

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÜÇÜK ISIRGAN OTUNUN (URTICA URENS) PROSTAT
KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLSÜM TERZİOĞLU

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2014

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**KÜÇÜK ISIRGAN OTUNUN (URTICA URENS) PROSTAT
KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLSÜM TERZİOĞLU

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

GÜLSÜM TERZİOĞLU tarafından hazırlanan “**KÜÇÜK ISIRGAN OTUNUN (URTICA URENS) PROSTAT KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 22.08.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Üye

Doç. Dr. Şevki ARSLAN

Üye

Yard. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR

Üye

Yard. Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ
TÜMER



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
10.09/2014 tarih ve ...36/24.... sayılı kararıyla onaylanmıştır..



Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 11T515 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.



GÜLSÜM TERZİOĞLU

ÖZET

**KÜÇÜK ISIRGAN OTUNUN (*URTICA URENS*) PROSTAT KANSERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GÜLSÜM TERZİOĞLU
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)**

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2014

Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Dünyada ve de Türkiye de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif ve tamamlayıcı tedavileri de sıklıkla kullanmaktadırlar. Bunun sonucunda, günümüzde çoğunluğu bitkisel preparatlar olan alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artarak hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, fitokimyasal bileşenleri bilinmeyen ve ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Urtica urens* (küçük ısırgan otu) bitkisinin fitokimyasal bileşenleri tanımlanarak antikarsinojenik etki mekanizmaları moleküler düzeyde saptamaktır. Bu amaçla, *Urtica urens* bitkisinin yapraklarından değişik çözücüler kullanılarak hekzan ve etil asetat özütleri hazırlandı. Bu özütlerin GC/MS ve LC/MS analizleri hekzan özütünün doymamış yağ asidi bakımından ve etil asetat özütünün ise fenolik bileşiklerce zengin olduğunu göstermiştir. *Urtica urens*'ten elde edilen özütlerin insan prostat kanseri (LNCaP) hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri bu çalışmada incelenmiş olup elde edilen sonuçlara göre etkin doz değerleri hekzan ve etil asetat özütleri için sırasıyla 42,77 µg/ml ve 33,96 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar iki özütünde yüksek sitotoksik ve anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Ardından birçok farklı hücresel yolakla ilişkili 31 genin mRNA ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimler belirlenmiş ve içerdiği fenolik bileşenlerden dolayı etil asetat özütünün apoptozu ve tümör baskılayıcı genleri indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca tüm genom transkriptom analizi sonucunda etil asetat özütü uygulanan hücrelerde 34 farklı yolakta anlamlı değişimler tespit edilmiştir. Tüm bunların yanı sıra, hekzan özütünün topoizomera I ve II aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, ilaç metabolize edici enzimlerin transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu nükleer reseptörlerin mRNA seviyeleri etil asetat uygulaması sonucunda anlamlı bir şekilde artmıştır. Tüm bu sonuçlar, bu bitkinin değişik hücresel yolları değiştirerek antikarsinojenik ve sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, diğer ilaçların metabolizmasında değişikliklere yol açabileceği yine bu çalışma ile saptanmıştır. Bu çalışma ısırgan otu ile yapılacak olan diğer farmakolojik ve toksikolojik çalışmalara ipuçları sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELE: Prostat kanseri, *Urtica urens*, Küçük ısırgan otu, LNCaP hücre hattı

ABSTRACT

INVESTIGATING THE MOLECULAR MECHANISMS OF THE EFFECTS OF DWARF NETTLE (URTICA URENS) ON PROSTATE CANCER

MSC THESIS

GÜLSÜM TERZİOĞLU

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, AUGUST 2014

Despite recent advances in early diagnosis and treatment, cancer is still the first leading cause of death during the last 20 years. In addition to conventional treatments such as chemotherapy and radiation therapy alternative and complementary therapies are also frequently used among the cancer patients not only in Turkey but also all over the world. As a result, the popularity of herbal preparations as alternative and complementary therapies has been ever growing and they constitute great importance in terms of public health as well as economic value. The scope of this proposed research project is to determine the unknown phytochemical constituents of a widely used traditional therapeutic medicinal plant i.e. *Urtica urens* (small nettle) and is to investigate it's anticarcinogenic, and tumor suppressor effects at the molecular level. For this purpose, hexane and ethyl acetate extracts was prepared from the leaves of *Urtica urens* using different solvents. Analyses of these extract by GC/MS and LC/MS was showed that hexane extract is rich with unsaturated fatty acids and ethyl acetate extract is enriched with the phenolic compounds. The cytotoxic effect of extracts obtained from *Urtica urens* was determined in LNCaP cells by this study and the results was showed that the LD50 values of the hexane and ethyl acetate were found 42,77 µg/ml and 33,96 µg/ml respectively. This result was demonstrated that both extracts may have high cytotoxic and anti-carcinogenic activity. After that, changes that in mRNA and protein levels of 31 genes related with different cellular pathways was investigated and it was identified that ethyl acetate extracts induced apoptosis and tumor suppressor genes because of its phenolic compounds. Moreover, it was detected significant changes in 34 different cellular pathway as a result of whole genome transcriptome analysis of ethyl acetate extracts treated cells. Besides all, it was detected that hexane extracts inhibited activity of topoisomerase I and II enzymes. Moreover, the mRNA levels of nuclear receptors that are responsible for the drug transcriptional regulation of drug metabolizing enzymes was increased significantly by ethyl acetate treatment. All of these results reveled that this herb showed anticarcinogenic and cytotoxic activity by changing different cellular pathways. Moreover, it was determined that this herb may cause changes in the metabolism of other drugs was determined by this study. This study supplied new clues for other pharmacological and toxicological studies of urtica species.

KEYWORDS: Prostate cancer, *Urtica urens*, Small nettle, LNCaP cell line

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ	x
ÖNSÖZ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser.....	2
1.2 Prostat Kanseri	3
1.2.1 Prostatın Yapısı ve Doku İçi Etkileşimi	3
1.2.2 Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi	3
1.2.3 Prostat Kanseri Risk Faktörleri.....	4
1.2.4 Prostat Kanserinin Seyri	6
1.3 Antikarsinojenik Etki ve Fitokimyasallar.....	8
1.3.1 Programlı Hücre Ölüm Yolağı; Apoptoz.....	9
1.3.2 Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler	13
1.3.3 Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler	14
1.3.4 Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolakları.....	15
1.3.5 Topoizomerazlar	17
1.4 DeneySEL Materyal: <i>Urtica urens L.</i> (Küçük Isırgan Otu).....	21
1.5 Tezin Amacı	24
2. MATERYAL ve METOT	26
2.1 Materyal.....	26
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	26
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	27
2.1.3 Küçük Isırgan Otu (<i>Urtica urens L.</i>) Temini.....	27
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Primerler.....	28
2.1.5 Çalışmada Kullanılan Antikorlar	30
2.2 Metod.....	30
2.2.1 <i>Urtica urens</i> Özütlerinin Hazırlanması.....	30
2.2.2 GC-MS Analizi	32
2.2.3 LC-MS Analizi	33
2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	33
2.2.5 Total RNA İzolasyonu	36
2.2.6 cDNA Sentezi	37
2.2.7 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi	38
2.2.8 Protein Düzeyinde Ekspresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi	39
2.2.9 Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi	44
2.2.10 Tüm Genom Transkriptom Çalışmaları.....	45
2.2.11 İstatiksel Analizler	47
3. BULGULAR	48
3.1 <i>Urtica urens</i> 'te Özütleme	48
3.2 Hekzan Özütünün GC-MS Analizi.....	48
3.3 Kloroform ve Etil Asetat Özütlerinin LC-MS Analizi.....	50

3.4	Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	51
3.4.1	Tripan Mavi Boyamasıyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi	51
3.4.2	WST Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi	52
3.5	mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi.....	55
3.5.1	Apoptoz Yolağı İle İlişkili Genler	57
3.5.2	Hücre Döngüsünü Düzenleyici Genler	63
3.5.3	İlaç Regülasyonu İle İlişkili Genler	66
3.5.4	Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolaklarıyla İlişkili Genler	69
3.5.5	Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Genler	72
3.6	İmmünoBlot Analizi	77
3.6.1	SDS-PAGE Elektrophorezi	77
3.6.2	Western Blot Analizi	78
3.7	Topoizomera I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi.....	84
3.8	Transkriptom Analizleri	85
4.	TARTIŞMA	92
5.	SONUÇ	103
6.	KAYNAKLAR.....	104
7.	ÖZGEÇMİŞ	116

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1: Kanserleşmenin altı temel kuralı.....	2
Şekil 1. 2: ABD'de 2014 yılı kanser istatistiği.....	4
Şekil 1. 3: Prostat kanseri hücrelerinin AR-bağımlı ve AR-bağımsız proliferasyon eğrisi.....	6
Şekil 1. 4: Kanser tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı tedavi olarak kullanılan bitkilerin etkilediği hedef proteinler.....	9
Şekil 1. 5: Bcl-2 ailesi proteinlerinin yapısal domainleri	11
Şekil 1. 6: Kaspaz ailesinin CARD, DED ve büyük altbirim (p20) ve küçük katalitik altbirimi (p10) belirtilen üç ana grubu.	11
Şekil 1. 7: İç ve dış apoptoz yolları.	12
Şekil 1. 8: MAPK sinyal yollarının aktivasyonu.	16
Şekil 1. 9: PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve regülasyonu.	17
Şekil 1. 10: DNA topoizomeraz enziminin tipleri.	19
Şekil 1. 11: Tamamlayıcı ve alternatif tedavide kullanılan bitkilerin biyo-etki gösteren aktif fitokimyasalları.	20
Şekil 1. 12: <i>Urtica urens</i> L. Bitkisi.	21
Şekil 2. 1: <i>Urtica urens</i> bitkisinde artan polaritelerdeki çözücüler ile yapılan ekstraksiyon işlemleri.....	31
Şekil 2. 2: Hemositometre ile hücre sayımı.....	34
Şekil 2. 3: WST'nin formazana indirgenmesi.....	35
Şekil 3. 1: Hekzan ana özütünün GC kromatogramı.....	49
Şekil 3. 2: 25,00, 100,00, 250,00, 500,00, 1000,00 ve 2500,00 ng/ml salisilik asit standart çözeltileri kullanılarak, özütleme çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği.	50
Şekil 3. 3: Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre canlılığına etkisi...53	
Şekil 3. 4: LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu hekzan özütünün uygulanmasından 48 saat sonrasında invert faz kontrast mikroskopunda 20X büyütülerek çekilen görüntü.	54
Şekil 3. 5: LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu etil asetat özütünün uygulanmasından 48 saat sonrasında invert faz kontrast mikroskopunda 20X büyütülerek çekilen görüntü.	54
Şekil 3. 6: Standart kalibrasyon eğrisi.	55
Şekil 3. 7: B-aktin primeri ile yapılan qRT-RZR sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrisi.	55
Şekil 3. 8: B-aktin primeri ile yapılan qRT-RZR sonucunda elde edilen erime eğrisi.	56
Şekil 3. 9: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili APAF-1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	57

Şekil 3. 10: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili BAX ve BCL-2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..	58
Şekil 3. 11: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili CASP-3, -8 ve -9 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi...	59
Şekil 3. 12: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili FAS geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	60
Şekil 3. 13: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili PARP geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	61
Şekil 3. 14: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili TNF geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	62
Şekil 3. 15: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili TRAF2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	62
Şekil 3. 16: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CDK2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	63
Şekil 3. 17: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CDK4 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	64
Şekil 3. 18: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CDKN1A geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	65
Şekil 3. 19: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CyclinD1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	66
Şekil 3. 20: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CyclinD2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	66
Şekil 3. 21: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında İlaç regülasyonu ile ilişkili CAR geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	67
Şekil 3. 22: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında İlaç regülasyonu ile ilişkili NRF2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	68
Şekil 3. 23: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında İlaç regülasyonu ile ilişkili PXR geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	68
Şekil 3. 24: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında İlaç regülasyonu ile ilişkili RXR geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	69
Şekil 3. 25: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi	

sinyal yolaklarıyla ilişkili ERK2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi	70
Şekil 3. 26: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yolaklarıyla ilişkili JNK1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	71
Şekil 3. 27: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yolaklarıyla ilişkili P38 geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	71
Şekil 3. 28: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yolaklarıyla ilişkili AKT geninin mRNA seviyesine olan etkisi	72
Şekil 3. 29: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında onkogenik bir gen olan c-MYC geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	73
Şekil 3. 30: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında onkogenik bir gen olan HRAS ve KRAS genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi....	74
Şekil 3. 31: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında ABL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	74
Şekil 3. 32: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında E2F4 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	75
Şekil 3. 33: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN geninin mRNA seviyesine olan etkisi	76
Şekil 3. 34: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında tümör baskılayıcı bir gen olan P53 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.	76
Şekil 3. 35: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında tümör baskılayıcı bir gen olan RB geninin mRNA seviyesine olan etkisi..	77
Şekil 3. 36: LNCaP hücre hattında özüt uygulaması sonrasında elde edilen protein profilleri.	78
Şekil 3. 37: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında apoptotik proteinlerden Apaf-1, BCL-2, Caspase-8 ve FAS protein seviyelerine olan etkisi.....	79
Şekil 3. 38: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsünü düzenleyici CyclinD1, CDK2, CDK4 ve CDKN1A protein seviyelerine olan etkisi.	81
Şekil 3. 39: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yolağında görev alan JNK1 protein seviyesine olan etkisi.....	82

