

Falcioni ve ark. yaptıkları in vitro çalışmalar ile buğday çiminin DNA hasarını önlemede aktif rol oynadığını; bununda süperoksit dismutaz (SOD) ve sitokrom oksidaz gibi ROS'u bir oksijen ve hidrojen peroksit moleküllerine dönüştürülebilen antioksidan enzimlerden dolayı olduğunu göstermişlerdir [172].

Shram R. ve arkadaşlarının rastgele seçilen 30 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada 30 gün boyunca buğday çim tozu takviyesi yapılan kişilerde kan örnek analizlerinde yapılan sonuçlarda SOD enzim aktivitesinin ve plazmadaki antioksidan aktivitenin yükseldiğini görmüşler ve MDA' yı azaltarak yani hücresel lipid peroksidasyonun koruma sağladığı ve oksidatif srtesin önlenmesinde yer aldığını gözlemlemişlerdir [173].

Çalışmamız kapsamında dünya çapında ekimi en fazla yapılan tek yıllık otsu bir bitkidir olan buğdayın çimi kullanılmıştır. Buğday çiminin anti ülser, anti artrit, anti oksidant ile anti kanser aktiviteleri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen bu konuda literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Bu nedenle bu yüksek lisans tezi ile buğday çiminin anti kanser özellikleri hakkında daha detaylı araştırma yapmak amaçlanmıştır. Sırasıyla;

a) Buğday tohumları elde edilerek uygun koşullarda tohumların çimlendirilmesi,

b) Elde edilen buğday çimlerinden su ekstraktının oluşturulması,

c) Elde edilen buğday çimi su ekstraktın pankreas kanser hücre hattı Panc1, prostat kanser hücre hattı PC3 ve hepatoma hücre hattı Hep3B ile insan endotel hücre hattı HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi,

d) En yüksek sitotoksik etki gözlenen PC3 hücre hatlarında buğday çimi su ekstraktının bazı apoptotik ve otofajik genlere etkisinin mRNA ve protein seviyesinde belirlenmesi,

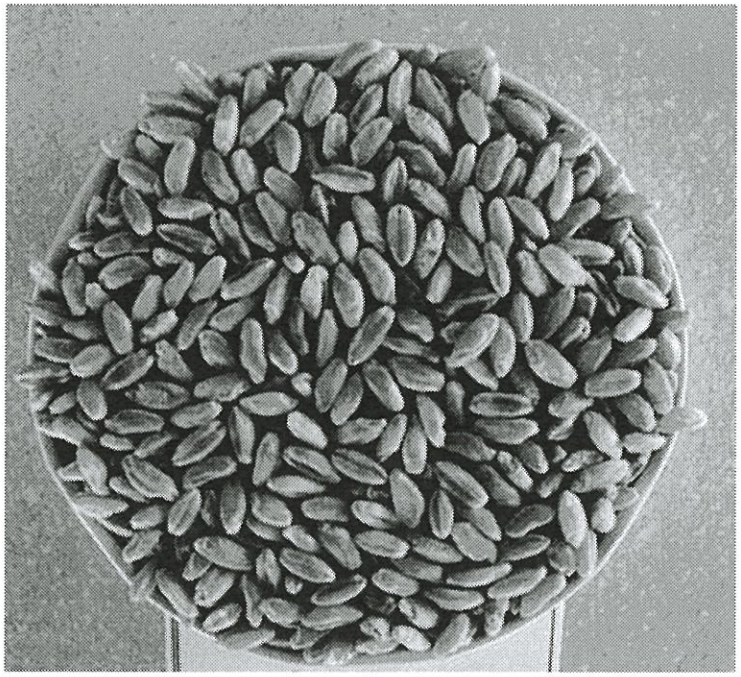
Basamakları gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Bu bölümde çalışma boyunca kullanılan materyal ve izlenen metot detaylı bir şekilde açıklanıp tablo ve şekillerle anlatılmıştır.

2.1.1 Buğday Tohumları



Şekil 2.1: Karakılçık buğdayı

Çalışmada kullanılan buğday soyu Seferihisar Belediyesi'nin uzun uğraşları sonucunda yaygınlaştırılmış olan karakılçık buğdayıdır. Ege Bölgesi'nde yetişmekte olan ve karakılçık buğdayı tanesi; kahveye yakın renkli, sert, iri taneli ve ovaldir. En sert buğday türleri arasında olan karakılçık demir, fosfor, A, E, K, C açısından da oldukça zengindir. Diğer buğday türlerine göre 50 kat daha besleyici olduğu savunulan karakılçık buğdayı 2n=28 yapısında olup genetiği bozulmamış nadir doğal buğday türleri arasında bulunmaktadır.

2.1.2 Çalışmada kullanılan Laboratuvar Araçlar ve Kimyasalları

Çalışmada kullanılan laboratuvar araç ve gereçleri, deney boyunca kullanılan kimyasallar listelenip marka modeline göre gruplandırılıp Tablo 2.1 ve Tablo 2.2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazlar

KULLANILAN CİHAZLAR	MODEL
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
CO_2 'li inkübatör	Nuair
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Görüntüleme Cihazı	Fusion FX VILBER LOURMAT
Hassas Terazi	Sartorius
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	Bio-Tek
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Otomatik pipetler	Finnpipette
Otoklav	Hırayama, Japonya
pH Metre	WTW, Almanya
PZR	BioLab
RNA elektroforezi	Thermo

Tablo 2.1: (devamı):

+4°C Soğutmalı Makro santrifüj (Falkon)	Sigma
Santrifüj (Ependorf)	Mikro 120 Hettich
Santrifüj (Falkon)	Nüve NF815
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
-80°C dondurucu	Thermo
UV Visible spektrofotometre	Thermo
Vorteks	Elektromag, Türkiye
qRT PZR	Roche
Qubit	Invitrogen
Havan	-
Inkubator	WTB, German, Nüve
Manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica
Jel görüntüleme sistemi	Bioimagining Systems

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan kimyasal listesi

Malzeme İsmi	**Firması**
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (DMEM)	Sigma
Fetal Sığır Serumu (FCS)	Sigma
Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck

Tablo 2.2 (devamı):

L-glutamin, Tripsin-EDTA	Sigma
GeneJET™ RNA Purification Kit	Thermo Scientific
3-(N-morpholino) propansülfonik asit (MOPS)	Merck
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Sigma
Formaldehit, β-Merkaptoetanol	Sigma
Reverse Transkriptaz	Thermo Scientific
Tetrametiletilendiamid (TEMED)	Sigma
Tris, Borik Asit, EDTA	Sigma
PVDF Membran	Millipore
Amonyum persülfat	Merck
β-Aktin Antikoru	Sigma, Abcam
Sekonder antikor	Santa Cruz
Proteaz inhibitör tabletleri	Roche
X-Ray Film	Kodak
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
Akrilamid-Bisakrilamid	Merck
Ampicilin	Sigma
Agaroz	Prona
Page Ruler Prest	Thermo
Beta-merkaptoetanol	Merck
$C_2H_3NaO_2$ (Sodyum Asetat)	Sigma

Tablo 2.2 (devamı):

$CaCl_2$ (Kalsiyum klorür)	Borasan Kimya
DEPC	AppliChem
DMSO (Dimetil sulfoksit)	Merck
Etidyum Bromür	Sigma
Etanol	Sigma
Formaldehit	Sigma
LB-Agar	Sigma
MTT	Clontech
$MgCl_2$ (Magnezyum klorür)	Fermantas
Metanol	Sigma-Aldrich
$NaCl_2$ (Sodyum klorür)	Sigma
Süt tozu	Santa Cruz
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma-Aldrich
Tripsin	Sigma
Tris Base	Sigma
Tween 20	Sigma-Aldrich
TEMED (Tetra metil etilan diamin)	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
β-aktin Antikor	Sigma
Distile su	Galenik

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan solüsyonlar Tablo 2.3 Tablo 2.4 ve Tablo 2.5 te çalışmada kullanılan solüsyonlar verilmiştir.

Tablo 2.3: RIPA tamponu bileşenleri

%0,1 Sodyum deoksiselat
%0,1 SDS
140 mM NaCl
10 mM TrisCl (pH:8)
%1 Triton X100
1 mM EDTA
1 mM EGTA
Proteaz İnhibitörü

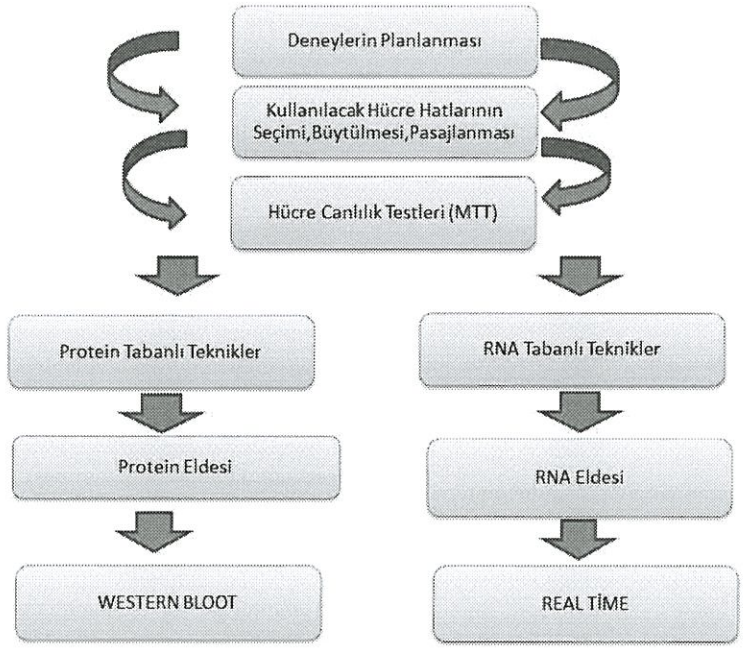
Tablo 2.4: SDS PAGE jel bileşenleri

%10 Ayırma Jeli	**%5 Yığma Jeli**
ddH2O 5 mL	ddH2O 6,25 mL
%10 (w/v)APS 100 µL	%10 (w/v)APS 50µL
TEMED 10 µL	TEMED 5 µL
Akrilamid: Bisakrilamid (37:5:1) 2.5 mL	Akrilamit: Bisakrilamid (37:5:1) 1.25 mL
Lower Buffer 2.5 mL	Upper Buffer 2.5 mL

Tablo 2.5: 1 X FA jel elektroforezi tank tamponu.

10 X FA Tamponu	**Stok Sol.**	**Son Konsantrasyon (10 X)**
MOPS (pH:7)	1 M	0,2 M
EDTA (pH:8)	0,5 M	0,05 M
NaAc	1 M	0,01 M
Tampon DEPC ile hazırlandı. (pH: 7,0). Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklavlanıp steril edilerek kullanıldı.		

2.2 Metot



Şekil 2.2: İzlenecek metot tasarımı

2.2.1 Buğday Çimi Yetiştirilmesi

Buğday tohumları bir kaba alınmak kaydıyla saf suyla birkaç kez yıkandı. Yıkama sonrası temizlenen tohumlar içme suyu içerisinde 10 saat bekletildi. Daha sonrasında kapaklı bir kaba alınan tohumlar nemli kalacak şekilde belli sürelerle ıslatılarak 2 gün daha bekletildi. Bu süreç sonunda çimlenmiş ekilmeye hazır buğday taneleri elde edildi.

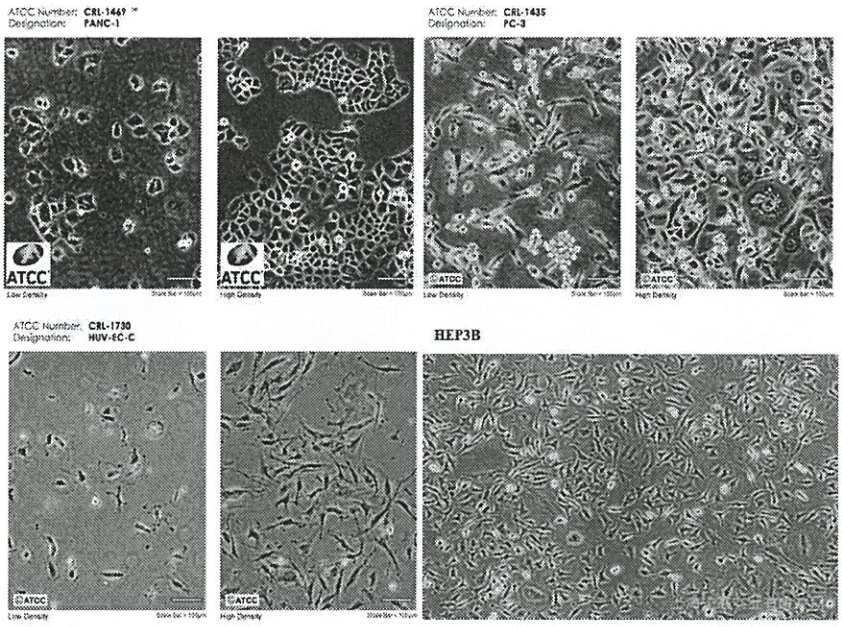
Elde edilen filizlenmiş taneler içinde toprak bulunan genişçe bir kap içerisine üst üste gelemeyecek eşit bir şekilde kaba yayılarak dağıtıldı. Sonrasında üstleri ince toprak tabakasıyla örtülüp nemli kalacak şekilde ıslatıldı. Birkaç gün sonra filiz veren çimler iki hafta sonra yeterli boyuta gelince steril bir makas yoluyla kesildi ve 30 g olacak şekilde hassas terazide ölçülerek saf suyla yıkanıp -80 °C muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

2.2.1.1 Buğday Çim Ektraktı Eldesi

Ekstrakt hazırlamak için -80 °C den çıkarılan 30 g çim 100 mL distile su ile önceden otoklavlanmış havanda bek alevi karşısında ezildi [6]. Ezilen çim suyu ekstraktı 50 mL lik falkonlarda birleştirilip 20.000 rpm +4 °C 20 dk santrifüj edildi. Daha sonrasında santrifujdan çıkan falkonlardaki üst sıvı dikkatlice alınıp steril bir kapta birleştirilip steril kabin içesinde 0,22'lik filtreden geçirilip steril hale getirilip kullanılmak üzere -20 °C buzlukta stoklandı [6].

2.2.2 Hücre Kültürü

Çalışmamızda Panc1, Hep3B, PC3 ve HUVEC hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler -80 °C derin dondurucuda daha önce stoklanan soylardan kullanıldı. Besi ortamı DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) + FCS (% 10) karışımına 500 µL antibiyotik katılmasıyla hazırlandı. 50 mL lik falkon tüplere hazırlanan besi ortamı +4 °C de saklanmak üzere kaldırıldı.



Şekil 2.3: Kullanılan hücre tipleri

2.2.3 Hücrelerin Açılması

-80 °C den çıkarılan hücreler su banyosunda 37 °C de hızlıca çözüldükten sonra çözünen hücreler % 10 luk FCS'li medyuma alınıp karıştırıldı. Sonrasında 5 dakika 1000 rpm olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifujden alınan falkonun içerisindeki supernatant uzaklaştırıldı. Falkon içerisinde geriye kalan pellet medyum ile çözüldükten sonra hücre ekim kabına (flask) eklenerek iç ortam dengesi % 5 CO_2 içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre konulmuştur.

2.2.4 Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler 75 cm^2 lik flasklarda son hacim 15 mL olacak şekilde, içerisinde 0.2mM L-Glutamine ve % 10 FCS bulunduran DMEM içinde haftada 2 pasaj yapılacak şekilde büyütüldü.

2.2.5 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler yüzey alanını belli düzeyde kapladıktan sonra (% 90) flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler steril PBS ile bir iki kez yıkandı. Yıkamayı sonrası PBS uzaklaştırıldı ve 3 mL Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon işlemi ile hücrelerin kalkması için gerekli sürenin geçmesi için inkübatörde birkaç dakika bekletildi. Kalkan hücreler 6 mL DMEM ile karıştırılarak 15 mL'lik falkon içerisinde 5 dk 1000rpm de santrifüj edildi ve hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet medyum ile çözülüp hücre yoğunluğuna göre flasklara bölüştürüldü ve inkübatöre yerleştirildi (% 5 CO_2, 37 °C).

2.2.6 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı

Toplam hücre medyum karışımındaki mililitredeki hücre sayısının hesaplanması için Thoma Lamı kullanıldı. (25 küçük kareden 1 mm^2 alana ve 0.1 mm derinliğe sahip).

10 mL hazırlanan hücre medya karışımından homojen olacak şekilde alınan 10 µL hücre medya karışımı 10 µL tripan mavisi ile homojen şekilde ependorf içinde karıştırılır. Karışımdan 10 µL Thoma Lamına konulup sayım işlemi yapılır. Ölü hücreler boyanacağından sayıma katılmadı.

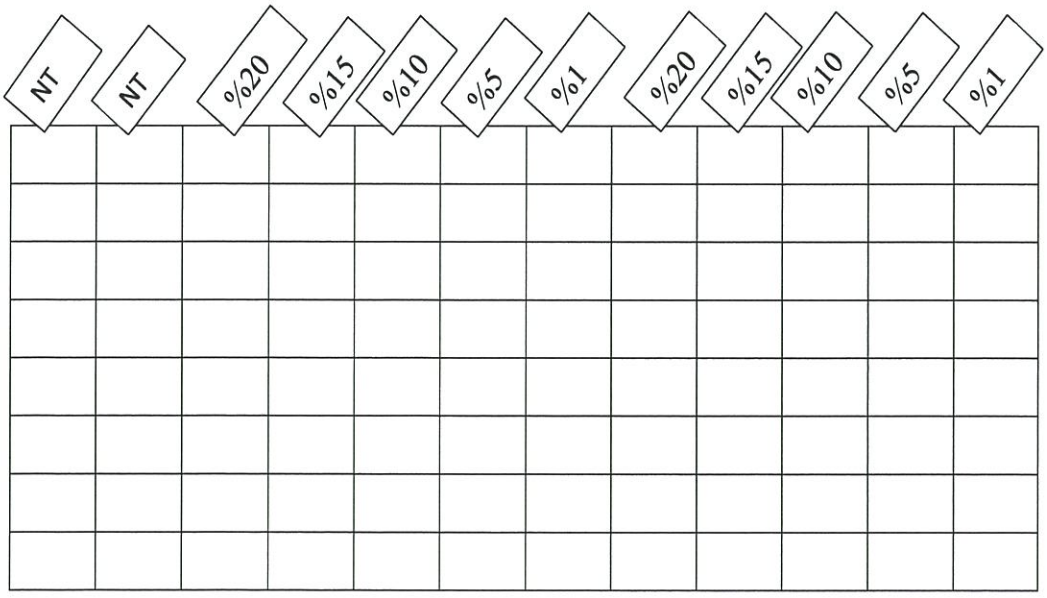
2.2.7 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler doluluk oranına ulaştıktan sonra içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA ile yapılan tripsinizasyon işlemi sonrasında 1000 rpm ile 5 dk santrifuj edilip çöktürülerek supernatant pelletten uzaklaştırıldı. Hücre pelleti %10 DMSO içeren FCS ile çözülüp hücre pelleti saklamak için üretilmiş Cryovial ismi verilen tüplere konularak -80 °C lik dolapta saklanmak üzere kaldırıldı.

2.2.8 MTT Hücre Canlılık Testi

MTT testi kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin miktarının saptanmasını sağlar. Tetrazolium tuzunun canlı hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesi sonucu spektrometrede ölçümü ile belirlenen canlılık ve sitotoksitite testidir. Hücre hatlarında sitotoksik etkilerin belirenebilmesi amacıyla Panc-1, PC3, Hep3B ve HUVEC hüre hatlarıyla çalışmaya başlandı. Flask içerisinde büyütülen hücreler 96'lık wellere her kuyuda 30.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. 24 saat boyunca hücrelerin yüzeye tutunması için beklendi. Bu aşamadan bir sonraki gün ise hücreler yüzeye tutunmuş ise her kuyuya belirlenen oranlarda madde uygulandı (%20-%15-%10-%5-%1). Uygulanan maddeler belirlenen saatlere göre (24, 48, 72) MTT solüsyon uygulamasına başlandı. (Son konsantrasyon 0,5 mg/mL) 4saat sonunda oluşan kristallenme sonucu plakadaki (well) sıvılar uzaklaştırılıp son konsantrasyonu 0,004 M HCI içeren isopropanol ile 200 µL ye tamamlanır kristal yapının çözünmesi sağlanır ve spektrofotometride 550 nm de ölçüm alınır. Yapılam MTT testleri sonunda en fazla etki görülen hücre hattı PC3 grubu olduğu için deneylerimize PC3 ve HUVEC hücre hattıyla devam ederek protein ve RNA seviyesinde araştırmalarına devam edildi.

Tablo 2.6: MTT canlılık testi plaka düzeni



2.2.9 RNA ve Protein Seviyesinde Apoptotik ve Otofajik Etkilerin Belirlenmesi Amacıyla Hücrelerin Eldesi

Çalışmada kullanılan hücre pelletlerinin eldesi için 25 cm^2 flasklara $2x10^6$ hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Hazırlanan flasklara sırasıyla, % 30 su içeren % 10 luk FCS DMEM karışımı, diğer bir flaska % 30 çim ekstraktı içeren % 10 luk FCS DMEM karışımı son flaskta kontrol grubu olarak sadece % 10 luk FCS DMEM karışımı konularak deney grupları oluşturuldu. Oluşturulan gruplar madde eklenmesi yapıldıktan sonra 24 ve 48 saat aralıkları olacak şekilde deney grupları kuruldu. Belirlenen saatlerde pelletleri alınan deney grupları -80 °C dondurucuya da saklanmak üzere kaldırıldı.

2.2.10 RNA İzolasyonu

Daha önce pellet halinde -80 °C dondurucuda kaldırılmış örnekler buz üzerinde direk ısıya maruz kalmayacak şekilde dikkatlice çözüldü. RNA izolasyonları kitin protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı (Gene JET RNA purification Kit). Örnekler bir sonraki aşamaya kadar saklanmak üzere -80 °C de olan dondurucuya kaldırıldı.

2.2.11 RNA Miktar Tayini

Mikrodropta ölçüm alındıktan sonra RNA miktarları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı;

$$Absorbans_{260} = (Örnek\text{-}Kör*40*1/0,049) \quad (2.1)$$

2.2.12 RNA Jel Elektroforezi

Elektroforez aparatları ve tankı jel dökümünden önce % 0,5' lik SDS ile güzelce yıkandıktan sonra DEPC içeren su ile muamele edildi. Son olarak etanolden geçirilen tank, kuruması için etüve yerleştirildi.

0,5 g Agaroz tartılarak, 5 mL 10X FA jel tampon ve 45 mL DEPC'li su ile mikrodalgada kaynaması için bir süre bekletildi. Ve sonrasında buharlaşma durana kadar soğuması için 2 dakika da dışarda bekletildi. Buharlaşma durduktan sonra 900 µL formaldehit ve 1 µL etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Donma gerçekleştikten sonra ise kaset 1 X FA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. RNA örnekleri boya ile karıştırılıp 65 °C'de 10 dk ısı ile denatüre edildikten sonra 11-12 dk buzda bekletildi. Sonrasında kuyulara yüklenen örnekler 90 Voltta yürütülmek suretiyle, RNA kalitesi dijital jel görüntüleme sisteminde değerlendirilerek diğer basamaklara geçildi.

2.2.13 Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

RT-PZR iki ayrı basamakta yapıldı. Basamakların ilkinde RT enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. İkinci basamakta ise ilk basamakta elde edilen cDNA ların 1 µL'si kullanılarak spesifik primerler aracılığıyla PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirildi

2.2.14 cDNA Sentezi

Daha önce elde edilmiş olan RNA'ların miktarları mikrodropta ölçüldükten sonra 1 µg olacak şekilde alınması gereken RNA miktarı hesaplandı. 1µL Oligo dT primeri eklemesi de yapılarak 12,5 µL' ye dH_2O eklenerek tamamlandı.

5 dakika 65 °C'de PZR cihazında inkübe edildi. Her örnek için 2 µL dNTP,4 µL Buffer RT, 1 µL Revers Transkriptaz, 0,5 µL Ribolock İnhibitörden oluşan bir karışım hazırlanarak bu karışımlardan her bir tüpe 7,5 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Hazırlanan örnekler 1 saat 42 °C de, 10 dakikada 72 °C de PZR cihazında inkübe edildi.

2.2.15 PCR

1 µL cDNA, 2 mM $MgCl_2$, 10X Taq Buffer, 0.2 mM dNTP 1 µL, Fermentas Taq polimeraz 1 µL, 1 µg ileri ve geri primer 1 µL, ve 36.5 µL dH_2O da eklenerek son hacim 50 µL olucak şekilde oluşturuldu.

Tablo 2.7: Hβ2 primerleri için PCR koşulları

1	94 °C	2 dakika	1 döngü
2	94 °C	60 saniye	35 döngü
	60 °C	30 saniye	
	72 °C	45 saniye	
3	72 °C	5 dakika	1 döngü

2.2.16 Agaroz Jel Elektroforezi

% 0,8' lik jel hazırlanabilmesi için 0,5 X TBE ve LB Agar erlene konularak mikrodalga fırında kaynatıldı. Kaynama sonrası mikrodalga fırından alınan erlen soğutulmak üzere bir süre bekletildi. Soğuyan jel kasete dökülmeden önce içerisine 0,5 µg/ml etidyum bromür eklendi. Taraklar kasete yerleştirildikten sonra jel döküldü ve donması için bir süre bekletildi. Donma sonrası taraklar çıkarıldı ve 20 µL örnekten 4 µL de örneklerin kuyulara inmesini sağlamak için 6 X Loading Dyne konuldu. DNA elektroforez tankı 0,5 X TBE ile doldurularak 90 V da 40 dk yürütüldükten sonra UV ışığı altında görüntülendi.

2.2.17 Real Time PCR

Mix karışımları tablo 2.8 de verilen miktarlarda hesaplanıp kuyu sayısı kadar oranlandıktan sonra 3 tekrarlı olacak şekilde Light Cycler 480 SYBR Green I Master kiti kullanılarak 96'lı kuyulara paylaştırıldı. Paylaştırma sırasında kuyucuklarda hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.

Hazırlanan plaka Roche Real Time PCR cihazına konuldu ve çıkan 3 tekrarlı CT değerleri ortalaması alınıp kontrol geni olan Human-β- 2 mikroglobülin geninin CT değerleri ile kıyaslanıp değerlendirilmiştir.

$$CtH\text{-}\beta\text{-}2 - Ct_{çalışılan\ gen} = \Delta Ct \quad (2.2)$$

$$\text{Hedef ct değeri} = 2\text{-}\Delta Ct \quad (2.3)$$

Tablo 2.8: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler

Hβ-2 Forward	5' TTTCTGGCCTGGAGGCTATC 3'
Hβ-2 Reverse	5' CATGTCTCGATCCCACTTAACT 3'
Beclin-1 F	5- TGTCACCATCCAGGAACTCA-3
Beclin-1 R	5-CTGTTGGCACTTTCTGTGGA-3
Bax F	5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'
Bax R	5'-TCCTCTGCAGCTCCATGTTA-3'

Tablo 2.9: Real Time PCR bileşenleri.

Cdna	1 µL
MasterMix	5µL
dH_2O	3 µL
F primer(10pmol)	0,5 µL
R primer(10pmol)	0,5 µL

Tablo 2.10: Real Time PCR reaksiyon koşulları.

SICAKLIK	Süre	Döngü
95 °C	10 sn	1
95 °C	10 sn	35
60 °C	10 sn	35
72 °C	10 sn	35
72 °C	5 dk	1
Erime Eğrisi Analizi	-	1

Tablo 2.11: Real Time plak deney düzeni

BECLİN	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
BECLİN	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
BECLİN	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
LC3	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
LC3	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
LC3	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
Hb-2	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3
Hb-2	Konrol 24 h Huvec	Su 24h Huvec	Çim 24h Huvec	Kontrol 48h Huvec	Su 48h Huvec	Çim 48h Huvec	Kontol 24h PC3	Su 24h PC3	Çim 24h PC3	Kontrol 48h PC3	Su 48h PC3	Çim 48h PC3

2.2.18 Protein Tabanlı Teknikler

-80 °C dondurucudan çıkarılan pelletler (% 20'lik BÇE uygulanmış hücre pelletleri) alınarak buz üzerinde çözünmesi sağlandı. Çözünen pelletler üzerine 100 µL RIPA buffer eklenip çözünme sağlandı ve 45 dk buz üzerinde bekletildi. Bu süre içerisinde 3 kez pipetaj yapıldı. 1200 g de +4 °C de santrifüj edildi. Süpernatantı buz içindeki ependorflara alınan örnekler -80 °C dondurucuya kaldırıldı.

2.2.19 Protein Miktar Tayininde Qubit Kullanılması

Her örnek için 199 µL Qubit Reagent Protein Buffer ve 1 µL Reagent boyası eklenerek bir karışım hazırlandı. Bu karışımdan alınan 199 µL ve proteinden alınan 1 µL karıştırılarak 10 sn vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında 13 dk bekletildikten sonra Qubit cihazında ölçüm alındı.

Protein Miktarı= Cihazda çıkan değer × 200(seyreltme katsayısı) (2.4)

2.2.20 SDS PAGE

Kullanılacak malzemeler % 70'lik etanol ve % 90 izopropanol ile temizlendi. İlk olarak Tablo 2.4'de belirtildiği gibi hazırlanan % 10 luk ayırma jeli üstten 3 cm boşluk kalacak şekilde hazırlanmış cam aparata döküldü. Hava kabarcığı oluşması durumunda % 90 lık izopropanol eklenerek giderildi. 35-40 dakika ayırma jelinin polimerizasyonu beklendi. Jelin donduğundan emin olunduktan sonra dökülen izopropanol kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından Tablo 2.4'de belirtildiği gibi hazırlanan yığma jeli döküldü ve kuyu oluşumu için beklenen taraklar oturtuldu. Yığma jeli tamamen polimerleştikten sonra taraklar dikkatlice çıkarılıp oluşan kuyuların sağlamlığı gözlendi. Kuyucuklar içerisindeki jel parçaları ve hava kabarcıkları uzaklaştırılıp hazırlanan jel tanka yerleştirildi.