Şekil 3. 40: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında onkogenik ve tümör baskılayıcı ABL1, c-MYC, PTEN ve P53 protein seviyelerine olan etkisi.	83
Şekil 3. 41: Değişik konsantrasyonlardaki <i>Urtica urens</i> yapraklarından elde edilen hekzan özütünün Topoizomeraz I enzimine etkisi.	84
Şekil 3. 42: Değişik konsantrasyonlardaki <i>Urtica urens</i> yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün Topoizomeraz I enzimine etkisi	84
Şekil 3. 43: Değişik konsantrasyonlardaki <i>Urtica urens</i> yapraklarından elde edilen hekzan özütünün Topoizomeraz II enzimine etkisi.	85
Şekil 3. 44: Değişik konsantrasyonlardaki <i>Urtica urens</i> yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün Topoizomeraz II enzimine etkisi.	85
Şekil 3. 45: Correlation-average yaklaşımı kullanılarak oluşturulan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu.	86
Şekil 3. 46: Tüm genom transkriptom analizleri sonucunda LNCaP hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heatmap analizi.	87
Şekil 3. 47: Tüm genom transkriptom analizleri sonucunda LNCaP hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heatmap analizi.	88

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1: Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.	28
Tablo 2. 2: Çalışma kapsamında kullanılan antikor listesi.	30
Tablo 2. 3: GC-MS şartları.....	32
Tablo 2. 4: cDNA sentez karışımı ve prosedürü.	37
Tablo 2. 5: RIPA hazırlanışı.....	39
Tablo 2. 6: BCA solüsyonu.	40
Tablo 2. 7: Ayırıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması.....	42
Tablo 3. 1: <i>Urtica urens</i> yapraklarından elde edilen özütlerin verimleri.....	48
Tablo 3. 2: Hekzan ana özütünün GC-MS ile içerik analizi.	49
Tablo 3. 3: Kloroform ve etil asetat özütlerinin LC-MS ile içerik analizi.....	51
Tablo 3. 4: LNCaP hücre hattında hekzan özütü uygulamasından sonra tripan mavi boyamasıyla hücre sayımı.....	52
Tablo 3. 5: LNCaP hücre hattında etil asetat özütü uygulamasından sonra tripan mavi boyamasıyla hücre sayımı.....	52
Tablo 3. 6: LNCaP hücre hattında hekzan ve etil asetat için belirlenen etkin dozlar.....	53
Tablo 3. 7: Kontrol ve hekzan özütü uygulamasının filtrelenmiş örneklerinin FC analizi.....	89
Tablo 3. 8: Kontrol ve etil asetat özütü uygulamasının filtrelenmiş örneklerinin FC analizi.....	89
Tablo 3. 9: Kontrol ve etil asetat özütü uygulamasının filtrelenmiş örneklerinin FC analizinden elde edilen anlamlı problemlerle yapılan yolak analizi.....	90
Tablo 4. 1: Hekzan ve etil asetat uygulaması sonucunda 31 adet genin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.....	95

SEMBOL LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABL1	: Abelson mürin lösemi viral onkogen homolog 1
AGE	: Agaroze jel elektroforezi
AIF	: Apoptozis indükleyen faktör
Akt	: Protein kinaz B
ALP	: Alkalen fosfataz
ANXA1	: Aneksin A1
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APP	: Serebral vasküler amiloid peptid
APS	: Amonyum persülfat
AR	: Androjen reseptörü
ATCC	: Amerika tipi kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BAD	: Bcl-2 ilişkiliölüm organizatörü
BAX	: Bcl-2 ilişkili X protein
BCA	: Bikinkoninik asit solüsyonu
BCIP	: 5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat tuzu
BCL-2	: B-hücre lenfoma 2
Bç	: Baz çifti
BH	: Bcl-2 homoloji bölgeleri
BRCA	: Meme ve yumurtalık kanseri duyarlılık proteini
BSA	: Sığır serum albumin
CAR	: Konstitütif androstan reseptörü
CARD	: Kaspaz aktivasyon ve tanıma domaini
CASP-3	: Kaspaz-3
CASP-8	: Kaspaz-8
CASP-9	: Kaspaz-9
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKNI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CD44	: Ekstraselüler matriks reseptörü 3
c-MYC	: MYC protoonkogen proteini
CSE1L	: Hücresel apoptoz duyarlılık proteini
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	: Dulbecco modifiye eagle medyum
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EA	: Etil asetat
ED	: Etkin doz
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EPCAM	: Epitelyal hücre adezyon molekülü
ERK2	: Mitojen aktive protein kinaz 1
EtBr	: Etidyum bromür

E2F4	: Transkripsiyon faktörü E2F4
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini
FAS	: Tümör nekroz faktör reseptör ailesi üyesi 6
FasL	: Fas ligand
FBS	: Fetal sığır serumu
GC-MS	: Gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi
GO	: Gen ontolojisi
IAP	: Apoptoz inhibitör protein
IL8	: İnterlökin-8
IUPAC	: Uluslar arası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
JNK1	: Mitojen aktive protein kinaz 8
LAMP2	: Lizozom ilişkili membran glikoprotein 2
LC-MS	: Sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi
Lk	: DNA iplikleri için bağlanma sayısı
LNCaP	: İnsan prostat kanseri hücre hattı
kDNA	: Katene DNA
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	: Nitroimidazol mavi klorür
NCI	: Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü
NFkB	: Nükleer Faktör-kappa B
NRF2	: Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PIP3	: Fosfatidilinozitol 3, 4, 5-trifosfat
PDK	: PI3P bağımlı kinazlar
PMS	: Fenazin metosülfat
PSA	: Prostat spesifik antijen
PSMA3	: Proteazom alfa altbirim-3
PTEN	: Tümör baskılayıcı protein fosfataz ve tensin homolog
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PXR	: Pregnan X reseptörü
P38	: Mitojen aktive protein kinaz
P53	: Tümör baskılayıcı protein 53
qRT-PZR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu
RIPA	: Radyo-immünopresipitasyon deneyi
RB	: Retinoblastoma
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitü
RT	: Ters transkriptaz enzimi
RTKs	: Reseptör tirozin kinazlar
RXR	: Retinoid X reseptörü
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: SDS-poliakrilamid jel elektroforezi
Smac/DIABLO	: Sekonder mitokondri türevli kaspazlar/direkt apoptozis inhibitörünü bağlayıcı protein
SRGN	: Hematopoetik protoeglikan öz proteini

TAE	: Tris-asetik asit-EDTA tamponu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TFAM	: Mitokondriyeltranskripsiyon faktörü 1
TMEM126B	: Transmembran protein 126B
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TRAF2	: TNF reseptör bağlantılı faktör 2
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptör
UV	: Ultra viyole
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
ZAK	: Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz kinaz MLT
WST	: Suda çözülebilen tetrazolium tuzu



ÖNSÖZ

Hedeflenen bir yolda ilerlemek, yapılan çalışmaları ve kazanılan birikimleri üst üste koymak, tüm bunları başarmak önce zaman sonra sabır ve emek ister. Yalnızca başarmak için değil aynı zamanda bilimsel etiğe uygun hareket ederek bilime katkıda bulunmayı istemek ise büyük bir erdem ve fazilet ister.

Bunların farkına varmamı sağlayan ve tez çalışması süresince ilminden faydalanmama fırsat tanıyan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e ve ayrıca çalışmalarımın her anında desteğini esirgemeyip göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Şevki ARSLAN'a;

Tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasında ki katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Gülseren BAĞCI, Yard. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR ve Yard. Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER'e;

Tezime yaptığı değerli yorumları ve katılımından dolayı Türkiye Bilimler Akademisi Şeref üyesi sayın hocam Prof. Dr. Emel ARINÇ'a,

Tez çalışmasını 111T515 nolu proje ile maddi olarak desteklediği için TÜBİTAK'a,

Denizli'ye geldiğim günden bu yana hep yanımda olan, zor zamanlarımda samimiyetiyle yüzümü güldüren canım dostum Burcu KÖRDİKANLIOĞLU'na, çalışmalarım boyunca laboratuvarında dört duvar arasında çalışırken birlikte olmaktan mutluluk duyduğum Pelin ATMACA'ya, tezimin son zamanlarına denk gelmiş olsada yardımlarını esirgemeyen Buket KABALAY'a,

Hayatımda desteğini her an kalbimde hissettiğim gizli kahramanım Bilal KÜÇÜK'e,

Her zaman maddi ve manevi destekçim olan varlığıyla bana huzur veren bitanecik yengem Gülşen KARAKUŞ'a ve kocaman ailemin her bir bireyine,

Ve,

Bugüne kadar beni hiç yalnız bırakmayan, eğitim hayatım boyunca bana sürekli moral ve güç katan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, kendileriyle her zaman gurur duyduğum,

Canım annem Meryem TERZİOĞLU'na,
Bitanecik babam Mehmet TERZİOĞLU'na ve
Canım kardeşim Remzi TERZİOĞLU'na

Sonsuz teşekkürler ediyorum...

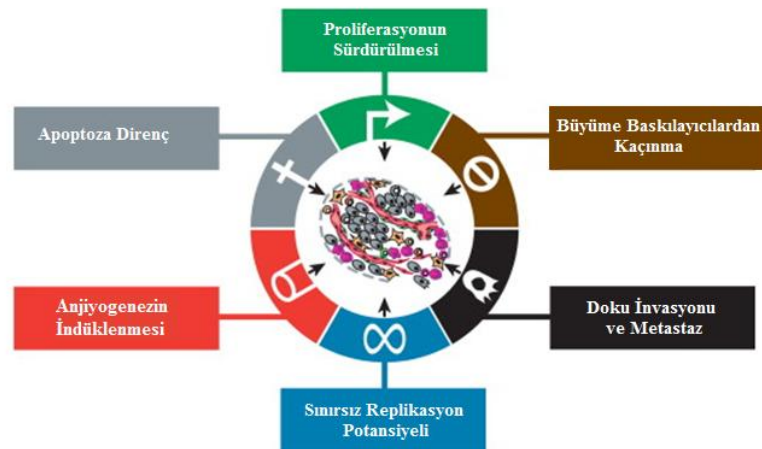
1. GİRİŞ

Günümüzde endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte çevreye her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Buna ek olarak, teknolojinin ilerlemesi ve tıp alanındaki gelişmelerle birlikte her gün yeni bir ilaç çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla üretilmektedir. Bunun sonucu olarak, dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Bunun sonucu olarak, insanlar da başta kanser olmak üzere birçok hastalık oluşturmaktadır. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Dünyada ki pek çok kanser hastası kimyasal ve ışınsal tedavi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif ve tamamlayıcı tedavileri de sıklıkla kullanmaktadırlar. Alternatif tedavilerin başında insan sağlığı üzerine olan etkileri asırlardır bilinen bitkisel tedavi gelmektedir. Son yıllarda teknoloji bakımından ileri seviyedeki toplumların bitkilerle ve de onlardan elde edilen özütlerle olan ilgisi de, kuşkusuz diyetle alınan sebze ve meyvelerin içerdiği fitokimyasallar hakkında yapılan bilimsel çalışmalar sayesinde artmıştır. Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde olduğu gibi ülkemizde de lokman hekimcilik, son yıllarda bilimsel çalışmaların alternatif tıp üzerine yoğunlaşması ile hız kazanmaktadır. Hatta, Türkiye dahil birçok Avrupa ülkesinde bitkisel kimyasallar ana kaynağından saflaştırılarak ya da çeşitli preparatlar halinde veya diyetel katkı maddeleri olarak pazarlanmaktadır ve pek çok hastalığın alternatif tıpla tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu bitkilerden bir tanesi küçük ısırgan otu olarak bilinen *Urtica urens*'dir. Isırgan otu Türkiye'de ve Dünyada insanlar arasında kullanımı yaygın olan bir bitkidir. Türkiye de yapılan birçok etnobotanik çalışmada, ısırgan otunun halk arasında kanser, böbrek rahatsızlığı, solunum yolları rahatsızlığı ve öksürük tedavisi, saç dökülmelerini önleme, nefes darlığı, felç, tansiyon, mide ağrısı, romatizma, idrar yolları hastalıkları, kemik erimesi, egzama, kadın hastalıkları, hipertansiyon, böbrek taşı düşürme ve hazmı kolaylaştırma gibi durumlarda sıklıkla kullanıldığını göstermektedir (Tuzlacı ve diğ. 2001, Koç 2002, Şimşek ve diğ. 2004, Gülçin ve Ezer 2004, Çalışkaner ve diğ. 2004). Kanser hastalarında sıklıkla kullanılan küçük ısırgan otunun anti-karsinojenik aktivitesi hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

1.1 Kanser

Kanser, onkogenlerin işlev kazanmaları, bazı tümör baskılayıcı genlerin işlev kayıpları, apoptoz yollarında görev alan genlerin ekspresyon düzeyindeki değişiklikler ve DNA hasarı onarım yollarındaki genetik değişiklikler sonucu oluşan ve gelişen bir hastalıktır. Mutasyonlar gibi genetik değişimlerin bazıları kalıtsal olarak var olup kansere yatkınlık yaratırken, bazıları da hücresel düzeyde dış etkilerle (UV, kimyasallar) gerçekleşerek hücrenin bölünme kapasitesini değiştirir ve neoplastik transformasyonu başlatabilir.

Hücrede meydana gelen genetik değişimlerin, kanserleşme sürecinde hücre davranışı üzerindeki etkisi bilinen altı farklı yolla gerçekleşir (Şekil 1.1). Bunlar; 1. Büyüme faktörü sinyallerinden bağımsız proliferasyon, 2. Büyüme engelleyici sinyallerden kaçış, 3. Apoptozdan kaçış, 4. Sınırsız çoğalma potansiyeli, 5. Anjiyogenez, 6. İnvazyon ve metastaz'dır. Bu etkiler, hücre metabolizmasında ve proliferasyonunda, işlev gösteren sinyal iletim yollarındaki değişiklikler ile olur. Sağlıklı hücrede, hücre döngüsü, oluşan DNA hasarı, tamir mekanizmaları tarafından onarılncaya kadar durdurulur ve eğer tamir edilemiyorsa da hücre apoptoza yönlendirilerek hasarlı hücrenin ortadan kalkması sağlanmış olur. Ancak, normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüşme sürecinde, DNA hasarı oluşumunun ardından, hücre döngüsü kontrol ve/veya DNA hasarı tamir mekanizmaları etkin olarak görev yapamadığı durumlarda, hasar tamir edilemeyebilir ve hücre apoptoza yönlendirilmeden hasarlı olarak proliferasyona devam edebilir (Bartek ve diğ. 1999).