Konsantrasyonları 50 µg olacak şekilde ayarlandı 5 µL yükleme boyası eklendikten sonra her örnek karışımı upper buffer ile 25 µL ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 95 °C'de 5 dk denatüre edilerek proteinler hazırlandı.

Jelin ilk kuyusuna 5 µL Prestained Page Ruler, diğer kuyulara da protein örnekleri yüklendi. Tank % 0.1 SDS içeren 1X yürütme tamponu ile yeteri kaddar doldurulduktan sonra 120 V yürütme işlemine tabi tutuldu.

2.2.21 Proteinlerin Membrana Tranfer Edilmesi

Proteinlerin elektroforetik transferinde Bio-Rad Trans Blot sistemi temin edilerek kullanıldı. Proteinlerin transfer işlemleri sırasında PVDF adı verilen membranlardan faydalanıldı. Camlar arasından çıkarılan jellerin yığma jeli olan kısmı kesilerek uzaklaştırıldı ve geriye kalan jel soğuk tranfer tamponu içerisine alındı ve oda sıcaklığında 13 dakika inkübe edilmesi için bekletildi. Eşit şekilde kesilen PVDF membranlar ve kurutma kâğıtları bir dakika süreyle metanolde bekletilip aktive edilerek hazırlandı. Bu arada transfer aparatları ve pedler de transfer tamponu içerisine alındı. Daha sonra sandviç modeli hazırlanmaya başlandı. Sırasıyla sünger-kurutma kâğıdı-jel-membran-kurutma kâğıdı-sünger şeklinde bir düzenek hazırlanarak düzenekte hava kabarcığı kalmaması için çok dikkat edildi. Ve son olarak hazırlanan düzenek, transfer tamponu ile dolu olan blotlama tankına oturtularak yerleştirilerek ve akım 15 volt olacak şekilde 12-18 saat (overnight) transfere bırakıldı.

2.2.22 Proteinlerin Belirlenmesi

Transfer işleminden sonra alınan PVDF membranlar 20 mL bloklama çözeltisinde (Bloklama solüsyonu % 0.1 (h/h) Tween 20 içeren 1X TBS, %5 (a/h) yağsız süt tozu) 1 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda muamele edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 3 kez 6 dakika olacak şekilde %0.1 (h/h) Tween20 içeren 1 X TBS ile yıkama gerçekleştirildi. Membranlar yıkama işleminden sonra primer antikorlarla 1 gece +4 °C'de inkübe edildi. 3 defa yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra sekonder antikorlama işlemi yapılarak görüntülenme işlemi yapıldı.

2.2.23 UVP Görüntüleme İşlemi

Antikorlama işlemi biten membranlar Pierce ECL substratlarıyla 1 dakika muamele edilerek (Reagent A ve B) UVP görüntüleme cihazında görüntüleme yapıldı.

2.2.24 Sonuçların Filme Aktarılması

Membranlar Pierce ECL ile muamele edilerek tamamen karanlık olan özel bir odada X-Ray filmine basıldı (1 dakika kadar). Film ışık görmeden sırasıyla 1 er dakika banyo solüsyonu ve 1 er dakika sabitleyici solüsyonlarla (developer ve fixer solüsyonlarında) muamele edilerek görüntünün sabitlenmesi sağlandı.

3. BULGULAR

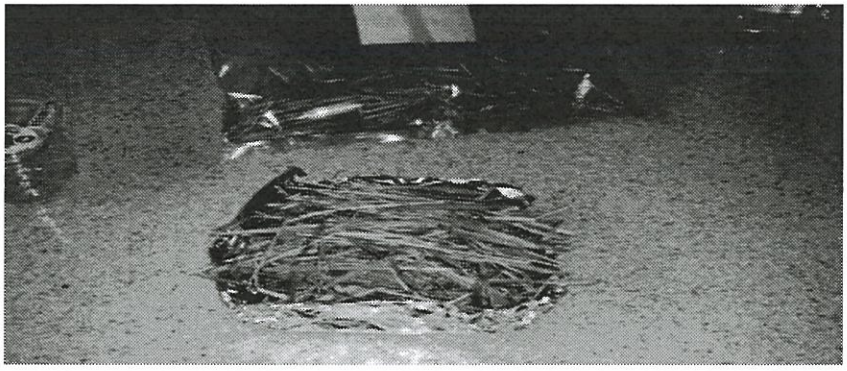
3.1 Buğday Çiminin Yetiştirilmesi

Ticari olarak elde edilen buğdayların ekime hazır hale gelebilmesi için filizlenmesi gerekmektedir. Bu işlem için geniş bir kapta yıkanan buğday taneleri bir kavanozda su içerisinde bekletilerek (10 saat) suyu içlerine çekerek filizlenmesi gereken adım uygulandı. Daha sonra 2 gün nemli ortamda bırakılan buğdaylar filizlenme aşamasına geçince içi toprak yayılmış bir kaba üst üste gelmeyecek şekilde yaydırılarak ekim işlemi yapıldı.



Şekil 3.1: Buğday çiminin yetiştirilme aşamaları

Yayım işleminden sonra üstü toprakla örtülen buğdaylar 2 hafta sonra ekstrakt için kullanılabilecek seviyeye geldi. 30 g olacak şekilde kesilip tartılan buğday otları ekstrakt işlemi için saf suyla temizlendikten sonra -80 °C derin dondurucuda saklanmak üzere paketlenip kaldırıldı.

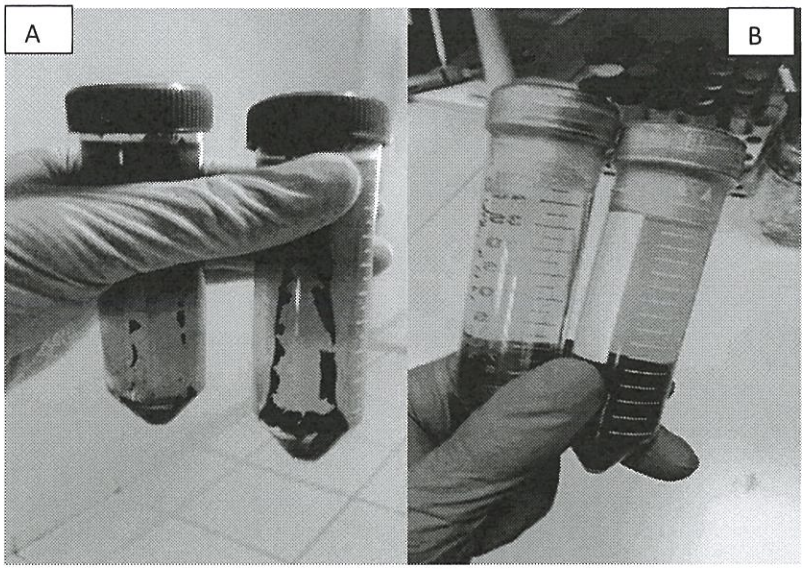


Şekil 3.2: 30 g olacak şekilde kesilmiş buğday çimleri



Şekil 3.3: Buğday çimlerinin ekstraksiyon işlemi

Ekstraksiyon işlemi için gerekli olan daha önceden paketlenip kaldırılmış buğday çimleri -80 °C derin dondurucudan alınıp bir havan yardımıyla belirlenen oranda steril su yardımıyla mekanik olarak ezilip elde edilen buğday çimi ekstraktı (BÇE) 50'lik falkonlara alınıp santrifujleme işlemi için hazırlandı.



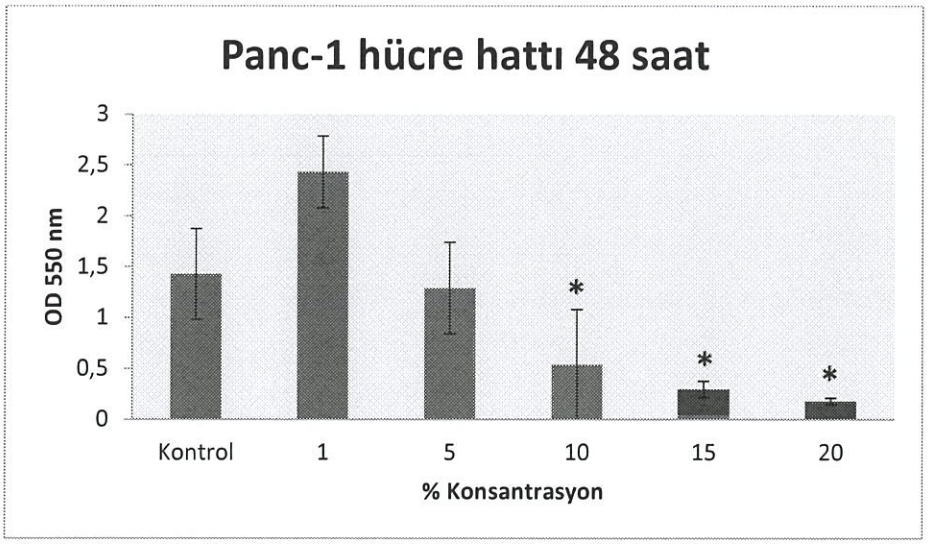
Şekil 3.4: A: Santrifujleme sonrası BÇE'nin son hali, B: Filtrasyon sonrası kullanıma hazır BÇE ekstarktı

Santrifujleme işlemi sonrası katı kısımdan ayrıştırılan sıvı BÇE ekstraktı filtreleme işleminden sonra kullanım için -20 °C'de saklandı.

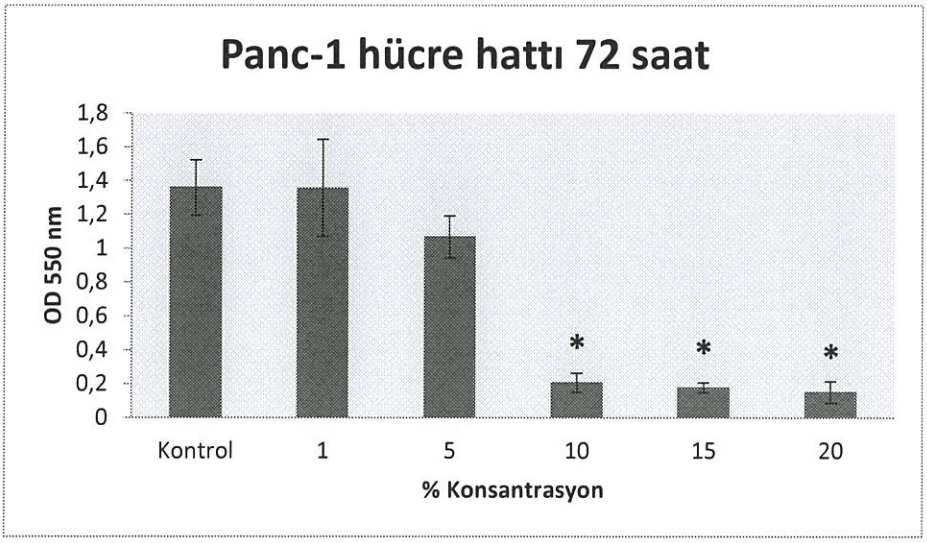
3.2 Çim Ekstraktının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

İnsan pankreas kanseri hücre hattı Panc-1, insan prostat kanseri hücre hattı PC3, insan karaciğer kanseri hücre hattı Hep3B ve insan göbek damar endotel hücre hattı HUVEC hücreleri üzerine çim ekstraktının etkilerinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. 96'lı kuyucuklu plakalara ekim yapılan hücreler üzerine farklı konsantrasyonlarda çim ekstraktı uygulanarak 24, 48 ve 72 saat sonunda sonuçlar alınmıştır.

Panc 1 hücre hattında 48 saat ve 72 saat farklı konsantrasyonlarda çim ekstraktı uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkileri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6 verilmiştir. Pankras kanseri hücrelerinde hem 48 saatte hem de 72 saatte % 10 ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan çim ekstraktı hücrelerin proliferaysonunun % 50 den daha fazla azalmaya neden olmuştur.

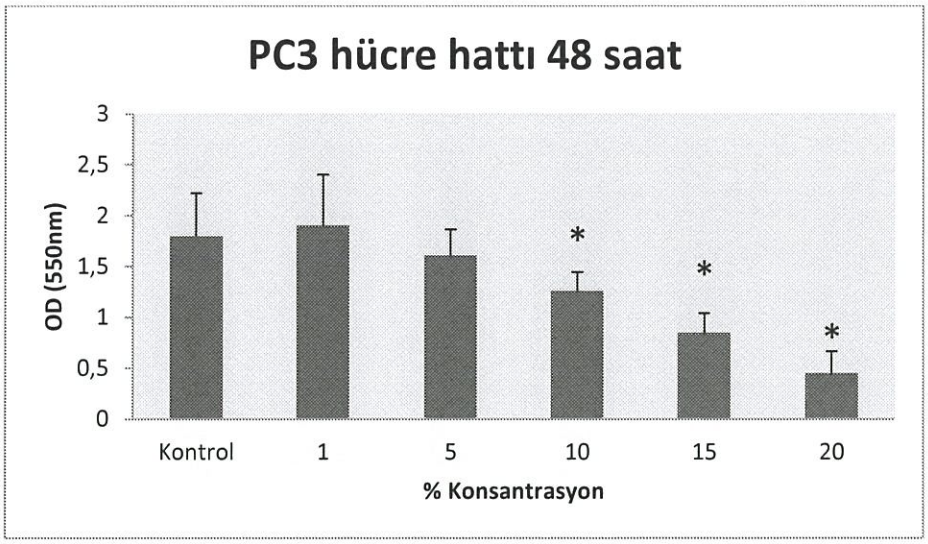


Şekil 3.5: Panc-1 hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri

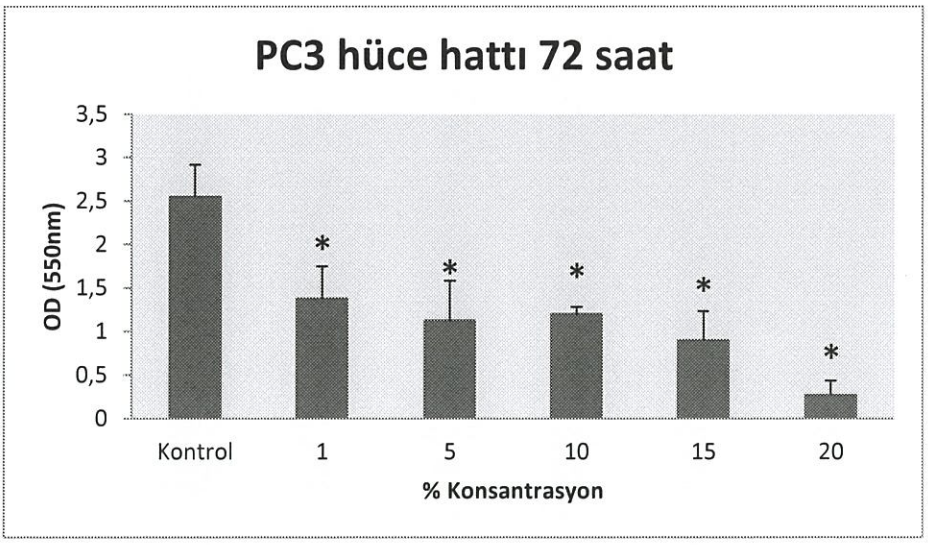


Şekil 3.6: Panc-1 hücre hattında 72 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri

PC3 hücre hattında 48 saat ve 72 saat farklı konsantrasyonlarda çim ekstraktı uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkileri Şekil 3.7 ve Şekil 3.8 verilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde 48 saatte hücre proliferasyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı azalma % 10 ve üzerindeki konsantrasyonlarda meydana gelmiş iken (Şekil 3.7), 72 saat uygulamada % 1 konsantrasyonda uygulanan çim ekstraktı bile istatistiksel olarak anlamalı bir azalmaya sebep olmuştur (Şekil 3.8).



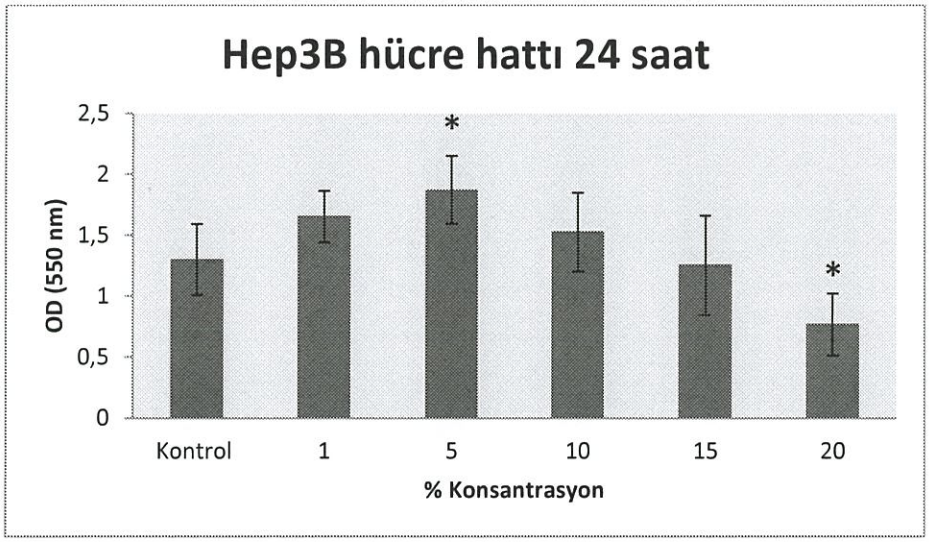
Şekil 3.7: PC3 hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri



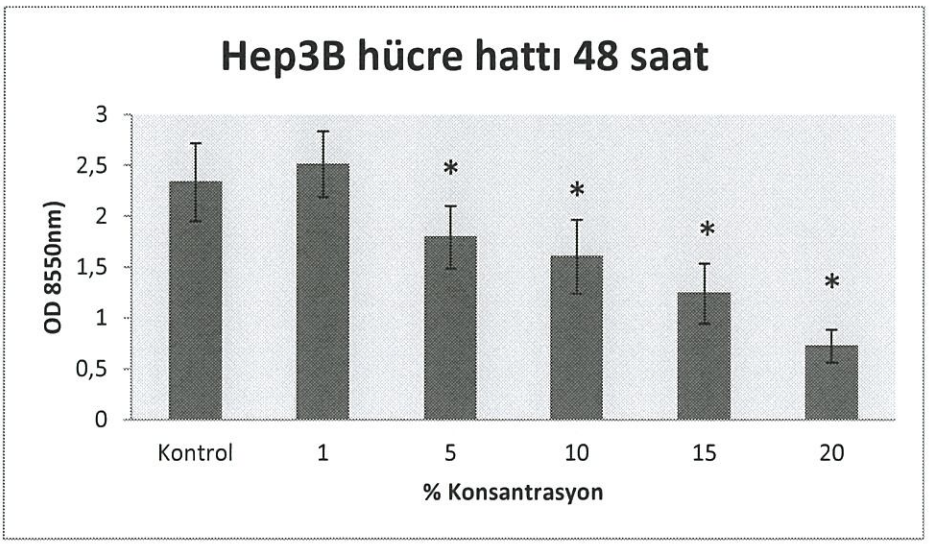
Şekil 3.8: PC3 hücre hattında 72 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri

Hep3B hücre hattında 24 saat ve 48 saat farklı konsantrasyonlarda çim ekstraktı uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkileri Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir. Karaciğer kanseri hücrelerinde 24 saatte hücre proliferasyonundaki istatistiksel olarak anlamlı azalma % 20 yani en yüksek seviyede çim ekstraktı uygulamasında gözlenmiştir.

% 10 ve % 15 çim ekstraktı uygulanan hücrelerde anlamlı bir azalma yaşanmazken, % 5 çim ekstarktı uygulaması hücrelerin proliferasyonunu anlamlı şekilde arttırmıştır Şekil 3.9, 48 saat uygulamada % 1 konsantrasyon dışındaki tüm konsantrasyonlar kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir şekilde hücre sayısında azalmaya sebep olmuştur (Şekil 3.10)

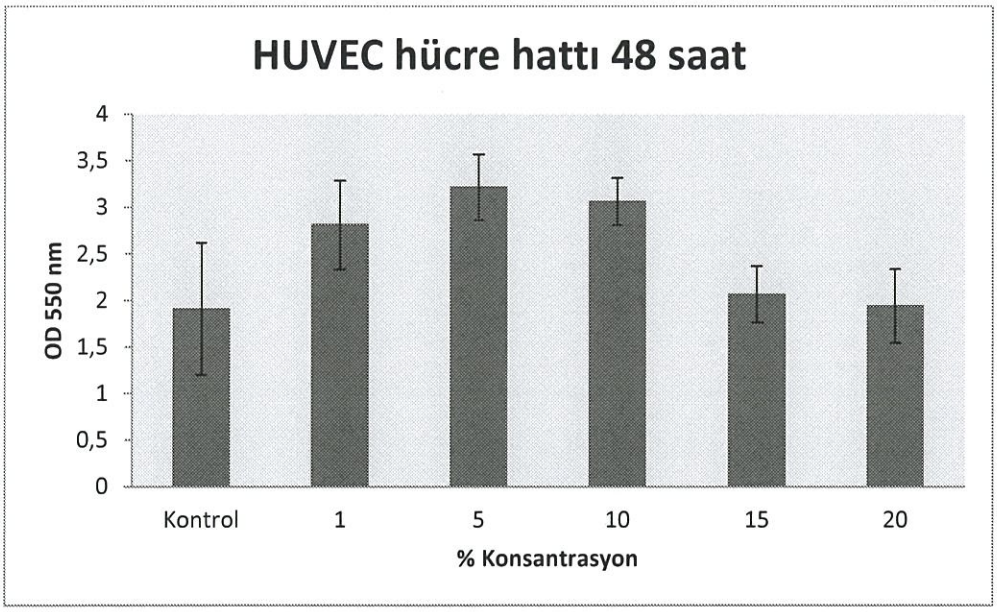


Şekil 3.9: Hep3B hücre hattında 24 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri

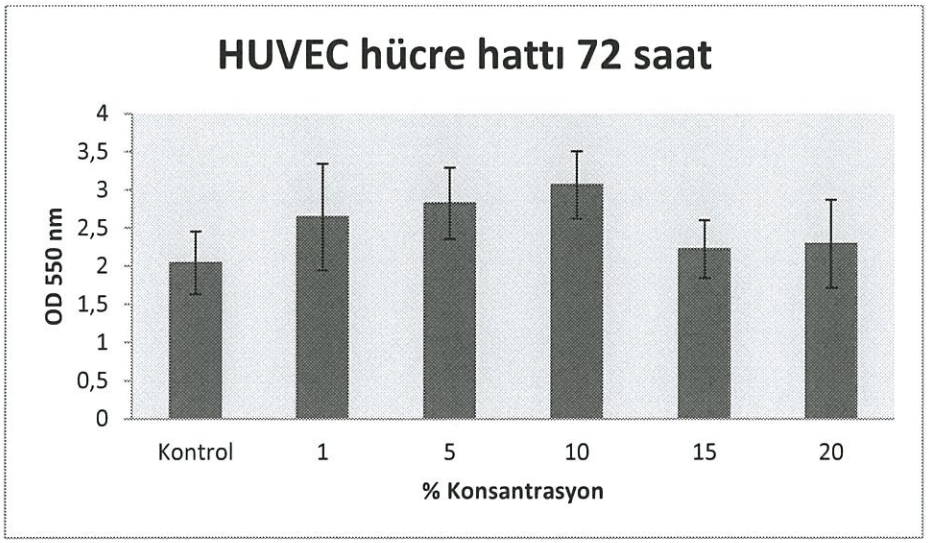


Şekil 3.10: Hep3B hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri

HUVEC hücre hattında 48 saat ve 72 saat çim ekstraktı uygulaması ile yapılan deneyler sonucunda ise kontrol grubu ile kıyaslandığında çim suyu uygulanması hücre canlılığında anlamlı bir artış veya azalışa neden olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.11: HUVEC hücre hattında 48 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri



Şekil 3.12: HUVEC hücre hattında 72 saat çim ekstraktı uygulamasının sitotoksik etkileri

Yapılan MTT çalışmalarında çim ekstrakt konsantrasyonu artışına bağlı olarak sitotoksik aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir. Çalışılan 3 farklı kanser hücre hattından PC3 hücrelerinin çim ekstraktından en fazla etkilenen hücreler olması nedeniyle tezimizin bundan sonraki çalışmaları bu hücre hattı ile devam etmiştir.

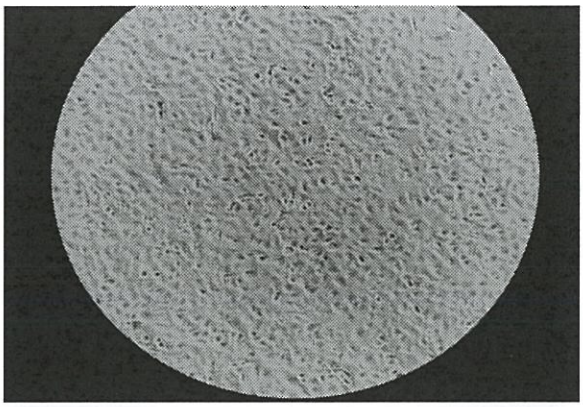
3.3 Çim Ekstraktı Uygulamasının Hücre Morfolojisi ve Davranışı Üzerine Etkisi

Sitotoksisite deneyleri sırasında buğday çim ekstraktı uygulamasının hücrelerde ölüme neden olmasının yanı sıra, inverted mikroskop altında incelenen hücrelerin morfolojisi üzerindeki etkileri de ilgi çekici bulunmuştur.

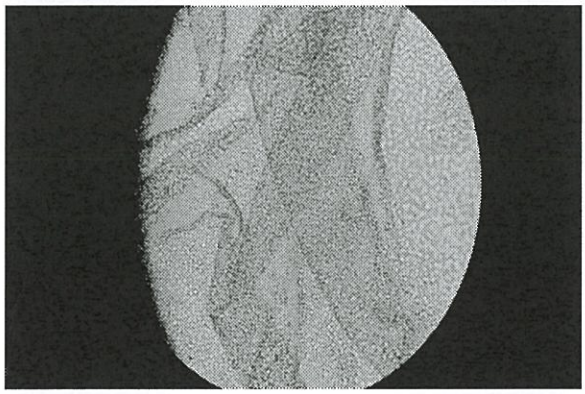
Genel olarak çalışmamızda kullanılan PC3 hücrelerinde 48 saat % 20 oranında çim ekstraktı uygulaması kontrol grubu hücrelerle karşılaştırıldığında hücrelerin morfolojisinin değişmesine ve yuvarlak bir hale gelmesine sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16).

Kanser olmayan hücre hattı olan insan endotel hücrelerinde ise MTT sitotoksisite deney sonuçlarında da verildiği gibi artan konsantrasyonlarda çim ekstraktı uygulaması hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır. 48 saat süre ile % 20 konsantrasyonda buğday çimi ekstraktı uygulanan HUVEC hücreleri inverted mikroskop altında incelendiğinde ise hücrelerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında morfolojik olarak farklı oldukları belirlenmiştir. Uygulama yapılan hücreler yuvarlak bir hal alırken hücreler arasındaki bağlantıların kopmadığı, hücrelerin çoğu kez bir bütün olarak halı gibi yüzeyden kalktıkları belirlenmiştir (Şekil 3.14).

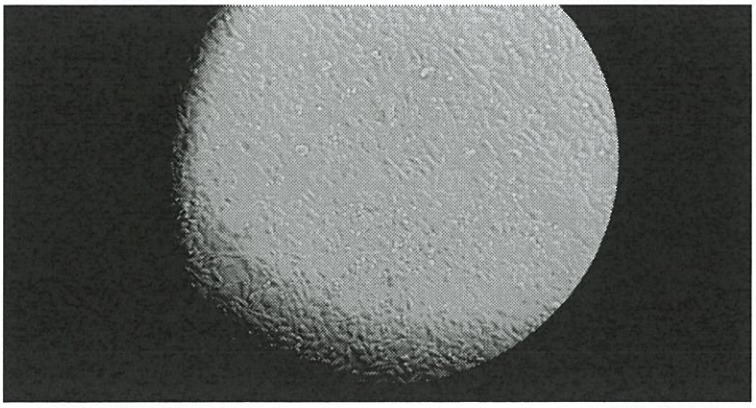
Bu durum buğday çimi ekstraktının etkisini göstermesinde hücre hücre bağlantısının önemli olabileceği kanısına varmamıza neden olmuştur. Bu konu ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılması moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında etkili olacağı kanısındayız.