Şekil 1. 1: Kanserleşmenin altı temel kuralı (Hanahan ve Weinberg 2011).

1.2 Prostat Kanseri

1.2.1 Prostatın Yapısı ve Doku İçi Etkileşimi

Rektumla mesane arasında bir salgı bezi olan prostatın görevinin seminal sıvının iletimiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Huang ve diğ. 2003). Normal bir yetişkin prostatı glandüler epitel ve bir de fibromüsküler stroma bölgesinden oluşmaktadır. Her iki bölmede de proliferasyon ve hücre ölümü dengeli bir seviyede gitmektedir. Prostatın anatomik olarak diğer sınıflandırması da 1980'ler de McNeal tarafından yapılmıştır. Buna göre bezin glandüler kısmı geniş bir periferel zondan ve küçük bir santral zondan oluşur. İkisi birlikte bezin %95'lik bir kısmını oluştururlar. Kalan kısım da geçiş zonu ve periüretral bezlerden oluşur. Birçok prostat kanseri periferel zondaki bezlerde başlar ve glandüler bir yapıya sahip olur (Schulz ve diğ. 2003). Ayrıca kanserlerin %95 gibi büyük bir oranı epitelyal hücreden kökenlenen adenokarsinomlardır (Huang ve diğ. 2003).

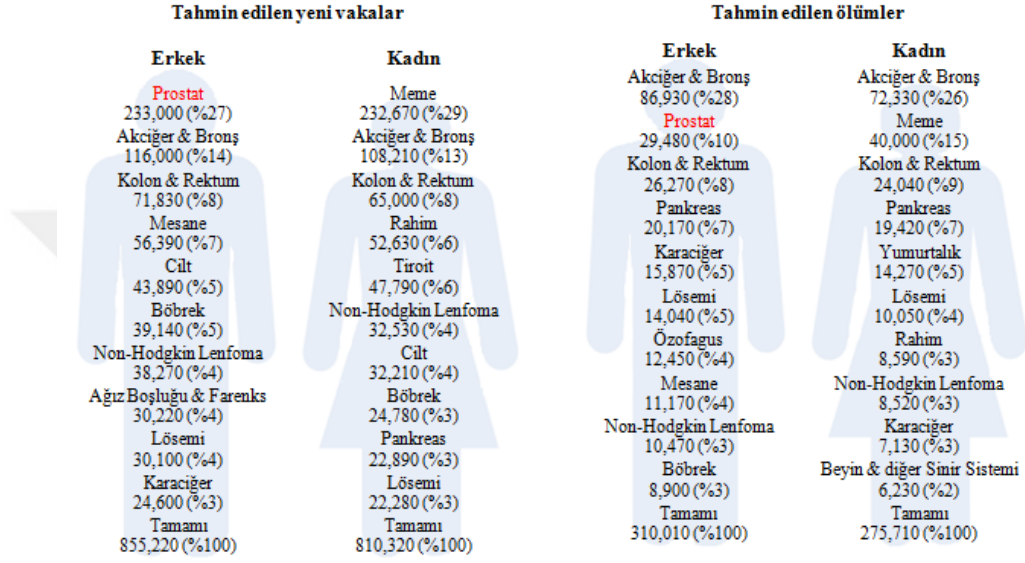
Erkek üreme sisteminin normal gelişimi mezenşimal-epitelyal hücre etkileşimine ve fetal androjenlere bağlıdır. Gelişen bir prostatta bezin morfolojik oluşumu ve epitel hücre büyümesinden, mezenşimden salgılanan parakrin büyüme faktörleri sorumludur. Bezin oluşması sırasında androjen reseptörü (AR) salgı hücre tabakasında gözlenir. Yetişkin bir prostatta ise androjenler stromal ve sekretuar epitelyum hücrelerinde etki gösterir (Schulz ve diğ. 2003).

1.2.2 Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin büyümesi olarak tanımlanır. Prostat kanseri, erkeklerde en sık tanı konulan ve artan insidansı ile beraber akciğerden sonra ikinci en sık ölümcül olan kanser tipidir (Jemal ve diğ. 2008). Prostat spesifik antijenin (PSA) prostat kanseri tanısında kullanılmaya başlamasından sonra prostat kanseri insidansında ciddi bir artış olmuştur (Makarov ve Carter 2006). PSA testinin yaygınlaşması ile lokal ve bölgesel hastalık insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 2014 yılı kanser

istatistiklerine göre tahmin edilen prostat kanseri olgusunun 233.000 kişi (tüm kanser olgularının %27'si) ve ölüm olgusunun ise 29,480 kişi (tüm kanser ölüm olgularının %10'u) olduğu rapor edilmiştir (Şekil 1.2). Ülkemizde ise sağlıklı bir istatistik sonucu bulunmamaktadır. Fakat Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı değerlendirmelere göre prostat kanseri görülme sıklığı 6-7. sıralarda yer almaktadır (Kaygusuz ve diğ. 2007).

Yeni Kanser Vakaları ve Ölüm-2014 Tahminleri



©2014, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

Şekil 1. 2: ABD'de 2014 yılı kanser istatistiği (American Cancer Society 2014).

Dünyada prostat kanser insidansının en yüksek olduğu ülke Jamaika (Glover ve diğ. 1998) iken en düşük olduğu ülke Çin'dir (Klassen ve Platz 2006). Yine bu insidans beyaz Amerikalılarda, Afrika kökenli Amerikalılardan daha az olarak bildirilmiştir (Jemal ve diğ. 2008). Prostat kanseri insidansı ülkeler ve etnik gruplar arasında büyük farklılık gösterir. İnsidanstaki bu büyük farklılıktan coğrafyanın, yaşam tarzının, diyet alışkanlığının, çevresel faktörlerin ve soyun sorumlu olduğu düşünülmektedir.

1.2.3 Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Yaş: Prostat kanserinin en belirgin özelliği yaşın en önemli risk faktörü oluşudur. Premalin neoplastik lezyonlar, 20'li yaşlarda da görülebilmekte ve 50'li yaşlarda yaygın olmasına rağmen, klinik olarak prostat kanseri teşhisi 60-70'li

yaşlarda konmaktadır. Ayrıca premalin lezyonların görülme sıklığı her 3 erkekten birinde olmasına karşın, karsinoma sıklığı 19 oranındadır. Bu da, morfolojik değişimlerin erken yaşlarda ve sıklıkla görülebildiği halde, invaziv karsinomların daha seyrek ve ileri yaşlarda görülmekte olduğunu göstermektedir (Abate-Shen ve Shen 2000, Bostwick ve diğ. 2004).

Çevresel faktörler ve diyet: Gelişmiş ülkelerde insidansın yüksek olması sebebiyle, diyet ve çevresel karsinojenik etkenlerin riski arttırdığı belirlenmiştir. Diyetle alınan fazla miktarda yağın, seks hormonlarının sentezini artırarak prostat bezinde kanser riskini arttırdığı hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotez sadece yağlar için değil aynı zamanda, yağda eriyen vitaminler (A, D, K) ve eser elementler (çinko) için de geçerlidir. Ayrıca yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur (Ahn ve diğ. 2007). Likopen, selenyum ve E vitamininin antioksidan etkileri sebebiyle kanserde potansiyel bir negatif faktör olduklarına dair çeşitli veriler mevcuttur (Di Mascio ve diğ. 1989).

Ailesel kalıtım: Prostat kanserlerinin %10'u ailesel faktörlerden kaynaklanır ve aslında ailesel faktörler hastalığın erken yaşta ortaya çıkmasıyla ilişkilidir (Abate-Shen ve Shen 2000, Nelson ve diğ. 2003, Bostwick ve diğ. 2004).

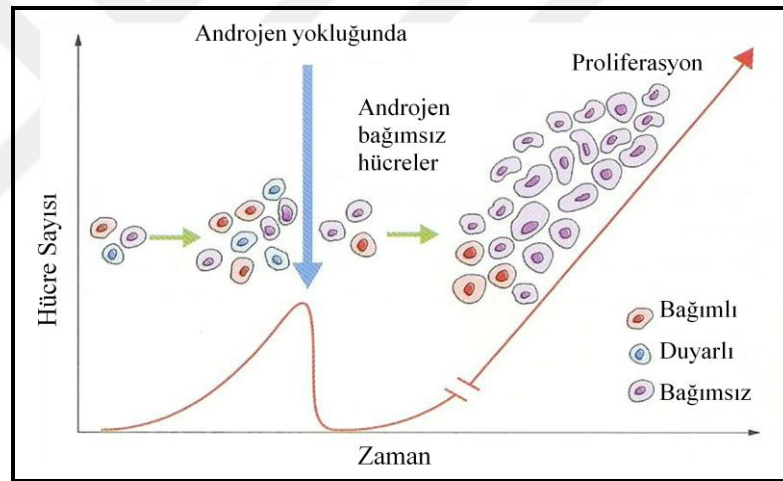
Steroid hormonların rolü: Steroid hormon reseptörleri, prostat karsinogenezinin tüm evreleriyle ilişkilidir. Ancak, yaşa bağlı olarak androjenlerin östrojenlere oranındaki düşüş, tümörün başlangıç aşaması için uyarıcı bir faktördür (Abate-Shen ve Shen 2000).

Irksal faktörler: Irksal faktörler arasında, yaşam tarzına bağlı olarak diyet ve çevresel koşullardaki değişkenler, hastalığın tanı oranındaki farklılıklar ve androjen reseptöründeki polimorfik varyasyonlar gibi genetik faktörler sayılabilir.

Diğer faktörler: Sigara tüketimi, enerji alımı, seksüel aktivite, evlilik durumu, sosyal faktörler (yaşam tarzı, sosyoekonomik durum, vs.) ve fiziksel aktivite ile prostat kanserinin insidansı arasında ilişki bulunmaktadır (Bostwick ve diğ. 2004).

1.2.4 Prostat Kanserinin Seyri

Prostat tümörleşmesinin patogeneğinde, androjenlerin seviyesi, fonksiyonları ve diğ er sinyal iletim yola ları ile olan etkileşimlerdeki değışimler yer almaktadır. Prostat adenokarsinomunun ilk evresi olan androjen-bağımlı prostat kanserinin tedavisinde androjenlerin inhibisyonu amacıyla, cerrahi kastrasyon ile anti-androjen (antagonistleri ve inhibitörleri) ilaç tedavisinde kullanılır. Ancak diğ er birçok kanser türünde görülen tümörün tekrarlaması durumu, prostat kanserinde hastalığın ikinci evresi olarak tanımlanır. Bu evrede tümör hücrelerinin proliferasyonu androjen uyarımından bağımsız gerçekleşir ve kastrasyon-dirençli prostat kanseri olarak adlandırılır (Şekil 1.3). Bu evredeki prostat tümörleri  oğ nlukla yüksek invaziv yetenektedir, metastatik tümör oluşumuna neden olurlar (Porkka ve Visakorpi 2004, Abate-Shen ve diğ. 2008).



Şekil 1. 3: Prostat kanseri hücrelerinin AR-bağımlı ve AR-bağımsız proliferasyon eğrisi.

Androjen aktivitesi, intraselüler androjen reseptörü (AR) ile kontrol edilir. AR, androjen hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarmak için testosterona bağılanır ve hem normal prostat büyümesini hem de prostat kanseri gelişimini düzenler. Androjenler, flutamid ve bikalutamid gibi androjen antagonisti farmasötik ajanlar ile inhibe edildiğı halde, androjen baskılama tedavisi ile androjen sinyalizasyonunu hedeflemek, metastatik prostat kanseri hastaları için en çok kullanılan tedavi sistemidir. Ancak kanserli hücrelerin  oğ , sonuçta androjen baskılama tedavisine dirençli hale gelir. Direnç gelişimi sürecinde, tümör hücrelerinin, proliferasyon yola larının kontrolü ve aktivasyonu için androjene bağımlılığı ortadan kalkar. Bu

değişimle prostat kanseri, yüksek derecede agresif metastatik ikinci evreye geçmiş olur (Nelson ve diğ. 2003, Abate-Shen ve diğ. 2008).