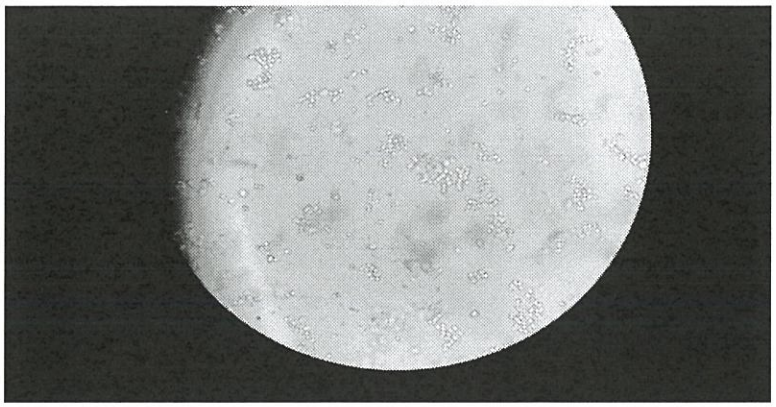
Şekil 3.13: Sağlıklı HUVEC hücre hattı



Şekil 3.14: Taze BÇE uygulanmış HUVEC hücre hattının son durumu (48 saat)



Şekil 3.15: Sağlıklı PC3 hücre hattı

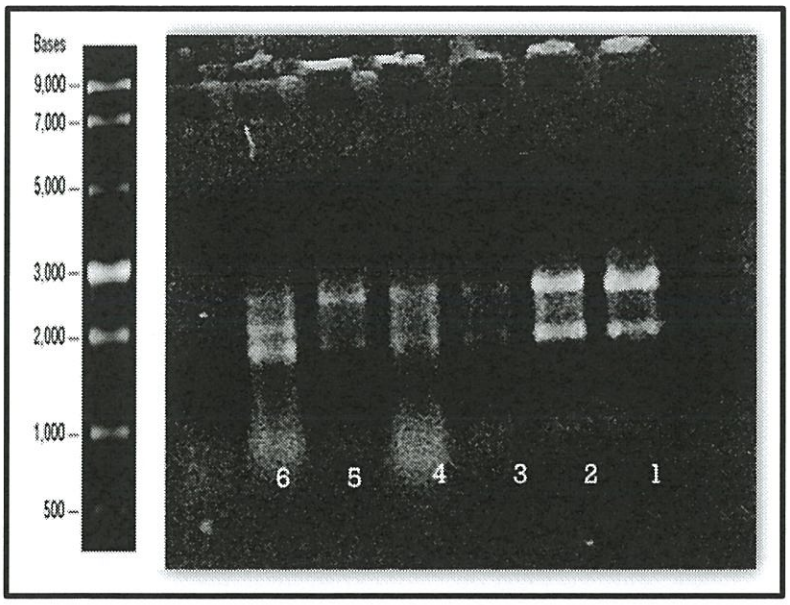


Şekil 3.16: Taze BÇE uygulanmış PC3 hücre hatının son durumu (48 saat)

3.4 PC3 Hücrelerine Çim Ekstraktı Uygulamasının BAX ve Beklin 1 Genlerine Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

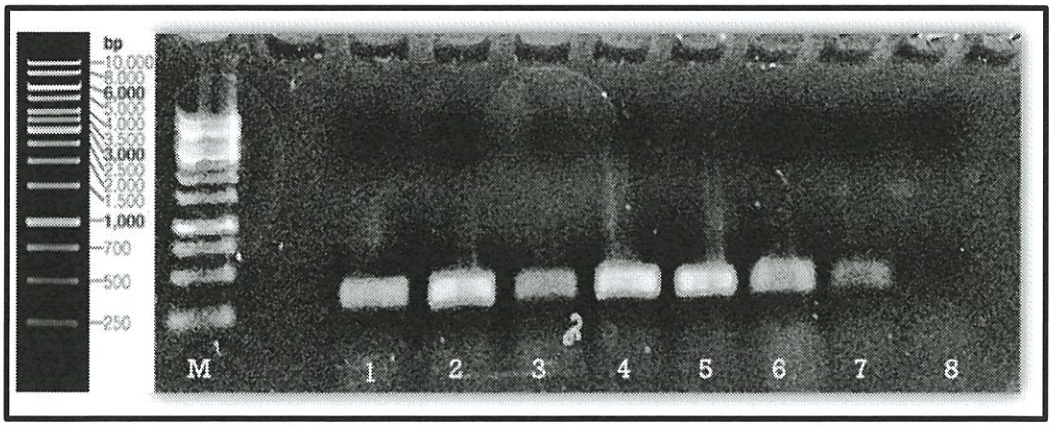
PC3 hücrelerinde çim ekstraktı uygulamasının apoptotik ve otofajik genlere etkisinin belirlenmesi amacıyla 25 cm flasklara bir gün önce ekim yapılan hücreler üzerine % 20 konsantrasyonda çim ekstraktı uygulaması yapıldı. Kontrol grubu olan hücrelere herhangi bir uygulama yapılmadı. Su kontrol olarak isimlendirilen hücrelere ise çimin su ekstraktı kullanılmış olması nedeniyle uygulanan çim miktarınca saf su uygulaması yapıldı.

PC3 hücre hattında BÇE uygulandığında oluşacak mRNA ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri belirlemek için hücreler büyütülüp bölüm 2.2.5 anlatıldığı gibi belirlenen konsantrasyonlarda BÇE uygulaması yapıldı. Uygulamadan sonra elde edilen pelletlerden bölüm 2.2.10 belirtilen firmaya ait protokolü uygulamak suretiyle RNA izolasyonu yapıldı. RNA miktarları belirlendikten sonra, elde edilen RNA ların kalitesini belirlemek amacıyla formaldehit agoroz jel elektroforezi yapıldı (Şekil 3.19). RNA'ların jel üzerindeki durumları gözlemlendikten sonra konsantrasyonu 1000 ng olacak şekilde Bölüm 2.2.14 te anlatıldığı üzere cDNA, sentezi gerçekleştirildi. Daha sonra İnsan β-2 mikroglobilin geni primerleri kullanılarak klasik PCR işlemi yapıldı (Şekil 3.20). cDNA kalitesi iyi bulunan örnekler kullanılarak son aşamada Bölüm 2.2.17 anlatıldığı şekilde Real Time PCR uygulaması yapıldı ve farklı genlerdeki mRNA seviyesindeki değişiklikler belirlendi.



Şekil 3.17: PC3 hücre hattında BÇE ve su uygulanmış RNA'ların formaldehit agoroz jel elektroforezindeki görüntüsü

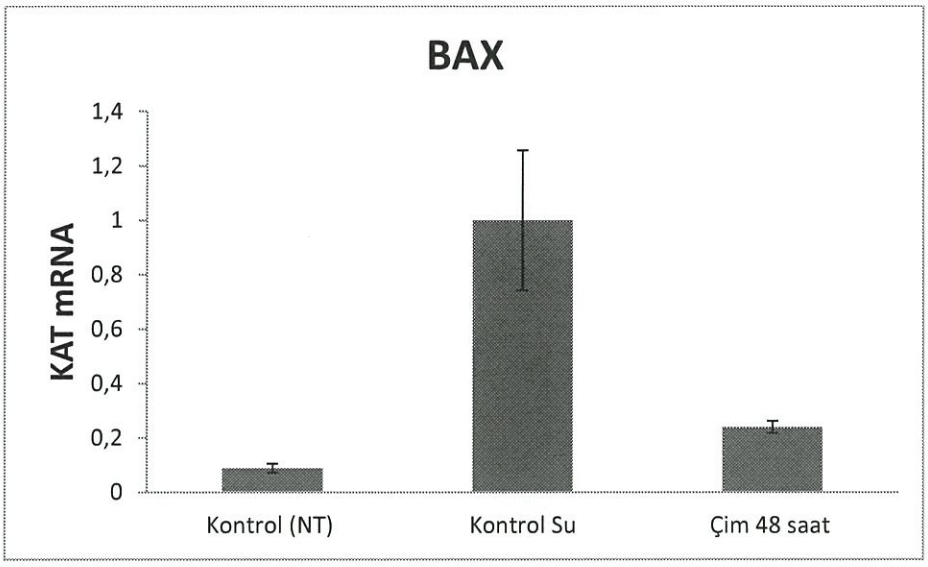
1: Kontrol Grubu RNA'sı 24 saat **2:** Su Grubu RNA'sı 24 saat **3:** Çim Uygulanmış RNA 24 saat **4:** Kontrol Grubu RNA'sı 48 saat **5:** Su grubu RNA'sı 48 saat **6:** Çim Uygulanmış RNA.



Şekil 3.18: cDNA Kontrolü- Agoroz Jel Elektroforez görüntüsü

1: Kontrol Grubu cDNA'sı 24 saat 2: Su Grubu cDNA'sı 24 saat **3:** Çim Uygulanmış cDNA 24 saat 4: Kontrol Grubu cDNA'sı 48 saat **5:** Su grubu cDNA'sı 48 saat **6:** Çim Uygulanmış cDNA. **7:** Pozitif Kontrol **8:** Negatif Kontrol

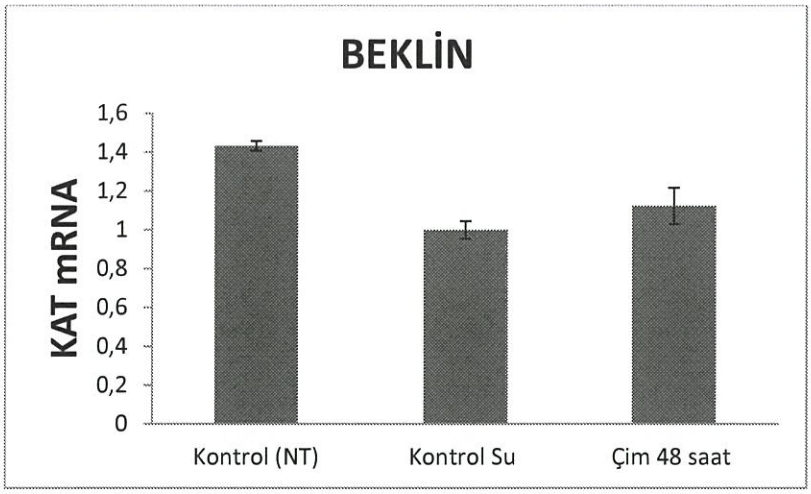
Real time PCR analizleri birbirinden bağımsız iki tekrar olacak sekilde ve her deneyde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. İnsan-β -2-mikroglobilin primerleri normalizasyon amaçlı kullanıldı. Livak metoduna göre mRNA seviyesi hesaplandı. Buna göre mRNA miktarı insan-β-2 mikroglobilin cT degerinden incelenen gen için elde edilen cT degerinin çıkartılması ve elde edilen değerin 2. dereceden kuvvetinin alınmasıyla elde edilen değerdir. Genlere spesifik primerlerin bilgileri materyal metotta verilmiştir (bkz tablo2). Sonuçların değerlendirilmesi için, herhangi bir uygulama yapılmamış olan grubun (NT) incelenen gen bakımından mRNA seviyesi 1 olarak alındı (NT/NT=1) ve diğer gruplar NT değerine bölünerek kat olarak hesaplamalar yapıldı. Yani kat mRNA kontrol (NT) grubun katlarını göstermektedir.



Şekil 3.19: BAX geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonu

Kanser hücrelerinde apoptozis regülasyonunun bozulması büyük önem tasımaktadır. Apoptozis sürecinde Bcl2 gen ailesinin etkin olduğu Bax Yolağı ile Fas Yolağı olmak üzere 2 yolak etkindir ve iki yolağında son noktası kaspazların aktivasyonudur. Bcl-2 ailesinde bugüne kadar aydınlatılan 25 adet protein vardır. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskılarlar. Bu iki zıt etkili grubun isleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik _-heliks) bağlıdır. Tezimiz kapsamında buğday çimi ektraktının PC3 hücrelerinde hücre canlılığını istatistiksel olarak önemli oranda azalttığı ve hücre morfolojisinde değişikliğe sebep olduğu belirlenmiştir.

Hücrelerde meydana gelen bu değişikliklerin apoptotik hücre ölümü ile ilişkisinin araştırılması amacıyla Bcl-2 gen ailesine ait pro-apoptotik BAX genindeki değişikler mRNA seviyesinde incelenmiştir. BAX mRNA ekspresyonu yalnızca su uygulaması yapılan su kontrol grubu hücrelerinde 1 olarak alındığında, herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerdeki mRNA seviyesi ile karşılaştırıldığında yaklaşık 10 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. 48 saat BÇE uygulanan PC3 hücrelerindeki BAX mRNA seviyesi ise yalnızca su uygulaması yapılan su kontrol grubu hücrelerindeki mRNA seviyesinden yaklaşık 5 kat az olduğu görülmüştür (Şekil 3.19). mRNA seviyesindeki bu farklılıkların protein seviyesinde de var olup olmadığının belirlenmesi önemlidir.



Şekil 3.20: BEKLİN geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonu

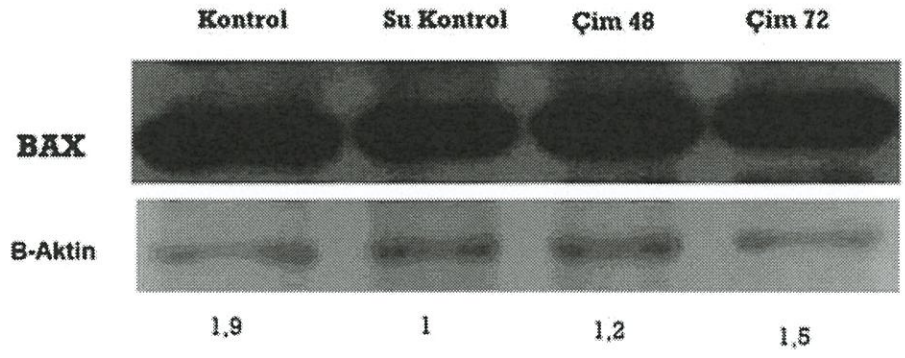
Kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının nedenleri arasında otofajideki anormallikler de yer almaktadır. Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu mayada yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Bu genlerden otofajinin erken safhalarında görev yapan ve otofajinin belirlenmesinde en yaygın olarak genlerden bir tanesi Beklin 1'dir. PC3 hücrelerinde BÇE uygulamasına bağlı olarak meydana gelen ölümde otofajinin ilişkili olup olmadığının araştırılması için Beklin 1 genindeki değişikler mRNA seviyesinde incelenmiştir. Beklin 1 mRNA ekspresyonu yalnızca su uygulaması yapılan su kontrol grubu hücrelerinde 1 olarak alındığında, herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerdeki mRNA seviyesi ile karşılaştırıldığında aralarında 1,4 kat bir farklılık olduğu belirlenmiştir.

48 saat BÇE uygulanan PC3 hücrelerindeki BEKLİN mRNA seviyesi ise yalnızca su uygulaması yapılan su kontrol grubu hücrelerindeki mRNA seviyesine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. (Şekil 3.20) .

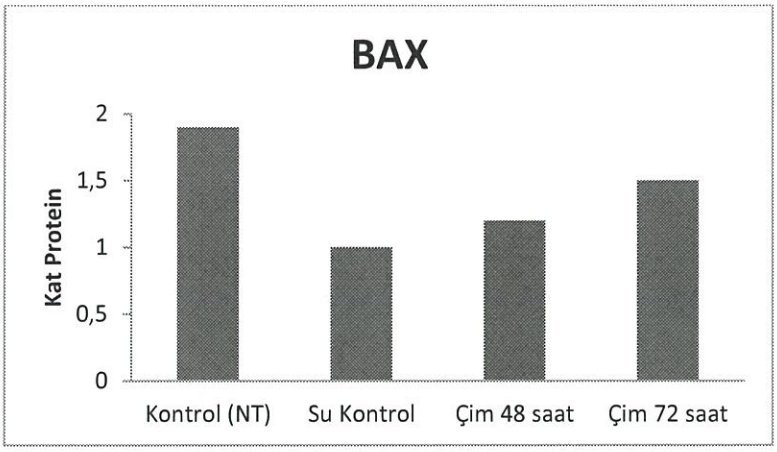
3.5 PC3 Hücrelerine Çim Ekstraktı Uygulamasının BAX ve Beklin 1 Genlerine Etkisinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

PC3 hücrelerinde çim ekstraktı uygulamasının apoptotik ve otofajik proteinlere etkisinin belirlenmesi amacıyla 25 cm flasklara bir gün önce ekim yapılan hücreler üzerine % 20 konsantrasyonda çim ekstraktı uygulaması yapıldı. Kontrol grubu olan hücrelere herhangi bir uygulama yapılmadı. Su kontrol olarak isimlendirilen hücrelere ise çimin su ekstraktı kullanılmış olması nedeniyle uygulanan çim miktarınca saf su uygulaması yapıldı

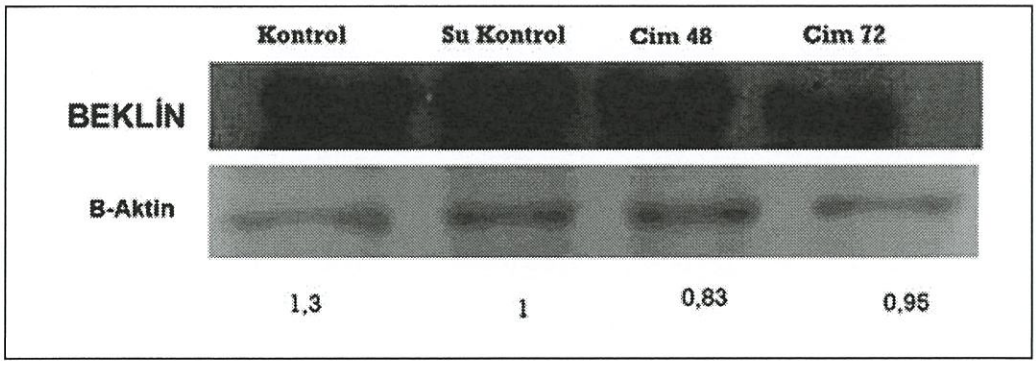
PC3 hücre hattında BÇE uygulandığında oluşacak protein ekspresyon seviyesindeki değişikleri belirlemek için hücreler büyütülüp bölüm 2.2.5 anlatıldığı gibi belirlenen konsantrasyonlarda BÇE uygulaması yapıldı. Uygulamadan sonra elde edilen pelletlerden bölüm 2.2.18 belirtilen yöntemle protein izolasyonu yapıldı. Protein miktarları belirlendikten sonra, bölüm 2.2.20 de anlatıldığı şekilde protein elektroforezi ve bölüm 2.2.21 de anlatıldığı şekilde jeldeki proteinlerin membrana transfer edildiği blotting aşaması yapıldı. Elde edilen membranlar spesifik antikorlar ile işaretlenerek protein seviyesindeki değişmeler belirlendi.



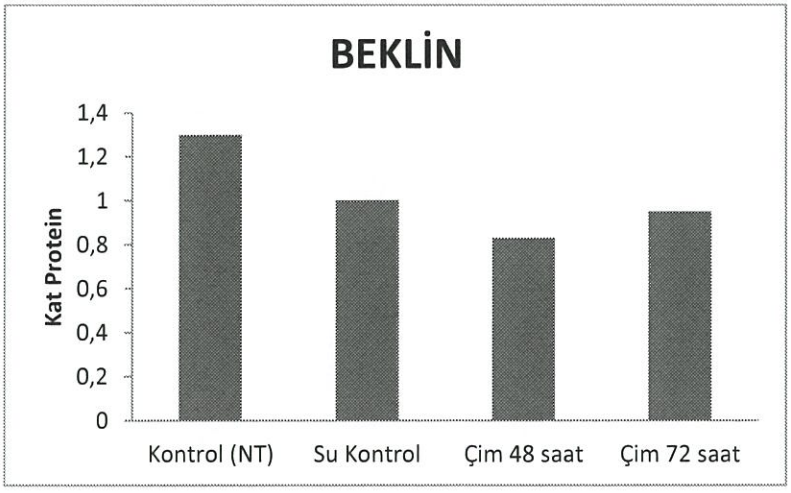
Şekil 3.21: BAX geninin Western blot analizi



Şekil 3.22: BAX geninin protein ekspresyonu



Şekil 3.23: BEKLİN geninin Western blot analizi



Şekil 3.24: BEKLİN geninin protein ekspresyonu

Kanser hücrelerinde apoptozis regülasyonunun bozulması büyük önem taşımaktadır. Apoptoziste spesifik olarak pro-apoptotik olarak görev yapan yani apoptotik bir aktivatör olan Bax proteini mitokondriden sitokrom c salınımının artması ve kaspaz yolağının aktivasyonun aracılığı ile apoptotik etkisini gösterir. PC3 hücrelerine 48 saat BÇE uygulamasının BAX protein seviyesine etkileri şekil 3.21 de verilmiştir. Yalnızca su uygulanmış hücrelerdeki BAX protein seviyesi 1 olarak alındığında, herhangi bir uygulama yapılmamış olan (NT: non-treated) kontrol grubu hücrelerindeki BAX protein seviyesi ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 2 kat bir farklılık belirlenmiştir. Yalnızca su uygulanmış hücreler ile 48 ve 72 saat % 20 BÇE uygulanmış hücrelerdeki BAX protein seviyesi karşılaştırıldığında ise 1,2 ve 1,5 kat farklılık gözlenmiştir. Yalnızca su uygulaması yapılan kontrol grubu hücrelerle BÇE uygulanan hücrelerdeki zamana bağlı olarak pro-apoptotik BAX protein seviyesindeki artış bu hücrelerde apoptotik yolağın etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizma olan otofajinin erken safhalarında görevli olan Beklin 1 proteini, otofajik vesiküllerin çekirdeklenmesini tesvik eder. PC3 hücrelerine 48 saat BÇE uygulamasının Beklin 1 protein seviyesine etkileri şekil 3.24 de verilmiştir. Yalnızca su uygulanmış hücrelerdeki Beklin 1 protein seviyesi 1 olarak alındığında, herhangi bir uygulama yapılmamış olan (NT: non-treated) kontrol grubu hücrelerindeki Beklin 1 protein seviyesi ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 1,3 kat bir farklılık belirlenmiştir. Yalnızca su uygulanmış hücreler ile 48 ve 72 saat % 20 BÇE uygulanmış hücrelerdeki Beklin 1 protein seviyesi karşılaştırıldığında ise Beklin 1 protein seviyesinde 0,83 ve 0,95 kat azalma olduğu gözlenmiştir. Beklin 1 protein seviyesindeki değişimin az olması otofajik ölüm yolunun BÇE uygulamasında PC3 hücrelerinde etkisinin az olduğunu düşündürmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser günümüzde öldürücülük oranıyla başta gelen hastalıklar içerisinde yer almaktadır. Hücrelerin anormal çoğalması ve kararsız davranışlarıyla karakterize edilir. Dünya geneli 2012 kanser verilerine göre 14,2 milyon kanser vakası gözlemlenmiş bunların 8,2 milyonu ise kansere bağlı ölümle sonuçlandığı saptanmıştır [174]. Farklı kanser hatlarının varlığı ve sürekli değişim göstermesi nedeniyle buna bağlı olarak yapılan çalışmalarda kesin tedaviye dair sonuçlara ulaşılamadığından bu konuda yapılan çalışmalar ek tedavi yöntemleri ve çözüm odaklı araştırmalar güncelliğini korumakta ve sürekli artmaktadır [175]. T.C Sağlık bakanlığı halk sağlığı verilerine göre ülkemizde erkekler arasında akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser tipi prostat kanseridir. Prostat kanseri gelişimini tetikleyen birçok öğe bulunmaktadır. Bunlar içerisinde en önemli faktörlerin başında hormonal faktörler ve diyet gelmektedir [176, 177]. Bu gibi etkenlerin yanı sıra yaş ve akrabalarda hastalığın öyküsü gibi önemli kriterlerde hastalığa yakalanma süreciyle ilişkili olduğu bulunmuştur [26].

Kemoterapide kullanılan ilaçlar genelde kanserin yayılımını ve yıkıcı etkilerini durdurmak üzeredir. Hastalara uygulanan bu tarz kemoterapatik ilaçlar tedavilerde kayda değer sonuçlar göstermesine rağmen hasta üstünde ciddi doku yıkımlara yol açmaktadır. Dolayısıyla kemoterapötik ilaçların dışında hem tedaviye etki edici hem de bu yıkıcı etkilerin azaltılmasına yönelik alternatif tedavi şekilleri aranmaktadır. Bu yolda en önemli etken vücut direncidir. Vücut direncinin yükseltilmesi kanserle verilecek savaşta en önemli kilit yol durumundadır. Bu durumda kemoterapatik ilaçlarla kombine ilaç çalışmalarının yapılmasının önemini ortaya çıkarmaktadır [178].

Uygulanan ilaçlarla apoptoz ya da otofajiye gitmesini istediğimiz kanser hücreleri bazen bu ilaçlara direnç gösterip çoğalamaya devam edebilmektedir [179]. Kanserleşmenin oluşmasında özellikle apoptoz benzeri yolaklarda meydana gelen aksaklıkların büyük etkisinin olduğu görülmektedir. Bu nedenle ilaçlarla birlikte çalışabilen ya da tek başına ilaç tedavisine ihtiyaç kalmadan etki gösterebilecek bitkisel tedavi yöntemleri önem kazanmıştır.

Günümüzde yapılan çalışmalar alternatif tıp olarak isimlendirdiğimiz ve temeli bitki kökenli olan çalışmaların öneminin artmasına ve yaygınlaşmasına zemin hazırlamaktadır. Yapılan araştırmalar neticesinde kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin azaltılmasında bitki temelli beslenmenin öneminin azımsanmayacak kadar etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan araştırmalar gösteriyor ki % 7- 31 arası bitkisel (sebze, meyve) diyetle [7, 8] beslenen insanlarda kemoterapötik ilaçların yan etkilerinin azalmakta olduğu görülmüştür. Bu nedenle alternatif tıp alanında yapılan çalışma ve araştırmalar her geçen gün önem kazanmakta ve artış göstermektedir.

Örneğin; Nar (*Punica granatum L*) önemli fitokimyasal içerikler barındıran ve terapötik amaçlarlada kullanılan bir meyvedir. Nar ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Dikmen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nar meyve kabuğunun (NKE) farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 200, 300 µgr/ml) MCF-7 insan meme kanseri üzerindeki apoptotik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. MTT ve nötral kırmızı testleriyle ekstrenin sitotoksik etkilerine bakılmış konsantrasyon ve zamana göre artışla sitotoksik etkininde arttığı belirlenmiştir. Etkinin özellikle 48. Saatte 100, 200 ve 300 µgr/ml de önemli artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Apoptotik etkiler ise ELISA ile belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda NKE ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerinde zamana ve konsantrasyon artışına bağlı olarak apoptotik ve sitotoksik etkiler göstererek hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir [180].

Başka bir çalışmada yeşil arpa suyunun (GB), insan lösemi/lenfoma hücre hatları üzerinde anti proliferatif ve pro apoptatik özellikleri incelenip olası anti kanser aktivitesi araştırılmıştır. Sonuç olarak yeşil arpa suyu uygulanmış kanserli olmayan hücrelere kıyasla lösemi lenfoma hücrelerinin bir kısmında seçici antiproliferatif aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. GB' nin tek başına bir lenfoma ajanı olarak veya standart kanser tedavileriyle kombinasyon halinde kullanılabilir bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koyulmuştur [181].

Yapılan bir diğer bitki kökenli çalışmada; bir çalışmada tatlı ve acı kayısı (*Prunus armeniaca L.)* çekirdeklerinin metanol ve su özütlerinin in vitro antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Kayısı çekirdeğinin antioksidan özellikleri sırasıyla DPPH testi, tiyosinat yöntemi ve Folin yöntemi ile ölçülen radikal süpürme gücü, lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi ve toplam fenol içeriği belirlenerek değerlendirilmiştir. En ekili antibakteriyel aktivite, acı çekirdeklerin metanol ve su özütlerinde gram pozitif bakteriler *Staphylococcus aureus*'a karşı ve tatlı tanelerin metanol ile özütünde saptanmıştır. Ek olarak, acı çekirdeklerin metanol ekstreleri gram negatif bakteri *Escherichia coli'ye* karşı çok etkili olduğu gösterilmiştir. (0.312 mg/mL) [182].

Hussain ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada buğday çimi ekstraktının (AWE) tek başına ve cisplatin ile kombinasyon halinde insan meme ve rahim ağzı kanseri hücreleri üzerindeki güçlü inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. AWE'nin sitotoksik potansiyeli, tek başına ve cisplatin ile kombinasyon halinde, insan göğüs ve rahim ağzı kasneri (MCF-7 ve HeLa) üzerinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, AWE nin zaman ve doza bağlı olarak seçici sitotoksitite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, AWE tarafından uyarılan hücre ölüm modu, nükleer morfolojik inceleme ve hücre döngüsü analizi ile belirlenmiştir. Bu etkiler daha sonra RT-PCR ile apoptoz ve proliferasyona katılan genlerin ekspresyonu ile korele olduğu tespit edilmiştir (cyclin D1 and Bax). AWE'nin apoptozu indüklediği ve MCF-7 ve HeLa hücrelerinde zamana bağlı bir şekilde Bax ve cyclin D1 ekspresyonunun modülasyonu bulunmuştur. Bu sonuçlar AWE'nin anti-kanser potansiyelinin apoptoz indüksiyonu ve anti-proliferatif özelliklerinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu yapılan çalışmada insan göğsü ve rahim ağzı kanserinin tedavi önleme ve tedavinin etkilerini azaltmada buğday çiminin önemini vurgulamaktadır [6].

Tezimiz kapsamında buğday çimi (*Triticum aestivum L.*) ekstresinin (BÇE) farklı konsantrasyonlarının farklı hücre hatları (PC3, HUVEC, HEP3B, PANC-1) üzerindeki farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) etkisi incelenmiştir. İnsan endotel hücre hattı dışındaki diğer kanser hücre hatlarında BÇE uygulaması zaman ve doza bağlı olarak hücrelerde ölüme neden olduğu MTT testi ile belirlenmiştir. BÇE uygulaması sitotoksik etkinin en yüksek gözlendiği PC3 hücrelerinde hücre morfolojisinde de değişikliğe neden olmuş ve hücreler yuvarlak bir şekil almışlardır.