Prostat kanserinin ikinci evresi olarak tanımlanan kastrasyon dirençli aşamada, androjen baskılama tedavisinin başarısızlığının nedeni, androjen sinyalizasyonunun kaybı değil, genetik değişikliklerin AR sinyal yolağının olağan aktivasyonunu farklı yollardan değiştirmesidir (Nelson ve diğ. 2003, Abate-Shen ve diğ. 2008). Androjen bağımsızlığına geçişin beş mekanizması;

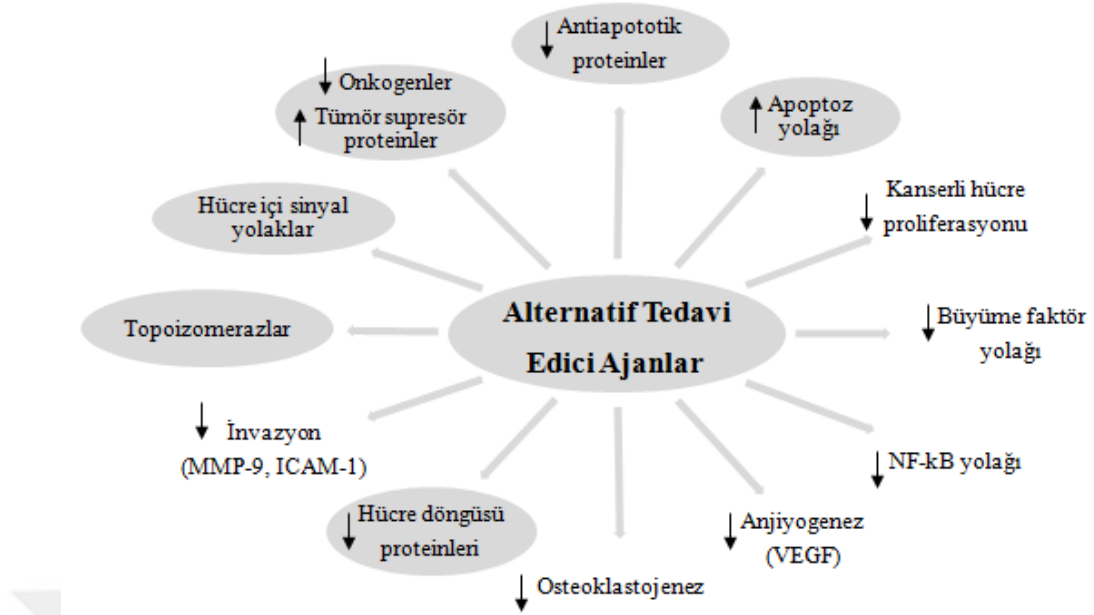
- 1. Aşırı duyarlılık yolağı:** Tümör hücresinin, androjenlere karşı duyarlılığının artması nedeniyle, çok düşük seviyedeki androjen varlığı dahi sinyal yolağının aktive olmasına neden olabilir. Androjenlere duyarlılığın artışı, androjen reseptörünün hormon bağlama bölgesindeki mutasyonlar veya AR ekspresyonunun düzenlenmesi mekanizmasındaki değişimler nedeniyle daha fazla androjen reseptörünün üretilmesidir.
- 2. Özgül olmayan AR yolağı:** Androjen reseptörünün ligand bağlama bölgesindeki mutasyonlar, androjen reseptörünün özgüllüğünü kaybetmesiyle sonuçlanabilir. AR, diğer steroidler ve steroid olmayan moleküllerle de etkileşerek aktivitesini sürdürür. Ayrıca anti-androjenlerle dahi aktive olabilir.
- 3. Kural dışı davranış yolağı:** Bu mekanizma, AR'ünün ligand bağımsız olarak fosforilasyonu ve aktivasyonuna dayanır. Peptit büyüme faktörleri ya da sitokinlerle ilgili düzenleyici yolaklardaki genlerin ekspresyonunda veya fonksiyonundaki değişimler, AR'nü anormal biçimde aktive edebilir. Örneğin, AR'ü aktive eden reseptör tirozin kinazlar (RTKs)'ın, protein kinaz B (Akt) ya da mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağını aktive etmesiyle fosforile olabilir.
- 4. Alternatif yolağı:** Prostat hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz dengesinin kontrolünde rol oynayan, PTEN inaktivasyonu, P53 mutasyonu ya da Bcl-2 aktivasyonu gibi androjen reseptöründen bağımsız yolaklar, androjen reseptörü veya ligand gerekliliğini ortadan kaldırabilir.

5. **Lurker hücre yolağı:** Genetik olarak heterojen bölgeler içeren prostat kanserinde, androjen baskılama tedavisinden önce var olan androjen-bağımsız hücrelerin (olasılıkla epitel kök hücreleri), tedavi sürecinde klonal seleksiyonu sonucu, tümör yapısının androjen bağımsız hale gelmesi ile sonuçlanır (Feldman ve Feldman 2001).

Bu dirençlilik, prostat kanserinin tedavisi için başka ilaç hedeflerine dikkat çekmiştir.

1.3 Antikarsinojenik Etki ve Fitokimyasallar

Dünyada ve de Türkiye’de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif ve tamamlayıcı tedavileri de sıklıkla kullanmaktadırlar. Kanserde alternatif tıp yöntemleri çoğunlukla geleneksel tıp uygulamalarını ret eden ve/veya ikinci planda tutan iyi klinik çalışmalar ile kanıtlanmamış, kanser tedavisinde başarılı olduğu iddiası ile hastalara sunulan yöntemlerdir. Günümüze değin biline gelen alternatif tıp yöntemlerinin (destek ve tedavi amaçlı) bilimsel yöntemler ile yapılan karşılaştırmalı klinik çalışmalar sonrası güvenli ve etkin bulunan, doğrudan kanser tedavisini hedeflemeden kanser ve kanser tedavilerinin yan etkilerini azaltmayı hedefleyen uygulamalar ise kanserde tamamlayıcı tıp yöntemlerini oluşturmaktadır. Dünyada kabul gören bu tür uygulamalar çoğunlukla kanserde destek tedavi uygulamaları ve yaşam kalitesini artırmaya yönelik uygulamalar ile sınırlıdır. Bunun sonucunda, günümüzde çoğunluğu bitkisel preparatlar veya bitkilerden elde edilen aktif bileşikler olan alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artarak hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca gelişen moleküler biyoloji teknikleri, kanser biyolojisi ve oluşum mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, birçok bitkisel ajanın hücre içi sinyal yollarındaki hedef proteinlerin ekspresyonlarını etkileyerek tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4: Kanser tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı tedavi olarak kullanılan bitkilerin etkilediği hedef proteinler. (Kutu içerisine alınanlar tez kapsamında çalışılan alanlardır.) (Aggarwal ve diğ. 2004'ten uyarlanmıştır.)

1.3.1 Programlı Hücre Ölüm Yolağı; Apoptoz

Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulacak bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Doku homeostazisi, apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır ve bu dengenin bozulması kanser başta olmak üzere birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (McPhie ve diğ. 2003). Artmış proliferasyon ve azalmış apoptoz karsinogeneze aracılık etmektedir (Kerr ve diğ. 1994, Ghobrial ve diğ. 2005). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır.

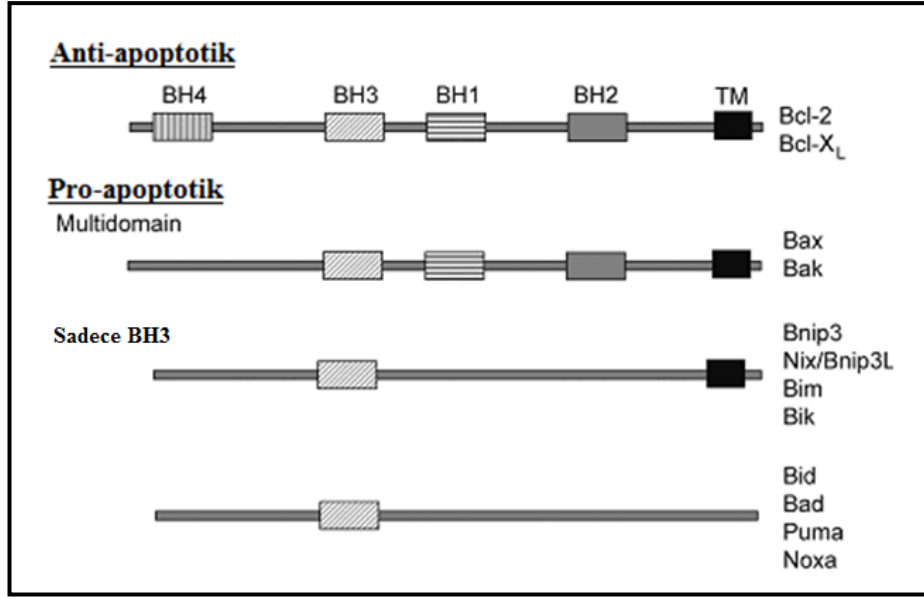
Apoptoz çeşitli hücre içi ve dışı sinyallerle uyarılabilir. Büyüme faktörlerinin yetersizliği, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış (hücre dışından fazla miktarda Ca^{++} iyonlarının girişi ya da endoplazmik retikulumdan Ca^{++} 'un sitoplazmaya salınması), tümör nekroz faktör (TNF), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle tümör baskılayıcı gen olan P53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler, hipertermi, radyasyon, hipoksik

koşullar, oksidatif stres ve toksinler apoptoz oluşumuna neden olabilirler (Elmore 2007). Apoptoz mekanizması, bu uyarılara ve de hücre tipine göre farklılıklar gösterebilmektedir (Mattson ve Chan 2003).

Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptoza gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Stratton ve diğ. 2009). Bundan dolayı, son yıllarda, anti tümör ilaç geliştirme araştırmalarında apoptozun indüklenmesi önemli bir strateji haline gelmiştir. Özellikle bitkilerden elde edilen aktif maddeler metastatik hücrelerde apoptoz tetikleyicisi olarak kullanılabilmektedir (Senderowicz 2004).

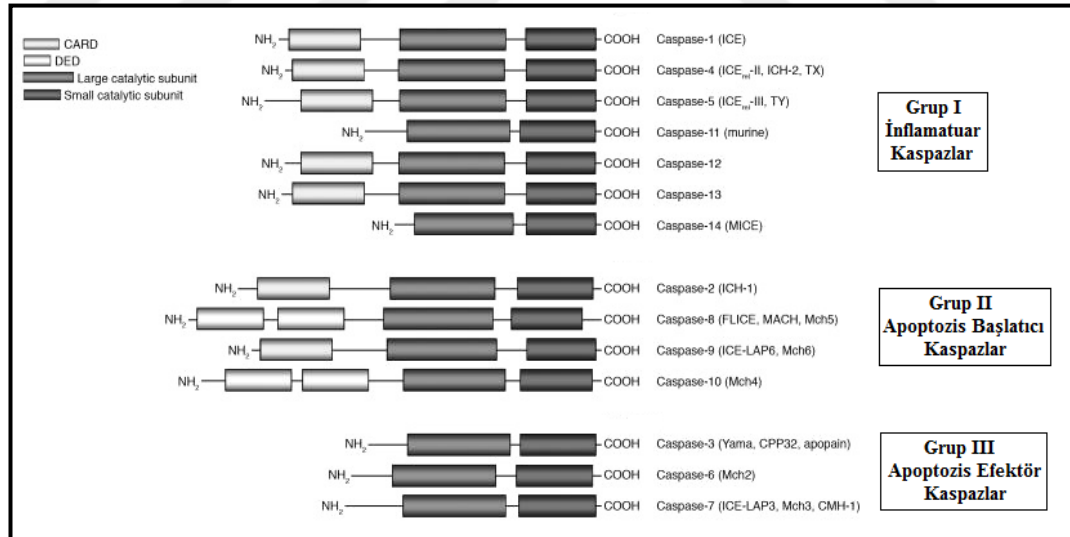
Apoptotik süreçte temel olarak iki protein ailesi önemli rol oynarlar. Bunlardan biri Bcl-2 ailesi diğeri ise kaspazlardır.

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptotik oluşumda büyük önem arz eden mitokondri membran bütünlüğü büyük ölçüde Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir (Garcia-Saez ve diğ. 2010, Gross ve diğ. 1999). Bcl-2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi vardır, hepsi en az bir Bcl-2 homoloji (BH) alanı içerir. Bu alan protein-protein etkileşimine aracılık eder. Aile üyelerinin çoğu ya üç ya da dört BH alanı paylaşır. Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptozu inhibe (anti-apoptotik) eder, diğeri ise teşvik (pro-apoptotik) eder (Şekil 1.5) (Chipuk ve diğ. 2010, Pradelli ve diğ. 2010, Wang ve Youle 2009). Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bunlar arasından da en çok apoptotik değere sahip olanı Bcl-2/Bax'dır. Bu ikisinin birbirine oranı, malignensilerde prognostik bir değer taşır (Nagata 1997). Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (Hagberg ve diğ. 2009, Del Poeto ve diğ. 2008, Xiao ve Zhang 2008).



Şekil 1. 5: Bcl-2 ailesi proteinlerinin yapısal domainleri (Gustafsson ve Gottlieb 2007).

Kaspaz Ailesi: Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan aktif merkezlerinde sisteinlerin yer aldığı proteazlardır. Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) olmak üzere üç gruba ayrılır (Şekil 1.6).

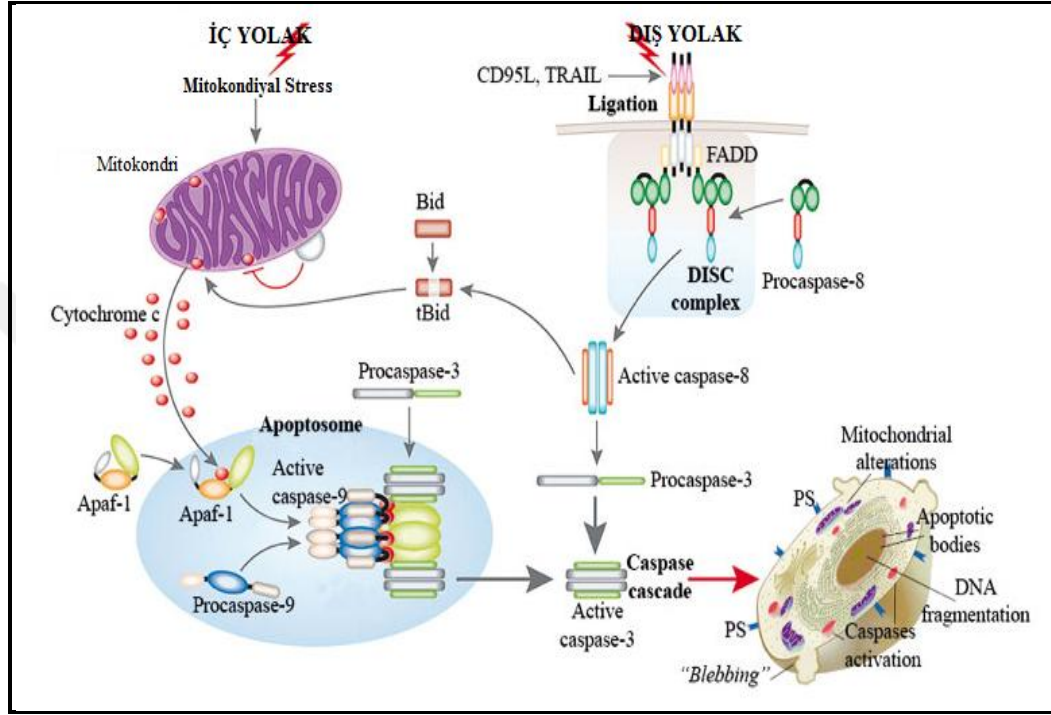


Şekil 1. 6: Kaspaz ailesinin CARD, DED ve büyük altbirim (p20) ve küçük katalitik altbirimi (p10) belirtilen üç ana grubu.