HUVEC hücrelerinde de morfolojik olarak hücre şekli yuvarlak gözlenmiş ancak hücrelerin birbirleriyle olan bağlantılarının inverted mikroskop altında yapılan çalışmalarda bozulmadığı ve hücrelerin bütünlüğünün korunduğu tespit edilmiştir. En yüksek sitotoksik etkinin gözlendiği PC3 hücrelerinde hücre ölümü ile ilişkili olarak pro apoptotik BAX geni ekspresyonu mRNA ve protein seviyesinde incelenmiştir. BAX mRNA seviyesinin kontrol olarak su kullanılan hücreler ile 48 saat % 20 BÇE uygulanan hücrelerde yaklaşık 5 kat az bulundu. Protein seviyesinde western blot ile yapılan çalışmalarda ise mRNA seviyesindeki farklılık belirlenmemiştir. PC3 hücrelerinde hücre ölümü ile ilişkili olarak otofaji ilişkili Beklin 1 geni ekspresyonu da mRNA ve protein seviyesinde incelenmiştir. Beklin 1 mRNA ekspresyonu yalnızca su uygulaması yapılan su kontrol grubu hücrelerinde 1 olarak alındığında, herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerdeki mRNA seviyesi ile karşılaştırıldığında aralarında 1,4 kat bir farklılık olduğu belirlenmiştir. 48 saat BÇE uygulanan PC3 hücrelerindeki Beklin1 mRNA seviyesi ise yalnızca su uygulaması yapılan su kontrol grubu hücrelerindeki mRNA seviyesine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Panc1, Hep3B, PC3 ve HUVEC hücrelerine BÇE uygulamasının hücrelerin yaşamsal özelliklerinde değişikliğe sebep olduğu, özellikle hücre proliferasyonu ve hücre morfolojisini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. BÇE uygulamasının özellikle PC3 hücrelerinde, hücrelerde apoptotik ve otofajik yolaklarda görevli proteinlerde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir.

5. KAYNAKLAR

[1] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., "Global cancer statistics, 2002", *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74-108, (2005).

[2] Fabian-Estrada, E., et al., "Breast cancer in males, case presentation and literature review", *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 56(4), 424-428, (2018).

[3] Rathore, R., McCallum, J.E., Varghese, E., Florea, A.-M., Büsselberg, D., "Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)", *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 22(7), 898-919, (2017).

[4] Kulkarni, S.D., Acharya, R., Nair, A.G.C., Rajurkar, N.S., Reddy, A.V.R., "Determination of elemental concentration profiles in tender wheatgrass (Triticum aestivum L.) using instrumental neutron activation analysis", *Food Chemistry*, 95(4), 699-707, (2006).

[5] Hanninen, O., Rauma, A.L., Kaartinen, K., Nenonen, M., "Vegan diet in physiological health promotion", *Acta Physiol Hung*, 86(3-4), 171-80, (1999).

[6] Hussain, A., et al., "Growth inhibitory and adjuvant therapeutic potential of aqueous extract of Triticum aestivum on MCF-7 and HeLa cells", *Exp Oncol*, 36(1), 9-16, (2014).

[7] Bal, D.G., Foerster, S.B., Backman, D.R., Lyman, D.O., "Dietary change and cancer: challenges and future direction", *J Nutr*, 131(1), 181s-185s, (2001).

[8] Tan, A.C., Konczak, I., Sze, D.M., Ramzan, I., "Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals", *Nutr Cancer*, 63(4), 495-505, (2011).

[9] Cao, X., Liu, M., Tuo, J., Shen, D., Chan, C.C., "The effects of quercetin in cultured human RPE cells under oxidative stress and in Ccl2/Cx3cr1 double deficient mice", *Exp Eye Res*, 91(1), 15-25, (2010).

[10] Li, X., et al., "Identification of the human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of the phytochemical ferulic acid", *Drug Metab Pharmacokinet*, 26(4), 341-50, (2011).

[11] Michaud-Levesque, J., Bousquet-Gagnon, N., Beliveau, R., "Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration", *Exp Cell Res*, 318(8), 925-35, (2012).

[12] Jayaprakasam, B., Vanisree, M., Zhang, Y., Dewitt, D.L., Nair, M.G., "Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation", *J Agric Food Chem*, 54(15), 5375-81, (2006).

[13] Menendez, J.A., et al., "Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays", *Int J Mol Med*, 22(4), 433-9, (2008).

[14] Tariq, A., et al., "A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants", *Phytother Res*, 31(2), 202-264, (2017).

[15] Subramani, R.veLakshmanaswamy, R., "Complementary and Alternative Medicine and Breast Cancer", *Prog Mol Biol Transl Sci*, 151, 231-274, (2017).

[16] Sharma, P., McClees, S.F., Afaq, F., "Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update", *Molecules*, 22(1)(2017).

[17] Khan, F.U., et al., "Comprehensive overview of prostatitis", *Biomed Pharmacother*, 94, 1064-1076, (2017).

[18] DeSantis, C., Jemal, A., Ward, E., Thun, M.J., "Temporal trends in breast cancer mortality by state and race", *Cancer Causes Control*, 19(5), 537-45, (2008).

[19] Bertram, J.S., "The molecular biology of cancer", *Mol Aspects Med*, 21(6), 167-223, (2000).

[20] Ozer, B., et al., "Clinicopathologic features and risk factors for hepatocellular carcinoma: results from a single center in southern Turkey", *Turk J Gastroenterol*, 14(2), 85-90, (2003).

[21] Doherty, B., Nambudiri, V.E., Palmer, W.C., "Update on the Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma", *Curr Gastroenterol Rep*, 19(1), 2, (2017).

[22] Ferrari, A., Dirksen, U., Bielack, S., "Sarcomas of Soft Tissue and Bone", *Prog Tumor Res*, 43, 128-41, (2016).

[23] Bray, F., et al., "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424, (2018).

[24] Bray, F., et al., "Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration", *Int J Cancer*, 137(9), 2060-71, (2015).

[25] Franz, M.C., et al., "Zinc transporters in prostate cancer", *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2), 735-741, (2013).

[26] McGuire, S., "World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015", *Adv Nutr*, 7(2), 418-9, (2016).

[27] Caini, S., et al., "Sexually transmitted infections and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis", *Cancer Epidemiol*, 38(4), 329-38, (2014).

[28] Lee, E.J., et al., "Breast Lesions in Children and Adolescents: Diagnosis and Management", *Korean Journal Of Radiology*, 19(5), 978-991, (2018).

[29] Pdq Integrative, A.veComplementary Therapies Editorial, B., *Prostate Cancer, Nutrition, and Dietary Supplements (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002, National Cancer Institute (US): Bethesda (MD).

[30] Cuzick, J., et al., "Prevention and early detection of prostate cancer", *The Lancet. Oncology*, 15(11), e484-e492, (2014).

[31] Catalona, W.J., "Prostate Cancer Screening", *Med Clin North Am*, 102(2), 199-214, (2018).

[32] Yu Ko, W.F., Oliffe, J.L., Johnson, J.L., Bottorff, J.L., "The Connections Between Work, Prostate Cancer Screening, Diagnosis, and the Decision to Undergo Radical Prostatectomy", *American journal of men's health*, 12(5), 1670-1680, (2018).

[33] Board, P.D.Q.A.T.E., *Prostate Cancer Treatment (PDQ(R)): Patient Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002, National Cancer Institute (US): Bethesda (MD).

[34] Duggan, M.A., Anderson, W.F., Altekruse, S., Penberthy, L., Sherman, M.E., "The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program and

Pathology: Toward Strengthening the Critical Relationship", *The American journal of surgical pathology*, 40(12), e94-e102, (2016).

[35] Baade, P.D., Youlden, D.R., Cramb, S.M., Dunn, J., Gardiner, R.A., "Epidemiology of prostate cancer in the Asia-Pacific region", *Prostate Int*, 1(2), 47-58, (2013).

[36] Miller, D.C., Hafez, K.S., Stewart, A., Montie, J.E., Wei, J.T., "Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update form the National Cancer Data Base", *Cancer*, 98(6), 1169-78, (2003).

[37] van der Cruijsen-Koeter, I.W., et al., "Comparison of screen detected and clinically diagnosed prostate cancer in the European randomized study of screening for prostate cancer, section rotterdam", *J Urol*, 174(1), 121-5, (2005).

[38] Hsing, A.W.veChokkalingam, A.P., "Prostate cancer epidemiology", *Front Biosci*, 11, 1388-413, (2006).

[39] Hankey, B.F., et al., "Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates", *J Natl Cancer Inst*, 91(12), 1017-24, (1999).

[40] Breslow, N., et al., "Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France", *Int J Cancer*, 20(5), 680-8, (1977).

[41] Zeegers, M.P., Jellema, A., Ostrer, H., "Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis", *Cancer*, 97(8), 1894-903, (2003).

[42] Jemal, A., et al., "Cancer statistics, 2005", *CA Cancer J Clin*, 55(1), 10-30, (2005).

[43] Martin, R.M., Vatten, L., Gunnell, D., Romundstad, P., "Blood pressure and risk of prostate cancer: Cohort Norway (CONOR)", *Cancer Causes Control*, 21(3), 463-72, (2010).

[44] Friedenreich, C.M., Neilson, H.K., Lynch, B.M., "State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention", *Eur J Cancer*, 46(14), 2593-604, (2010).

[45] Struewing, J.P., et al., "The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews", *N Engl J Med*, 336(20), 1401-8, (1997).

[46] Gallagher, R.P.veFleshner, N., "Prostate cancer: 3. Individual risk factors", *Cmaj*, 159(7), 807-13, (1998).

[47] Eeles, R.A., et al., "Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility", *Nat Genet*, 40(3), 316-21, (2008).

[48] Thomas, G., et al., "Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer", *Nat Genet*, 40(3), 310-5, (2008).

[49] Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J., "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults", *N Engl J Med*, 348(17), 1625-38, (2003).

[50] Gann, P.H., Hennekens, C.H., Ma, J., Longcope, C., Stampfer, M.J., "Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer", *J Natl Cancer Inst*, 88(16), 1118-26, (1996).

[51] Aumüller, G., *Prostate gland and seminal vesicles*. 2012: Springer Science & Business Media.

[52] Mustafa, M., et al., "Prostate Cancer: Pathophysiology, Diagnosis, and Prognosis", *IOSR J Dent Med Sci*, 15(6), 4-11, (2016).

[53] Moore, K.L., Dalley, A.F., Agur, A.M., *Clinically oriented anatomy*. 2013: Lippincott Williams & Wilkins.

[54] Leav, I., et al., "Cytoprotective mitochondrial chaperone TRAP-1 as a novel molecular target in localized and metastatic prostate cancer", *Am J Pathol*, 176(1), 393-401, (2010).

[55] Zha, J.veHuang, Y.F., "[TGF-beta/Smad in prostate cancer: an update]", *Zhonghua Nan Ke Xue*, 15(9), 840-3, (2009).

[56] Watanabe, S., et al., "Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human prostate cancer specimens with and without neo-adjuvant hormonal therapy", *J Cancer Res Clin Oncol*, 136(5), 787-93, (2010).

[57] Senapati, S., et al., "Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway", *Oncogene*, 29(9), 1293-302, (2010).

[58] Kierszenbaum, A.L.veTres, L.L., "Histology and cell biology : an introduction to pathology", (2012).

[59] Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., "Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria", *PLoS Genet*, 2(10), e135, (2006).

[60] Green, D.R., *Means to an end : apoptosis and other cell death mechanisms*. 2011: Cold Spring Harbor (N.Y.) : Cold Spring Harbor laboratory press.

[61] Tait, S.W.G., Ichim, G., Green, D.R., "Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death", *Journal of cell science*, 127(Pt 10), 2135-2144, (2014).

[62] Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer*, 26(4), 239-57, (1972).

[63] Horvitz, H.R., "Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans", *Cancer Res*, 59(7 Suppl), 1701s-1706s, (1999).

[64] Formigli, L., et al., "Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis", *J Cell Physiol*, 182(1), 41-9, (2000).

[65] Norbury, C.J.veHickson, I.D., "Cellular responses to DNA damage", *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 367-401, (2001).

[66] Hirsch, T., et al., "The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death", *Oncogene*, 15(13), 1573-81, (1997).

[67] Zeiss, C.J., "The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice", *Vet Pathol*, 40(5), 481-95, (2003).

[68] Hacker, G., "The morphology of apoptosis", *Cell Tissue Res*, 301(1), 5-17, (2000).

[69] Saraste, A.vePulkki, K., "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis", *Cardiovasc Res*, 45(3), 528-37, (2000).

[70] Hengartner, M.O., "Apoptosis: corralling the corpses", *Cell*, 104(3), 325-8, (2001).

[71] Kroemer, G., et al., "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death", *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1463-7, (2005).

[72] Bucur, O., Nat, R., Cretoiu, D., Popescu, L.M., "Phagocytosis of apoptotic cells by microglia in vitro", *J Cell Mol Med*, 5(4), 438-41, (2001).

[73] Li, J.veYuan, J., "Caspases in apoptosis and beyond", *Oncogene*, 27(48), 6194-206, (2008).

[74] Thornberry, N.A.veLazebnik, Y., "Caspases: enemies within", *Science*, 281(5381), 1312-6, (1998).

[75] Nicholson, D.W., "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death", *Cell Death Differ*, 6(11), 1028-42, (1999).

[76] Stennicke, H.R.veSalvesen, G.S., "Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation", *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2), 299-306, (2000).

[77] Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J., "A decade of caspases", *Oncogene*, 22(53), 8543-67, (2003).

[78] Guicciardi, M.E.veGores, G.J., "Life and death by death receptors", *Faseb j*, 23(6), 1625-37, (2009).

[79] Fulda, S.veDebatin, K.M., "Death receptor signaling in cancer therapy", *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 3(4), 253-62, (2003).

[80] Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V., "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation", *Cell*, 81(4), 495-504, (1995).

[81] Wajant, H., "The Fas signaling pathway: more than a paradigm", *Science*, 296(5573), 1635-6, (2002).

[82] Kelliher, M.A., et al., "The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal", *Immunity*, 8(3), 297-303, (1998).

[83] Kischkel, F.C., et al., "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor", *Embo j*, 14(22), 5579-88, (1995).

[84] Kataoka, T., et al., "FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation", *J Immunol*, 161(8), 3936-42, (1998).

[85] Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E., "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis", *J Biol Chem*, 274(3), 1541-8, (1999).

[86] Green, D.R.veKroemer, G., "The pathophysiology of mitochondrial cell death", *Science*, 305(5684), 626-9, (2004).

[87] Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death", *Physiol Rev*, 87(1), 99-163, (2007).

[88] Danial, N.N.veKorsmeyer, S.J., "Cell death: critical control points", *Cell*, 116(2), 205-19, (2004).

[89] Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J., "Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis", *Cell Death Differ*, 6(11), 1067-74, (1999).

[90] Kuribayashi, K., Mayes, P.A., El-Deiry, W.S., "What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria?", *Cancer Biol Ther*, 5(7), 763-5, (2006).

[91] Giam, M., Huang, D.C., Bouillet, P., "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death", *Oncogene*, 27 Suppl 1, S128-36, (2008).

[92] Adams, J.M.veCory, S., "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy", *Oncogene*, 26(9), 1324-37, (2007).