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP), nükleer membran proteini lamin A, DNA topoizomerez II gibi 100 kadar proteini parçalayarak

apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Lavrik ve diğ. 2005). Kaspazlar apoptoz dışında hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında da görevlidirler (Pop ve Salvesen 2009, Lamkamfil ve diğ. 2007).

Hücrede apoptoz, iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) yolak olmak üzere bilinen iki farklı yolla indüklenir (Şekil 1.7);



Şekil 1. 7: İç ve dış apoptoz yolları (<http://www.bioscience.org/2009>).

Hücre dışı yollarda, Fas ligand (FasL) ve tümör nekroz faktör (TNF) gibi sinyal proteinleri hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak apoptoza giden yolu uyarırlar. FasL bağlandıktan sonra, reseptör membranda trimerize olarak aktifleşir. Böylece reseptörün sitoplazmik kısmında yer alan bölgelerine prokaspaz-8 bağlanır. Prokaspaz-8'in kendi kendini kesmesi ile aktifleşen kaspaz-8, prokaspaz-3'ü keserek aktifleştirir ve böylece kaspaz kaskadı oluşturarak hücreyi apoptoza uğratar (Song ve diğ. 2006).

İç yolda ise apoptozis, radyasyon, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan P53'ün aktive olması gibi hücre içi uyarılar tarafından aktive edilir. Apoptozisin bu mekanizması mitokondriye bağımlıdır. Apoptotik hücre içi sinyalin alınmasından sonra Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri olan Bax ve Bad proteinleri mitokondri membranında oligomerize olarak, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini artırır. Böylece mitokondriden; sitokrom c, sekonder mitokondri türevli

kaspazlar/direkt apoptozis inhibitörünü bağlayıcı protein (Smac/DIABLO) ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi mediyatörler salınır. AIF, direkt olarak nükleusa gider ve buradaki endonükleaz G'yi aktive ederek DNA'da fragmentasyona neden olur. Smac/DIABLO, apoptozis inhibitör proteinine (IAP) bağlanarak kaspaz-9'un inaktive olmasını engeller. Sitokrom c'nin ise mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi, apoptotik süreçte geri dönülmez bir noktayı gösterir (Hockenberry ve diğ. 1990). Sitokrom c önce bir sitoplazma proteini olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e daha sonra ise prokaspaz-9'a bağlanarak beraberce apoptozom denilen kompleksi oluştururlar. Oluşan kompleks önce kaspaz-9'u daha sonra da efektör kaspazlar olan kaspaz-7, kaspaz-3 veya kaspaz-6'yı aktive ederek, Lamin B, PARP ve endonükleaz G enzimlerini parçalar ve onları aktifleştirir. Sonuçta kromatin kondensasyonu ve DNA'nın fragmanlara ayrılması meydana gelerek hücre apoptoza gider (Hengartner 2000).

1.3.2 Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler

G1, S, G2 ve M evrelerinden oluşan hücre döngüsünün bir evresinden diğerine geçişi, döngü basamağına göre düzeyleri değişen siklin, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKI) proteinleri tarafından kontrol edilir. CDK'lar kendi başlarına bulunduklarında inaktiftirler. Bu proteinler, sikline bağlandığında aktifleşerek aktif siklin-CDK komplekslerini oluştururlar. Bu kompleks hedef proteinleri fosforile ederek hücre döngünün devamlılığını sağlar (Alberts ve diğ. 2001). Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde 11 adet CDK ve 16 adet siklin rol oynamaktadır (Cabadak 2008). SiklinD ve CDK4 hücre döngüsünde S fazına geçişte görev olan kompleksi oluşturan iki proteindir. Siklin/CDK kompleksin aktivitesi CDK inhibitörleri (CDKI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinler Siklin/CDK kompleksi oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe eder. Etkiledikleri CDK ve inhibisyon mekanizmalarına göre iki farklı CDKI ailesi vardır. Cip/Kip ailesi p21, p27, p57 isimli proteinlerden oluşur ve tüm CDK'ları inhibe ederler. Diğer yandan INK4/ARF ailesi ise p15, p16, p18, p19 proteinlerinden oluşur ve CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder (Cabadak 2008). Tüm bu genlerin ekspresyonlarında ve proteinlerinin miktarlarındaki artış ve ya azalış birçok

kanser türünde sık rastlanan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Ekmekçi ve diğ. 2008).

1.3.3 Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

İnsan kanserlerine yol açan kimyasal ve virüsler gibi ajanların hedeflediği, tümör patogeneğinde yer alan veya bundan sorumlu olduğu düşünülen başlıca kanser genleri onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki genel kümede sınıflandırılırlar.

Onkogenler, hücrel proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde anahtar rol oynayan protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar veya gen ürünlerinin aşırı ifade edilmesi sonucunda aktive olurlar. 100'ün üzerinde tanımlanmış onkogen bulunmaktadır. Onkogenlerin kodladığı proteinler dört sınıf altında toplanır (Turner ve diğ. 2003);

1. Büyüme faktörleri (örneğin, sis onkogeni)
2. Büyüme faktörü reseptörleri (örneğin, erb B1 ve erb B2 onkogeni)
3. İntrasellüler sinyal iletiliciler (örneğin, ras onkogeni)
4. Nükleer transkripsiyon faktörleri (örneğin, myc, fos ve jun onkogenleri).

Bu dört değişik gruptaki proteinlerin aktivasyonu sonucunda kontrolsüz hücrel proliferasyon meydana gelir ve tümör oluşumu gözlenir.

Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler) ise kontrolsüz hücre proliferasyonunu önlemede yer alırlar. Bu genlerde mutasyonlar sonucunda meydana gelen fonksiyon kaybı tümör gelişimine sebep olabilir. Bu genlerden bazıları; Retinoblastoma (RB), P53, PTEN, BRCA-1 ve BRCA-2, Adenomatöz polipozis koli (APC), NF-1 ve NF-2 genleridir. Aktivasyonu fosforilasyonla düzenlenen RB proteininin defosforile formu E2F ailesi transkripsiyon faktörlerini bağlar ve hücre siklusunun G1'den S fazına geçmesine engel olur. Hücre büyüme faktörleri ile uyarıldığı zaman, SiklinD/CDK4/CDKN2A kompleksi pRB'u fosforile ederek inaktive eder ve hücre siklusunun S fazına geçmesini sağlar. İnsan kanserlerinin

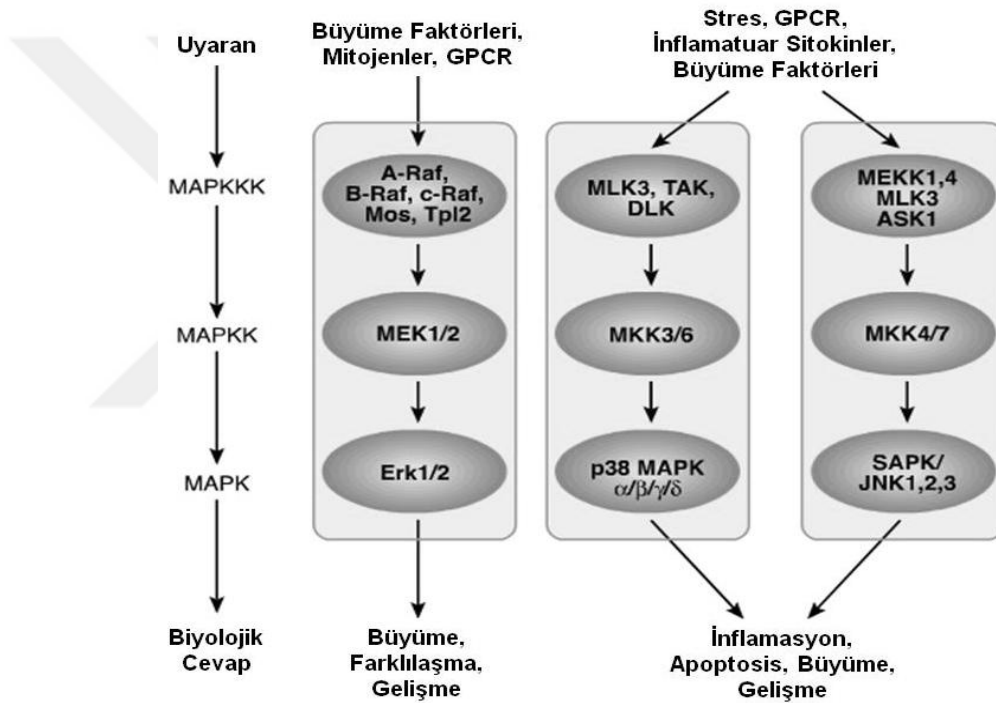
çoğunda hücre siklusu bu noktada düzenleyen düzenleyicilerin (SiklinD, CDK4, CDKN2A ve RB) en azından biri mutasyonludur (Zhuang ve diğ. 2010, Semczuk ve diğ. 2004). Diğer bir önemli tümör baskılayıcı gen olan P53, insan kanserlerinde en sık mutasyon gösteren genlerden biridir (Machado ve diğ. 2010). P53 geni 17. kromozom üzerinde bulunur ve 11 eksondan oluşur. DNA hasarı sonrası ekspresyonu artar ve DNA tamiri tamamlanana kadar hücrenin S fazına girmesini engeller. Bu durumda, hücrede p53 proteini, p21 proteininin yapımını stimule eder. P21, CDK2 ile birleşince siklin/CDK yolağını inhibe eder ve hücre bölünmede bir sonraki safhaya geçemez. Hücre siklusu durunca DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu artırır. Şayet hata giderilmez ise bu hücreleri apoptoza yönlendirerek yok edilmelerini sağlar. Ayrıca P53 proteini, kromozomların doğru olarak ayrılmasının gerçekleştirilmesi, genomik kararlılığın sağlanması, yaşlanma ve programlı hücre ölümünün gerçekleştirilmesi, DNA tamiri ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi hücre bölünmesi ve çoğalmasıyla ilişkili birçok hücreyel yolakta tetikleyici işlevi vardır (Haris 1996). P53, hücredeki bu işlevlerini doğrudan DNA ile bağlanarak veya hücredeki diğer proteinlerle etkileşerek gerçekleştirmektedir (Shiseki ve diğ. 2003, Zhang ve diğ. 2005). Bir başka tümör baskılayıcı gen olan fosfataz ve tenzin homologu (PTEN), hücrede normal şartlarda hücre büyüme ve sağ kalımı için gerekli olan Akt cevabının inhibisyonun düzenlenmesini sağlar (Jorge ve David 2008, Mayer ve Grummt 2006, Zhi ve diğ. 2008). PTEN, fosfotidilinozitol 3, 4, 5-trifosfat (PIP3)'ü defosforile eder ve PIP3'ün defosforilasyonu Akt/PKB sinyal yolağının inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Birçok çalışılan kanser hücre hattında PTEN ekspresyonunda azalma ile artan Akt/PKB aktivitesi hücre yaşamını, mitozu ve anjiyogenezi uyarır, apoptozu inhibe eder (Abate-Shen ve Shen 2000, Nelson ve diğ. 2003, Dong 2006).

1.3.4 Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolakları

Prostat kanserinde büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna bağlı olarak hücre içi sinyalizasyonu da artar. Proliferatif hücre içi sinyal yolakları olan mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), fosfotidil inozitol-3 kinaz (PI3K) ve nükleer faktör-kappaB (NFkB) tümör hücresinin çoğalmasında merkezi öneme sahiptirler. Bu yolaklar, büyüme faktörlerinin reseptörlerine

bağlanmasını takiben aktive olurlar ve DNA'ya direkt bağlanarak transkripsiyonu arttıran mediyatörlerin sentezine aracılık ederler.

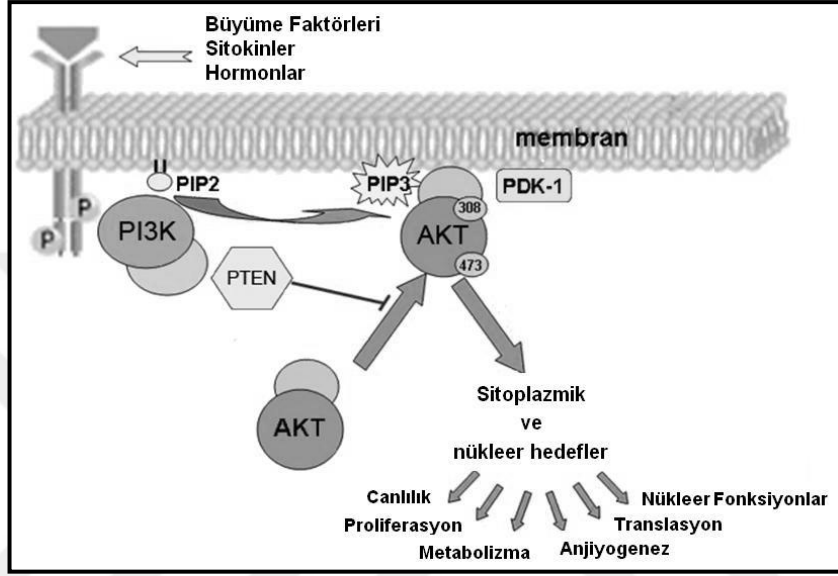
MAP kinaz yolu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPK kinaz kinazın (MAPKKK) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPK kinaz (MAPKK, MEK olarak da isimlendirilir) ve MAPK aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabını oluşturur (Şekil 1.8).



Şekil 1. 8: MAPK sinyal yollarının aktivasyonu (Cell Signaling'ten alınarak uyarlanmıştır).

Büyüme ve farklılaşma sinyallerinin iletiminden sorumlu olan bir başka mekanizma ise PI3K/Protein kinaz-B (PKB)/Akt yolağıdır. Reseptörün uyarılmasından sonra PI3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Oluşan fosfotidilinozitol trifosfat (PI3P), PI3P bağımlı kinazları (PDK) aktive ederek, PKB ve Akt üzerinden hücre canlılığını artıran buna karşılık hücre ölümünü azaltan proteinlerin aktivasyonuna neden olur (Şekil 1.9). Akt; tümör baskılayıcı gen olan P53 ile önemli pro-apoptotik proteinler olan Bad ve caspase-9'u inhibe ederek programlı hücre ölümünü baskılaması, ayrıca anti-

apoptotik olan Bcl-2'yi ve I κ B kinaz (IKK) üzerinden NF κ B yolağını aktive ederek hücre canlılığını arttırması nedeniyle kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına aracılık eder. PI3K/PKB/Akt sinyal yolağının en önemli inhibitörü olan PTEN, içerdiği fosfataz aktivitesi nedeniyle PI3K'yı defosforile ederek fosfotidilinozitol difosfat oluşunu sağlar, böylece PI3K'in, Akt üzerindeki aktivatör etkisi ortadan kalkmış olur.



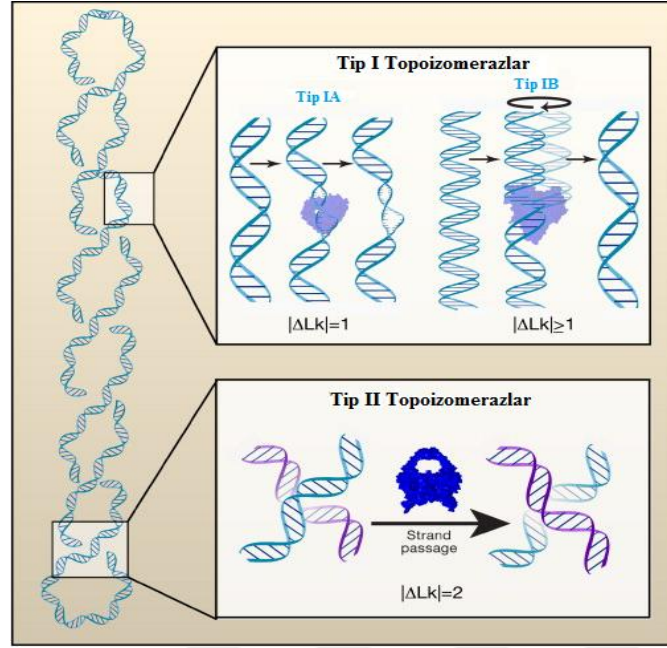
Şekil 1. 9: PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve regülasyonu.

1.3.5 Topoizomerazlar

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda, DNA replikasyon, transkripsiyon ve rekombinasyon işlemlerinde mutlak gerekli olan enzimlerdir. Hücre proliferasyonunda gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı olarak bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabilir (Pindur ve Lemster 1998) mantığı bu proteinleri antikanser ilaç hedefleri haline getirmiştir. Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, DNA'ya bağlanan ilaçların antitümör aktivitelerinin, onların DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe etme yeteneklerine bağlı olduğunu göstermiştir. Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, antitümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Potmesil ve Kohn 1991, Ralph ve diğ. 1994, Osheroff 2003).

DNA'nın topolojisinde katlanma mekanizması yalnızca DNA'nın paketlenmesine değil, aynı zamanda DNA üzerindeki bilginin işlenmesine de izin vermelidir. DNA'nın yapısal bir özelliği olan süper kıvrılma (supercoiling) DNA'nın daha sıkı halde paketlenmesinde rol alan bir mekanizmadır. DNA aksisinin kendisi üzerine herhangi bir eğilmesi olmadığı zamanki DNA'ya relaks DNA adı verilir. DNA ipliklerinin birbirlerinin üzerinden geçtiği sayı topolojik bir özelliktir ve bu sayı bağlanma sayısı (linking number, Lk) olarak tanımlanır ve DNA ipliklerinin biri veya ikisi birden kırılıp tekrar onarılmadıkça değişmez. Hücrenin replikasyon ve transkripsiyon gibi önemli yaşamsal fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için DNA sarmalının açılması ve üzerindeki bilginin gerekli enzimler tarafından okunması gerekmektedir. Fakat sarmal yapıda olan zincirin açılması sırasında açılan bölgenin her iki ucunda süpersarmallardan dolayı oluşan stres zincirin açılmasını engeller. DNA topoizomerazlar DNA sarmalının bir veya her iki zincirini keserek stresin azalmasını ve DNA üzerine oturması gereken diğer yapıların sağlıklı çalışmasını sağlarlar (Nitiss 1998, Wang 2002, Pommier ve diğ. 2010). Eğer DNA üzerinde oluşan stres topoizomerazlar tarafından giderilmezse transkripsiyon ve replikasyon sırasında DNA zincirinde oluşan stres D loop (DNA çift ipliğinin komplementer tek iplikli DNA segmenti ile eşleşmesi), R loop (RNA ile kalıp DNA ipliğinin eşleşmesi), guanozin dörtlü yapıları ve Z-DNA gibi anormal yapılar oluşturur, sonrasında ise oluşan çok fazla kromozomal kırık hücrenin ölümüne neden olur (Bjornsti ve Osheroff 1999, Pommier ve diğ. 2010).

Topoizomerazlar IUPAC adlandırma sisteminde tip I: EC5.99.1.2 (ω - protein, topoizomeraz I) ve tip II: EC5.99.1.3 (topoizomeraz II, giraz) olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Topoizomeraz enzimleri DNA'yı, tek iplikten (tip I) veya iki ipliğini de kırarak (tip II) etki gösterirler. Tip I DNA topoizomerazlar tek iplik kırıkları oluşturup ATP enerjisine ihtiyaç duymadan reaksiyonlarını gerçekleştirirken, tip II DNA topoizomerazlar ATP ihtiyacı duyan enzimlerdir (Şekil 1.8).

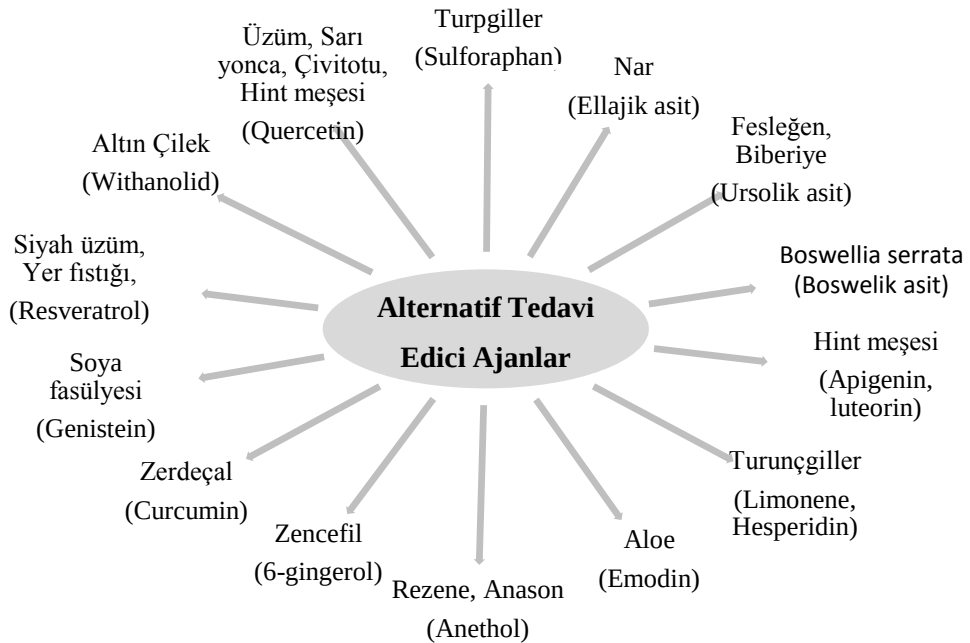


Şekil 1. 10: DNA topoizomeraz enziminin tipleri (Koster ve diğ. 2010).

Topoizomerazların metabolizmanın sürekliliğini sağlamadaki görevleri anlaşıldıkça sağlık alanındaki kullanılabilirliklerinin farkına varılmıştır. Kanser hücrelerinin gelişimde topoizomeraz enzimlerinin hücre içinde ifadesinin arttığı göz önüne alındığında, hücrelerin bölünmesinin durdurulması için de topoizomerazlar ilaç hedefi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle topoizomeraz enzimlerinin çalışmasını engelleyecek potansiyel kimyasalların araştırılması ve üretilmesi, hem yeni antibiyotiklerin üretimi için hem de kanser tedavisinde alternatif olarak kullanımları için kritik bir konudur (Lyu ve diğ. 2007, Rogojina ve Nitiss 2008, Capranica ve diğ. 2012).

Bitkilerde bulunan birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidler) kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan birçok genin, protein ve gen ekspresyon seviyelerini değiştirdikleri, bu sayede antikarsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir (Şekil 1.11). Örneğin, fitokimyasalların kullanılarak apoptoz indüklenmesi ve kanser hücrelerin yok edilmesi, kanser tedavisinde çok önemli ve umut vaat edici bir strateji haline gelmiştir. *Ginkgo*, *Echinacea*, sarımsak, zencefil gibi bitkilerden elde edilen ekstraktlar veya droglar, oral kavite, pankreas, akciğer, deri, tiroid ve göğüs kanser hücre hatlarında kaspaz-3'e bağımlı, JNK-c-Jun-FasL-kaspaz-3 sinyal yolağını aktive ederek, Bax/Bcl-2 oranını artırarak, p53 yolağını aktive ederek, mitokondrial yolak aktivasyonu ile (sitokrom c, Bax, Bcl-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3), TNF, nitrik oksit sentaz, nükleer faktor kappa B (NF-

kappaB) gibi proteinlerin seviyelerini değiştirerek apoptozu indükledikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Kang ve diğ. 2010, Oyagbem ve diğ. 2010, Shin ve diğ. 2010, Wang ve diğ. 2010, Kuang ve diğ. 2009, Zhang ve diğ. 2009). Örneğin, üzümünden izole edilen resveratrol antikarsinojenik etkisini COX-2, JNK, MEK, AP-1, NF-κB, p21 Cip1/WAF1, P53, Bax, Kaspazlar, survivin, siklin D1, siklin E, Bcl-2, Bcl-xL, cIAP, PKC, PKD, Kasein kinase II, VEGF, IL-1, IL-6, IL-8, AR, PSA, CYP1A1, Nrf2 gibi birçok proteinin seviyesini değiştirerek göstermektedir. Benzer şekilde, zerdaçaldan izole edile curcumin ve deoksicurcumin NF-κB, AP-1, Egr-1, STAT1, STAT3, STAT5, CBP, β-katenin, Nrf2, IKK, EGFR, Akt, JAK2, JNK, PKA, PKC, VCAM-1, Bcl-2, Bcl-XL, ICAM-1, TF, AR/ARP, P53, FTPaz, GST, siklin D1, 5-LOX, COX-2, I NOS, MMP-9, TNF, IL-6, IL-8, IL-12 kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan proteinleri miktarlarını ve aktivitelerini değiştirdiği ve bu sayede antikarsinojenik, antimutajenik, antioksidant etki gösterdiği bilinmektedir (Aggarwal ve diğ. 2006). Türkiye de tamamlayıcı ve alternatif tedavide hastaların en fazla kullandığı bitki olarak karşımıza çıkan ısırgan türlerinin yukarıda belirtilen antikarsinojenik etki mekanizmaları hakkında literatürde hiçbir bilgi yoktur. Bu çalışma ile *Urtica Urens*'in antikarsinojenik etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır.



Şekil 1. 11: Tamamlayıcı ve alternatif tedavide kullanılan bitkilerin biyo-etki gösteren aktif fitokimyasalları (Aggarwal ve diğ. 2006).

1.4 Deneyisel Materyal: *Urtica urens* L. (Küçük Isırgan Otu)

Isırgangiller (Urticaceae) familyası, her iki yarım kürenin tropik ve subtropik bölgelerinde yetişen, monoik veya dioik, çoğunlukla otsu bitkilerin bulunduğu bir gruptur. Urticaceae familyasının en belirgin özelliklerinden biri birçok türün yapraklarının batıcı tüylerle kaplı olmasıdır. Bu tüyler bazı türlerde teşhis edici özellik olarak kullanılmaktadır. Isırgan otu, Urticaceae familyasının *Urtica* cinsine ait, çok yıllık ve ya tek yıllık gelişim gösteren bitki türlerinin ortak adıdır. Dünyanın birçok yerinde yayılış göstermektedir. Genelde otsu habitata sahip olmakla birlikte çalı formunda olanları da mevcuttur. Ülkemizde, *U. membranacea*, *U. pilulifera*, *U. urens*, *U. dioica* ve *U. haussknechtii* olmak üzere 5 türü yaşamaktadır (Davis 1982).