[93] Danial, N.N., "BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death", *Clin Cancer Res*, 13(24), 7254-63, (2007).

[94] Lomonosova, E.veChinnadurai, G., "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview", *Oncogene*, 27 Suppl 1, S2-19, (2008).

[95] Youle, R.J.veStrasser, A., "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 47-59, (2008).

[96] Dewson, G., et al., "To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions", *Mol Cell*, 30(3), 369-80, (2008).

[97] Bleicken, S., et al., "Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion", *J Biol Chem*, 285(9), 6636-47, (2010).

[98] Pistritto, G., Trisciuoglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G., "Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies", *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-19, (2016).

[99] Kuma, A.veMizushima, N., "Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism", *Semin Cell Dev Biol*, 21(7), 683-90, (2010).

[100] Deter, R.L.veDe Duve, C., "Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes", *J Cell Biol*, 33(2), 437-49, (1967).

[101] Yin, X.M., Ding, W.X., Gao, W., "Autophagy in the liver", *Hepatology*, 47(5), 1773-85, (2008).

[102] Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., "Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(7), 458-67, (2009).

[103] Levine, B.veKroemer, G., "Autophagy in the pathogenesis of disease", *Cell*, 132(1), 27-42, (2008).

[104] Klionsky, D.J., "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 931-7, (2007).

[105] Saftig, P., Beertsen, W., Eskelinen, E.L., "LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation", *Autophagy*, 4(4), 510-2, (2008).

[106] Axe, E.L., et al., "Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum", *J Cell Biol*, 182(4), 685-701, (2008).

[107] Simonsen, A.veTooze, S.A., "Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes", *J Cell Biol*, 186(6), 773-82, (2009).

[108] Mizushima, N., "Autophagy: process and function", *Genes Dev*, 21(22), 2861-73, (2007).

[109] Orvedahl, A., et al., "Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors", *Nature*, 480(7375), 113-7, (2011).

[110] Bjorkoy, G., et al., "p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death", *J Cell Biol*, 171(4), 603-14, (2005).

[111] Stolz, A., Ernst, A., Dikic, I., "Cargo recognition and trafficking in selective autophagy", *Nat Cell Biol*, 16(6), 495-501, (2014).

[112] Bellu, A.R.veKiel, J.A.K.W., "Selective degradation of peroxisomes in yeasts", *Microscopy Research and Technique*, 61(2), 161-170, (2003).

[113] Ravikumar, B.veRubinsztein, D.C., "Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins?", *Neuroreport*, 15(16), 2443-2445, (2004).

[114] Gomes, L.C.veDikic, I., "Autophagy in antimicrobial immunity", *Mol Cell*, 54(2), 224-33, (2014).

[115] Ryan, B.J., Hoek, S., Fon, E.A., Wade-Martins, R., "Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease", *Trends Biochem Sci*, 40(4), 200-10, (2015).

[116] Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., Dice, J.F., "A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins", *Science*, 246(4928), 382-5, (1989).

[117] Wu, M.Y., et al., "Selective autophagy: The new player in the fight against neurodegenerative diseases?", *Brain Res Bull*, 137, 79-90, (2018).

[118] Tracy, K.veMacleod, K.F., "Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3", *Autophagy*, 3(6), 616-619, (2007).

[119] Sabatini, D.M., "mTOR and cancer: insights into a complex relationship", *Nat Rev Cancer*, 6(9), 729-34, (2006).

[120] Shaw, R.J., "LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth", *Acta Physiol (Oxf)*, 196(1), 65-80, (2009).

[121] Guertin, D.A.veSabatini, D.M., "Defining the role of mTOR in cancer", *Cancer Cell*, 12(1), 9-22, (2007).

[122] Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., Klionsky, D.J., "Potential therapeutic applications of autophagy", *Nat Rev Drug Discov*, 6(4), 304-12, (2007).

[123] Semenza, G.L., "HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism", *Current opinion in genetics & development*, 20(1), 51-56, (2010).

[124] DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., Ellisen, L.W., "Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling", *Genes Dev*, 22(2), 239-51, (2008).

[125] Tracy, K., et al., "BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy", *Mol Cell Biol*, 27(17), 6229-42, (2007).

[126] Zhang, J.veNey, P.A., "Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy", *Cell Death Differ*, 16(7), 939-46, (2009).

[127] Schweers, R.L., et al., "NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49), 19500-5, (2007).

[128] Sandoval, H., et al., "Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells", *Nature*, 454(7201), 232-5, (2008).

[129] Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Gottlieb, R.A., "Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes", *J Biol Chem*, 281(40), 29776-87, (2006).

[130] Mammucari, C., et al., "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo", *Cell Metab*, 6(6), 458-71, (2007).

[131] Tracy, K.veMacleod, K.F., "Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3", *Autophagy*, 3(6), 616-9, (2007).

[132] Schwarten, M., et al., "Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy", *Autophagy*, 5(5), 690-8, (2009).

[133] Li, Y., et al., "Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb", *J Biol Chem*, 282(49), 35803-13, (2007).

[134] Liu, L., et al., "Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth", *Mol Cell*, 21(4), 521-31, (2006).

[135] Shewry, P.R., "Wheat", *J Exp Bot*, 60(6), 1537-53, (2009).

[136] Doust, A., "Architectural evolution and its implications for domestication in grasses", *Annals of botany*, 100(5), 941-950, (2007).

[137] Liu, H., et al., "Comprehensive Identification and Bread-Making Quality Evaluation of Common Wheat Somatic Variation Line AS208 on Glutenin Composition", *PloS one*, 11(1), e0146933-e0146933, (2016).

[138] Takele, A., lencho, A., Kassa, B., W/Ab, G., Hailu, E., "Estimated Yield Loss Assessment of Bread Wheat (Triticumaestivum L.) due to Septoria Leaf Blotch Septariatritici (Roberge in Desmaz) on Wheat in Holeta Agricultural Research Center, West Shewa, Ethiopia", *Research in Plant Sciences*, 3(3), 61-67, (2015).

[139] Godfray, H.C., et al., "Food security: the challenge of feeding 9 billion people", *Science*, 327(5967), 812-8, (2010).

[140] "Population change, resources and environment", *Bull Unesco Reg Off Educ Asia Pac*, (23), 269-88, (1982).

[141] Day, L., Augustin, M.A., Batey, I.L., Wrigley, C.W., "Wheat-gluten uses and industry needs", *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 82-90, (2006).

[142] Shewry, P.R.veHey, S.J., "The contribution of wheat to human diet and health", *Food and Energy Security*, 4(3), 178-202, (2015).

[143] Herrero, M., et al., "Farming and the geography of nutrient production for human use: a transdisciplinary analysis", *The Lancet Planetary Health*, 1(1), e33-e42, (2017).

[144] Hughes, N., et al., "μCT trait analysis reveals morphometric differences between domesticated temperate small grain cereals and their wild relatives", *The Plant Journal*, 0(ja)(2019).

[145] J. Dyer , C.veSylvester-Bradley, R., *Effects of nitrogen fertilizer on the grain yield and quality of winter oats*. Vol. 131. 1998. 395-407.

[146] Zhang, C.J., Chen, G.X., Gao, X.X., Chu, C.J., "Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties", *South African Journal of Botany*, 72(1), 15-23, (2006).

[147] Araus, J.L., Tapia, L., Azcon-Bieto, J., Caballero, A., *Photosynthesis, Nitrogen Levels, and Dry Matter Accumulation in Flag Wheat Leaves During Grain Filling*, in *Biological Control of Photosynthesis: Proceedings of a conference held at the 'Limburgs Universitair Centrum', Diepenbeek, Belgium, 26–30 August 1985*, R. Marcelle, H. Clijsters, and M. van Poucke, Editors. 1986, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 199-207.

[148] Aryavand, A., Ehdaie, B., Tran, B., Waines, J.G., "Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in Aegilops neglecta", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(2), 175-182, (2003).

[149] de Diego-Vico, N., Martín-Robles, N., Milla, R., "Shifts in stomatal traits following the domestication of plant species", *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3137-3146, (2013).

[150] Wang, J., et al., "Wheat and Rice Growth Stages and Fertilization Regimes Alter Soil Bacterial Community Structure, But Not Diversity", *Frontiers in microbiology*, 7, 1207-1207, (2016).

[151] Olmstead, A.L.veRhode, P.W., "Adapting North American wheat production to climatic challenges, 1839-2009", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 480-485, (2011).

[152] Theresa M Culley, R.b., "Plant Evolution and the Origin of Crop Species. Second Edition. By James F Hancock", 79(3), 311-311, (2004).

[153] Hoisington, D., et al., "Plant genetic resources: What can they contribute toward increased crop productivity?", 96(11), 5937-5943, (1999).

[154] Gill, B.S., et al., "A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium", *Genetics*, 168(2), 1087-1096, (2004).

[155] Prasad, M., *Wheat genome sequencing: A milestone in cereal genomics and its future potential*. Vol. 104. 2013.

[156] Brenchley, R., et al., "Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing", *Nature*, 491(7426), 705-710, (2012).

[157] Bonjean, A.P.veAngus, W.J., *The world wheat book: a history of wheat breeding*. 2001, Paris: Lavoisier Publishing. 1 + 1131 pp.

[158] Shewry, P.R., Halford, N.G., Belton, P.S., Tatham, A.S., "The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1418), 133-142, (2002).

[159] Thompson, L.U., "Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 34(5-6), 473-97, (1994).

[160] Farvid, M.S., Cho, E., Eliassen, A.H., Chen, W.Y., Willett, W.C., "Lifetime grain consumption and breast cancer risk", *Breast cancer research and treatment*, 159(2), 335-345, (2016).

[161] Kulkarni, S.D., et al., "Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (Triticum aestivum L.) as a function of growth under different conditions", *Phytother Res*, 20(3), 218-27, (2006).

[162] Ben-Arye, E., et al., "Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis: a randomized double-blind placebo-controlled trial", *Scand J Gastroenterol*, 37(4), 444-9, (2002).

[163] Marawaha, R.K., Bansal, D., Kaur, S., Trehan, A., "Wheat grass juice reduces transfusion requirement in patients with thalassemia major: a pilot study", *Indian Pediatr*, 41(7), 716-20, (2004).

[164] Lai, C.n., Dabney, B.J., Shaw, C.R., "Inhibition of in vitro metabolic activation of carcinogens by wheat sprout extracts", *Nutrition and Cancer*, 1(1), 27-30, (1978).

[165] Nenonen, M.T., Helve, T.A., Rauma, A.L., Hanninen, O.O., "Uncooked, lactobacilli-rich, vegan food and rheumatoid arthritis", *Br J Rheumatol*, 37(3), 274-81, (1998).

[166] Padalia, S., Drabu, S., Raheja, I., Gupta, A., Dhamija, M., "Multitude potential of wheatgrass juice (Green Blood): An overview", 1(2), 23-28, (2010).

[167] Das, A., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., "Effect of freeze drying and oven drying on antioxidant properties of fresh wheatgrass", *Int J Food Sci Nutr*, 63(6), 718-21, (2012).

[168] Lai, C.N., "Chlorophyll: The active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens in vitro", *Nutrition and Cancer*, 1(3), 19-21, (1979).

[169] Fernandes, C.J.veO'Donovan, D.J., "Natural antioxidant therapy for patients with hemolytic anemia", *Indian Pediatr*, 42(6), 618-20; author reply 620, (2005).

[170] Calzuola, I., Marsili, V., Gianfranceschi, G.L., "Synthesis of antioxidants in wheat sprouts", *J Agric Food Chem*, 52(16), 5201-6, (2004).

[171] Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review", *Ann Bot*, 91 Spec No, 179-94, (2003).

[172] Falcioni, G., et al., "Antioxidant Activity of Wheat Sprouts Extract In Vitro: Inhibition of DNA Oxidative Damage", *Journal of Food Science*, 67(8), 2918-2922, (2002).

[173] Shyam, R., et al., "Wheat grass supplementation decreases oxidative stress in healthy subjects: a comparative study with spirulina", *J Altern Complement Med*, 13(8), 789-91, (2007).

[174] Özgün, A., et al., *Medicine Science Effects of Apelin-13 on Human Prostate Cancer Lines [İnsan Prostat Kanseri Hücre Serilerinde Apelin-13'ün Etkileri]*. (2014).

[175] Ari, M., Karul, A., Sakarya, S., *Investigation of Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Effects of Oleuropein and Vitamin D on Breast Cancer Cell Lines (MCF-7)*. Vol. 2. 1534, (2018).

[176] Whittemore, A.S., et al., "Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada", *J Natl Cancer Inst*, 87(9), 652-61, (1995).

[177] Bangma, C.H., Kranse, R., Blijenberg, B.G., Schroder, F.H., "The value of screening tests in the detection of prostate cancer. Part II: Retrospective analysis of free/total prostate-specific analysis ratio, age-specific reference ranges, and PSA density", *Urology*, 46(6), 779-84, (1995).

[178] Türk, G., *Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler*. Vol. 2. 73-92. (2013).

[179] Tsuruo, T., et al., "Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal", *Cancer Sci*, 94(1), 15-21, (2003).

[180] Dıkmen, M., Öztürk, N., Ozturk, Y., Nar Meyve Kabuğu Ekstresinin Mcf-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Sitotoksik Ve İnhibitör Etkileri/Cytotoxıc And Inhıbıtory Effects Of Pomegranate Peel Extract On Prolıferatıon Of Mcf-7 Cells. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Vol. 37. 179-190. (2008).

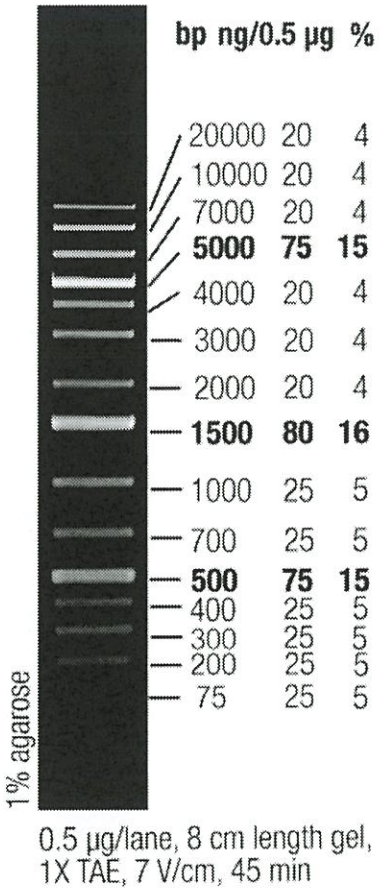
[181] Robles-Escajeda, E., et al., "Searching in mother nature for anti-cancer activity: anti-proliferative and pro-apoptotic effect elicited by green barley on leukemia/lymphoma cells", *PLoS One*, 8(9), e73508, (2013).

[182] Yigit, D., Yigit, N., Mavi, A., "Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (Prunus armeniaca L.) kernels", *Braz J Med Biol Res*, 42(4), 346-52, (2009).

EKLER

6. EKLER

EK A: DNA büyüklük belirteci



EK B: RNA büyüklük belirteci