Urtica urens L. (Küçük Isırgan Otu): Tek yıllık, monoik ve otsu bir bitkidir (Şekil 1.9). Boyu 10-60 cm arasında olabilir. Yaprakları, 2-4 cm uzunlukta, oval ya da eliptik şekillerde, açık yeşil renkli, saplı, dişli kenarlı, yakıcı ve tüylüdür. Ayrıca, yaprakları *U. dioica*'ya göre daha küçüktür. Çiçekler küçük, yeşil ve tek evcikliktir. Meyve kanarları tüylü merkezi tüysüzdür. Bursa-Uludağ, İzmir-Bornova, Mersin-Tarsus ve Çukurova da yayılış göstermektedir (Davis 1982). Bu bitkinin yaprakları da Ege Bölgesi'nde sebze olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999).



Şekil 1. 12: *Urtica urens* L. Bitkisi (<http://www.nyitottszemmel.hu/pages>).

Urtica dioica ve *Urtica urens*'in yaprak yüzeyinde bulunan yakıcı tüylerinde formik asit, histamin, serotonin ve kolin gibi bitkilere yakıcı özelliği veren kimyasallar bulunmaktadır (Emmelin ve Feldberg 1947, Barlow ve Dixon 1973, Andersen ve Wold 1978). *Urtica dioica*'nın yaprakları kafeik asit esterleri, özellikle

kafeik malik asit gibi fenolik asitler, flavonoidler, çeşitli vitamin (α -tokoferol ve C vitamini) ve mineraller (Se, Zn, Fe ve Mg), terpenler (mono- ve di-terpen diol ve terpen glikozitleri), tanenler, yağ asitleri, klorofil, aminoasitler ve steroller gibi maddelerce zengindirler (Hughes ve diğ. 1980, Booth ve Bradford 1963, Adamski ve Bieganska 1980, Chaurasia 1987, Schomaker ve diğ. 1995, Kraus ve Spiteller 1991, Anikina 1996, Ji ve diğ. 2007, Gravel ve diğ. 1994, Rzemyskowska and Ostrowska 1994, Salamon ve diğ. 2001). *Urtica dioica*'nın aksine, *Urtica urens* daha fazla diyet ile tüketilmesine rağmen detaylı bir içerik analizi yoktur. Ayrıca, bitkilerin gösterdiği farklı biyo-etkiler içerdikleri temel bileşiklerden ziyade azınlıkta olan ikincil bileşiklerden kaynaklığı bilinmektedir.

Isırgan otu taşıdığı maddelerin, farklı etki mekanizmaları bulunduğundan farklı biyolojik aktiviteler göstermektedir (Chrubasik ve diğ. 2007). *Urtica dioica*'dan elde edilen ekstraların içinde bulunan bileşikler bu bitkinin anti-inflamatuar etki göstermesine neden olmaktadır (Baeuerle ve Henkel 1994, Obertreis ve diğ. 1996). Isırgan otu kökünden izole edilen küçük molekül ağırlıklı lektin aglutinin HIV, soğuk algınlığı ve influenzaya sebep olan virüsleri baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca bu lektin, immün sistemi stimüle etmektedir (Balzarini ve diğ. 1992, Galelli ve diğ. 1995). Tüm bunların yanı sıra, çok sayıda çalışma, *Urtica* türlerinin antioksidan etkilerini gözler önüne sermektedir (Gülçin ve diğ. 2005, Gülçin ve Ezer 2004, Mavi ve diğ. 2004, Harput ve diğ. 2005). Fakat bu antioksidan etkinin moleküler mekanizması hakkında literatürde bir bilgi yoktur. Ayrıca bu bitkinin analjezik ve ağrı kesici (Yongna ve diğ. 2005), antimikrobiyal (Gülçin ve diğ. 2005, Uzun ve diğ. 2004), antibakteriyel (Aksu ve Kaya 2004), tansiyon düşürücü ve antidiyabetik (Newall ve diğ. 1996, Ziyat ve diğ. 1997, Bnouham ve diğ. 2003, Farzami ve diğ. 2003), kardiyovasküler (Testai ve diğ. 2002), diüretik (Tahri ve diğ. 2000) ve antiromatizmal (Riehemann ve diğ. 1999) etkilerini bildiren araştırmalar mevcuttur. Yapılan diğer bir çalışmada da *Urtica urens*'in karsinojen/prokarsinojen bileşiklerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P4501A izozimleri ile bazı Faz II enzimlerinin enzim aktiviteleri ile protein ve mRNA seviyelerini etkilediğini göstermiştir (Özkarlı ve diğ. 2008, Agus ve diğ. 2009).

Isırgan otunun birçok türü ülkemizde ve de dünyada halk hekimliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Türkiye de yapılan birçok etnobotanik çalışma,

ısırgan otunun halk arasında kanser, böbrek rahatsızlığı, solunum yolları rahatsızlığı ve öksürük tedavisi, saç dökülmelerini önleme, nefes darlığı, felç, tansiyon, mide ağrısı, romatizma, idrar yolları hastalıkları, mantar enfeksiyonları, kemik erimesi, egzama, kadın hastalıkları, hipertansiyon, böbrek taşı düşürme ve hazmı kolaylaştırma gibi durumlarda sıklıkla kullanıldığını göstermektedir: (Tuzlacı ve diğ. 2001, Koç 2002, Şimşek ve diğ. 2004, Gülçin ve Ezer 2004, Çalışkaner ve diğ. 2004).

Isırgan otu (genellikle *Urtica dioica* ve *Urtica urens*) kullanılarak hazırlanan birçok ürün tüm dünyada kullanılmaktadır. Isırgan otunun yaprak, gövde, tohum ve köklerinden hazırlanan preperatlar “Urtica plus, Urtica plus N, Urtiginex urtica, Nettle capsules, Nettle Liquid extract, Prostatin F, Prostatin N Liquidum, Prostatin N, Rheumex” gibi ticari isimlerde piyasada yerini almıştır. Bu ürünler, prostat problemleri, idrar yolları problemleri, romatizma, sindirim problemleri gibi birçok durumda doktor tavsiyesi olarak kullanılmaktadır (Kavalalı ve Randall 2003).

Türkiye’de erişkin ve pediatrik onkoloji hastalarıyla yapılan anket çalışmaları sonuçlarına göre ısırgan otu “Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi” olarak hastaların en fazla kullandığı bitki olarak karşımıza çıkmaktadır (Gözüm ve diğ. 2003, 2007). Kav ve diğ. (2008) tarafından hazırlanan literatür derlemesinde, 2001-2007 yılları arasında yayınlanmış 14 araştırma makalesi ile ulusal kongre kitaplarında sunulan 7 çalışma kullanılmış ve bu çalışmalarda toplam 5252 (5069 erişkin ve 183 çocuk) kanser hastasından veriler anket yöntemi ve/veya yüz yüze görüşme yöntemi ile toplanarak elde edilmiştir. Tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanım sıklığı %22,1 ve %84,1 arasında dağılım gösterdiği ve en sık kullanılan yöntemin bitki karışımları (en yaygın olarak “ısırgan otu”) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, 2006’da yapılan vaka sunumuna göre, yemek borusu kanserine sahip bir hastanın ısırgan otunu kaynatıp içmesi sonucunda hastalıktan kaynaklanan komplikasyonların azaldığı gözlenmiştir (Aydın ve diğ. 2006). Tüm bunlara rağmen, Türkiye ve dünyada insanların sıklıkla diyetleriyle beraber aldığı ve geleneksel tedavide yaygın olarak kullandığı *Urtica urens* bitkisinin kanseri önleyici etkisinin mekanizması hakkında literatürde bir bilgi yoktur. Bu sebeple ısırgan otunun kanser üzerindeki etkilerinin deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

1.5 Tezin Amacı

Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, son 20 yıldan beri kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Kanser oluşumunun en önemli sebeplerinden biri, insanların, endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan ve sürekli artan miktarlarda çeşitli toksik kimyasal maddelere maruz kalmalarıdır. Günümüzde birçok insan, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin en aza indirilmesi için bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak fitokimyasalları sıklıkla tüketmektedirler. Bu yüzden, son yıllarda bitkisel kaynaklı maddelerin antikanserojenik, antioksidatif ve antimutajenik etkiler gösterdiğini, karsinojenlerin metabolizmasında etken bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak bu tür maddelerin metabolizmasını değiştirdiğini bildiren birçok bilimsel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu fitokimyasalların çeşitli hastalıklardaki koruyucu ya da iyileştirici rollerinin veya zararlı etkilerinin tanımlanmasına yönelik bilimsel araştırmalar artan bir ilgi ile devam etmektedir. Örneğin, Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) başlattığı uluslararası işbirlikçi çalışmalarla bitkilerden kanser tedavisi için kullanılabilecek olası ilaç veya aktif bitki kimyasalları aramaya hali hazırda devam edilmektedir. Günümüzde bitkilerden izole edilmiş birçok aktif bitki kimyasalları dünyanın dört bir tarafında yaygın olarak kullanılmakta ve bazı kanser türlerinde ise umut kaynağı olarak görülmektedir

Ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan bitkilerden biri de ısırgan otudur (*Urtica urens* ve *Urtica dioica*). Kanser ilacı olarak kullanılabilecek fitokimyasallar içerme ihtimalinin yüksek olması ve insanlar tarafından yaygın olarak kullanılması, ısırgan otunu insan sağlığı açısından önemli yapmaktadır. Tüm bunlara rağmen, bu bitkinin kanseri önleyici etkisinin mekanizması hakkında literatürde bir bilgi yoktur. Bu çalışmada geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılan *Urtica urens* bitkisinin prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP'ta antikarsinojenik ve antioksidant etkilerinin ve etki mekanizmalarının saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, bu bitkinin yapraklarından ve tohumlarından elde edilecek ekstrenin fraksiyonlanması ve zenginleştirilmesi sonucunda elde edilecek bileşiklerin LNCaP hücre hattında;

1. Küçük ısırgan otundan elde edilen özütlerin LNCaP hücre hattındaki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi,
2. Antikarsinojenik etki mekanizmalarında rol oynayan hücre döngüsü düzenleyici genlerin (siklin 2, CDK4, p21 ve p16), onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin (RAS, c-MYC, pRb, P53, PTEN) gen ekspresyon ve protein düzeyleri (mRNA ve protein düzeyleri) tespit edilerek etki mekanizmalarının tanımlanması,
3. Apoptoz yollarında çalışan BCL-2, Bax, Kaspaz-3, -8 ve -9, Apaf-1, Fas, TNF gibi genlerin ekspresyon ve protein düzeyleri tespit edilerek etki mekanizmalarının tanımlanması,
4. Ayrıca antioksidatif olarak çalışan proteinlerin düzenlenmesinde rol oynayan Nrf-2 ve diğer genlerin (Akt/PKB ve MAPK yolları) değişimleri mRNA ve protein seviyesinde belirlenerek etki mekanizmalarının tanımlanması,
5. LNCaP hücre hattında, prokarsinojen/karsinojen metabolizmasında önem arz eden spesifik sitokrom P450 izozimlerinin düzenlenmesinde rol alan genlerin (Konstitütif androstan reseptörü (CAR), Pregnan X reseptörü (PXR) ve Retinoid X reseptörü (RXR)) ekspresyon ve protein düzeyleri üzerine etkileri belirlenerek, regülasyon mekanizmaları tanımlanmaya çalışılması,
6. İnsan tüm genom transkriptom çalışmaları ile bitkinin olası diğer etkilerinin gerçekleşmesinden sorumlu yollarda bulunan proteinlerin mRNA seviyesindeki değişimler belirlenerek etki mekanizmaları tanımlanması,
7. Çalışmaların ilerletilmesiyle beraber bitki içerisindeki aktif bileşenler ve maddelerin tanımlanması ve bu bileşiklerin "drog" olarak patent ile tescil edilebilme olasılığı yakalanması hedeflenmiştir.

Bütün bu verilerin ışığında alternatif tedavi amaçlı kullanılan küçük ısırgan otunun (*Urtica urens*); antikarsinojenik, antioksidant ve apoptotik etki mekanizmaları LNCaP hücre hattında aydınlatılmış olacaktır. Ayrıca, karsinojenlerin metabolik aktivasyonları ve diyet-ilaç, bakımından, bitkinin yararlı ve zararlı etkileri saptanmış olup, bu bitkinin halk sağlığı açısından daha doğru ve yararlı bir şekilde kullanımı için bilgi sağlanacaktır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Agaroz (Sigma, A9539); Akrilamid (Sigma, A8887); Amonyum persülfat (APS, Sigma, A3678); Asetik asit (Sigma, 27225); Bikinkoninik asit (BCA, Sigma, D8284); Bis-akrilamid (Sigma, 146072); Bromfenol mavisi (Sigma, B6131); Çinko klorür ($ZnCl_2$, Sigma, 31650); Dietanolamin (Merck, 8.03116); Dietilpirokarbonat (DEPC, Bio Basic; DB0154); Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, D2650); Etidyum bromür (EtBr, Bio Basic; D0197); Etil asetat (EA, Sigma, 27227); Etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma, 5134); Fenazin metosülfat (PMS, Sigma, P9625); Gliserol (Sigma, G2289); Glisin (Bio Basic, DR0235); Hekzan (Sigma, 208752); Hidroklorik asit (HCl, Sigma, 07102); Kloroform (Sigma, 24216); Magnezyum klorit ($MgCl_2$, Sigma, 63072); Metanol (Sigma, 24229); Nitroimidazol mavi klorür (NBT, Sigma, N6876); Nonidet P-40 (NP-40, BioShop, NON505); Polisorbat 20 (Tween-20, Sigma, P1379); Proteaz inhibitör tableti (Santa Cruz, sc29130); Protein ladder (Abm, G252); Potasyum sodyum tartarat (Rochelle tuzu, Sigma, S2377); Sığır serum albumini (BSA, Applichem, A1391); Sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, L4390); Sodyum deoksikolat (Sigma, D6750); Sodyum fosfat dibazik (Sigma, S9390); Sodyum fosfat monobazik (Riedel, 04269); Sodyum klorit ($NaCl$, Sigma, 13423); Tetrametiletildiamin (TEMED, Sigma, T8133); Tris (Bio Basic; DB0194); Triton X-100 (Bio Basic, DB0198); Yağsız süt tozu (Non-fat Dry Milk, Santa Cruz, sc2324); 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311); 2-Merkaptoetanol (2-ME, Merck, 8.05740); 2-Propanol (Sigma, 24137); 5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat tuzu, p-toluidin (BCIP, Sigma, B6149); 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM0323).

Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar: Dulbecco Modifiye Eagle Medyum (DMEM, Sigma, D5796); Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10270); L-glutamin

(Sigma, G7513); Penisilin (Sigma, P4333); Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640, Sigma, R8758); Tripsin-EDTA (Gibco, 25200).

Çalışmamızda kullanılan kitler: cDNA Sentez Kiti (Abm, G236); İnsan Topoizomeraz 2 α (TopoGen, TG2000H-1); Kilogreen qPCR Kiti (Abm, mastermix-KS); Rekombinant İnsan Topoizomeraz 1 (TopoGen, TG2005H-RC1); Trizol Reaktifi (İnvitrogen, 15596); WST Reaktifi (Boster, AR1158).

Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecede ve yüksek saflıkta olacak şekilde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Agaroz jel elektroforez aparatı (Thermo, EC320); CO2 inkübatörü (Nuaire, NU-5510E); Dikey elektroforez ünitesi (Thermo, Hoefer miniVE); Döner buharlaştırıcı (IKA, configurator RV10); Gerçek zamanlı PZR cihazı (Bioneer, Exicycler 96); Güç kaynağı (Thermo, EC250-90); Isı bloğu (Biosan, TDB-100); İnvrted mikroskop (Best scope, BS2090); Laminar flow kabini (ESCO, Class2 BSC); Liyofilizatör (Labconco, 7382020); Multiskan spektrofotometre (Thermo, 51119200); Nano spektrofotometre (Maestrogen, MN913); PZR cihazı (Bioneer, My Genie 96); Santrifüj (Sigma 1-15K ve Sigma 3-30K); Soxhlet ekstraktörü; Terazî (Precisa, XB 220A ve Mettler Toledo, PB 602-L); UV jel görüntüleme kabini (DNR, LB 0605, İsrail); Vakumlu etüv (Binder, VD23); -80°C buzdolabı (Nuaire, NU-6382E).

2.1.3 Küçük Isırgan Otu (*Urtica urens L.*) Temini

Çalışmamızda kullanılmış olan *Urtica urens*'in toprak üstü kısımları Aydın Kuyucak Gencelli Köyü'nde seraları olan Durmuş Yıldırım tarafından sağlanmıştır. Ayrıca toplanan bitkinin tanımlama ve adlandırılması Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Mehmet Çiçek tarafından yapılmıştır.

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmamızda kanser ile ilişkili genlerin deney grupları arasındaki ekspresyon farklarının karşılaştırılabilmesi için GenBank/EMBL veri bankaları taranarak insan için uygun primer dizileri saptandı. Sonrasında elde edilen dizilerin blastlaması NCBI/Primer-BLAST veri tabanı kullanılarak doğruluğu teyit edildi. Çalışmada kullanılmak üzere bu primer dizileri Metabolian International AG firmasına 0,2 µM skalada sentezlettirilip -20°C’de saklanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2. 1: Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.

Gen	İleri Primer ve Geri Primer (5'→3')
ABL1 (Abelson mürin lösemi viral onkogen homolog 1)	CCCAACCTTTTCGTTGCACTGT
	CGGCTCTCGGAGGAGACGTAGA
APAF1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1)	GTCTGCTGATGGTGCAAGGA
	GATGGCCCGTGTGGATTTC
AKT (Protein kinaz B)	CAACTTCTCTGTGGCGCAGTG
	GACAGGTGGAAGAACAGCTCG
B-actin (Beta aktin)	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC
	CTGCTTGCTGATCCACATCTG
BAX (Bcl-2 ilişkili X protein)	AGAGGATGATTGCCGCCGT
	CAACCACCCTGGTCTTGGATC
BCL-2 (B-hücreli lenfoma 2)	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC
	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC
CAR (Konstitütif androstan reseptörü)	GGCATATGGATTTCGCCAGAAGTTTG
	CGAGTCGACTTAAGCTTTATTGAAGGAGG
CASP3 (Kaspaz 3)	GCAGCAAACCTCAGGGAAAC
	TGTCGGCATACTGTTTCAGCA
CASP8 (Kaspaz 8)	TCTGGAGCATCTGCTGTCTG
	CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT
CASP9 (Kaspaz 9)	GGCTGTCTACGGCACAGATGGA
	CTGGCTCGGGTTACTGCCAG
CDK2 (Sikline bağımlı kinaz 2)	GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCAG
	AGCTCGGTACCACAGGGTCA
CDK4 (Sikline bağımlı kinaz 4)	ATGTTGTCCGGCTGATGGA
	CACCAGGGTTACCTTGATCTCC
CDKN1A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1)	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA
	GGCGTTTGAGTGGTAGAAATC

c-MYC (MYC proto-onkogen proteini)	TCCATGAGGAGACACCGCC
	GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT
CyclinD1 (Siklin D1)	CGCCCCACCCCTCCAG
	CCGCCCAGACCCTCAGACT
CyclinD2 (Siklin D2)	TTCCGCAGTGCTCCTACTTC
	CGCACTTCTGTTCTCACAG
ERK2 (Mitogen aktive edici protein kinaz 1)	CATCGCCGAAGCACCATTCAAG
	GATAAGCCAAGACGGGCTGGAG
E2F4 (Transkripsiyon faktörü E2F4)	CATCTGCTGTTTCTACACCTCCAC
	CTATTTGGACGTGAGGCTTCCT
FAS (Tümör nekroz faktör reseptör ailesi üyesi 6)	GACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTA
	CTGTTTCAGGATTTAAAGTTGGAGATT
HRAS (GTPaz Hras)	ACCCGGCAGGGAGTGGAGGAT
	CATCAGGAGGGTTCAGCTTCCGC
JNK1 (Mitogen aktive edici protein kinaz 8)	GCGCGGATCCTTGCTTGCCATCATGAGCAG
	GCGCGGATCCCAGACGACGATGATGATGGA
KRAS (GTPaz Kras)	CTCGACACAGCAGGTCAAGA
	GGCATCATCAACACCCTGTC
NRF2 (Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2)	ACACGGTCCACAGCTCATC
	TGTCAATCAAATCCATGTCCTG
PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz)	ACACCCCTTGACGTACTION
	GATGGGTTCTCTGAGCTTCG
PTEN (Fosfataz ve tensin homolog)	CCCAGACATGACAGCCATC
	TCTGCAGGAAATCCCATAGC
PXR (Pregnan X reseptörü)	AGACTGGAACCTGGGAGT
	GGGAGAAGAGGGAGATGG
P38 (Mitojen aktive protein kinaz)	GTTGGAACCCAGGGGCTGA
	GGCATGTGCAAGGGCTTGGG
P53 (Tümör protein p53)	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT
	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC
RB (Retinoblastoma protein)	ATCTATATTTACCCCTGAAGAGTC
	TTCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA
RXR (Retinoid X reseptörü)	TTCGCTAAGCTCTTGCTC
	ATAAGGAAGGTGTCAATGGG
TNF (Tümör nekroz faktörü)	CGCCACCACGCTCTTCTG
	GCCATTGGCCAGGAGGGC
TRAF2 (TNF reseptör-bağılantılı faktör 2)	CTAGGAATGCTCCCTTCTCTCCAG
	ACCAGCCAGTCCTCAGATTTTCTCAGA

2.1.5 Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Çalışma kapsamında kullanılan antikorlar western blot analizine uygun olacak şekilde çeşitli firmalardan temin edilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2. 2: Çalışma kapsamında kullanılan antikor listesi.

Antikor Listesi	
B-aktin (Bioss, bs-0004)	c-MYC (Abcam, ab32072)
ABL1 (Abm, bs-1061R)	CyclinD1 (Abm, Y058242)
APAF-1 (Boster, PA1249)	ERK2 (Bioss, bs-1645R)
BCL-2 (Abcam, ab117115)	FAS (Abcam, ab15285)
CAR (Abcam, ab186869)	JNK (Abm, Y011504)
CASP-8 (Abcam,ab39731)	PTEN (Millipore, 07-1372)
CDKN1A (Santa Cruz, sc-817)	P38 (Abcam, ab47363)
CDK2 (Abm, Y058204)	P53 (Santa Cruz, sc-55476)
CDK4 (Boster, MA1020)	RB (Abm, Y011130)
Anti-Goat-ALP (Sigma, A-4187)	
Anti-Mouse-ALP (Sigma, A3562)	
Anti-Rabbit-ALP (Sigma, A-3687)	

2.2 Metod

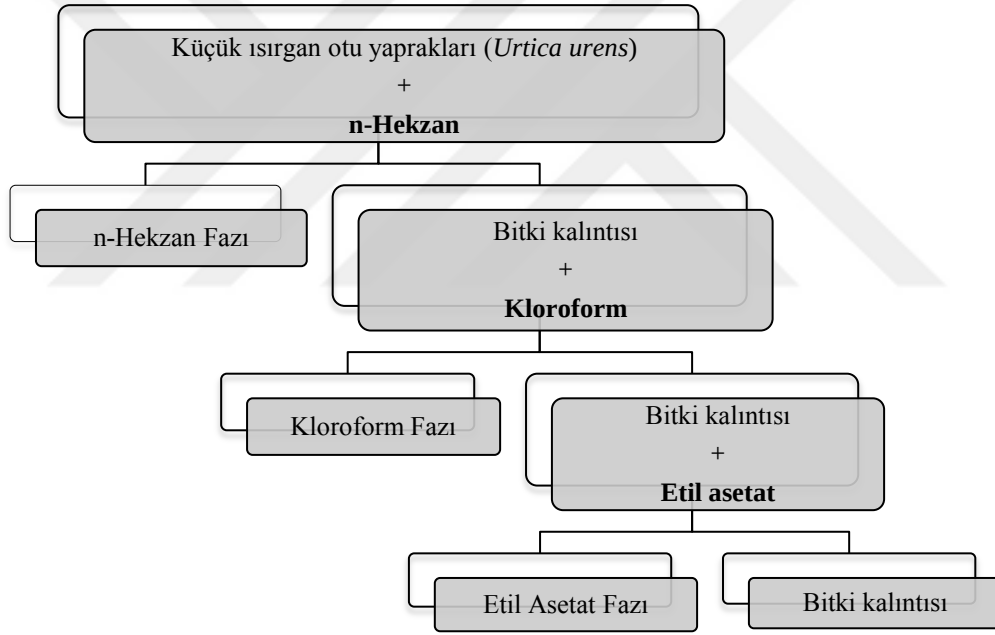
2.2.1 *Urtica urens* Özütlerinin Hazırlanması

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)’nun yaprakları köklerden ve ana gövdesinden ayıklanarak makro kirlilikten uzaklaştırılması için önce çeşme suyu ile daha sonra da ultra saf su ile yıkanmıştır. Ardından yapraklar kuruyana kadar gölgede bekletilmiş ve ışık almayan serin dolaplarda muhafaza edilmiştir.

Kurutulan küçük ısırgan otu yaprakları el yardımı ile küçük parçalara ayrılmış ve bitkisel materyalde ekstraksiyon çalışmalarına başlamadan önce vakumlu etüv kullanılarak nem tayini yapılmıştır.

Çalışmalarımızın devamında Franz von Soxhlet tarafından icat edilen soxhlet metodu ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Soxhlet metodu bir katının sıcak

çözücü ile ekstraksiyonunda kullanılır. Ekstraksiyon boyunca balonda kaynayan çözücünden gelen buhar cam tüp içerisinde yükselmeye başlar. Yükselen buhar ekstraksiyon çemberine girer ve su ile soğutulmuş kondensatör tarafından yoğuşturulur. Yoğuşturulan çözücü ekstraksiyon çemberini doldurur ve çemberdeki kağıt ekstraksiyon yüksüğü içindeki maddenin yağını çözer. Çemberin altına bağlı olan sifon tüp de çözücüyle dolar. Çözücü seviyesi çember içerisinde yükseldikçe, sifon otomatik olarak çözücüü ve ekstrakte edilmiş olan yağı aşağıda bulunan balona geri akıtmaya başlar. Soxhlet cihazı ile küçük ısırgan otunun hekzan, kloroform ve etil asetat çözücülerıyla ekstraksiyonları yapılarak özütler elde edilmiştir (Şekil 2.1). Bunun için kurutularak ufalanmış yaklaşık 200 gram ısırgan otu yaprakları soxhlet aparatına yüklendi ve sonrasında da çözücüler sırasıyla 10-15 sifon olacak şekilde bitki kalıntısı üzerinden geçirilerek özütler elde edilmiştir.



Şekil 2. 1: *Urtica urens* bitkisinde artan polaritelerdeki çözücüler ile yapılan ekstraksiyon işlemleri.

Soxhlet cihazı ile ekstraksiyon sonrasında elde edilen farklı çözücülere ait fazların döner buharlaştırıcı kullanılarak çözücülerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından Şekil 2.1'deki akış şeması izlenilerek *Urtica urens* bitkisinden elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin çalışmalarımızın devamında kullanılmak üzere miktar ve tarihlerini belirten etiketleme yapıldıktan sonra azot gazından geçirilerek uygun koşullarda saklanması sağlanmıştır.

2.2.2 GC-MS Analizi

Gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi (GC-MS), iki güçlü analitik tekniğin sinerjik kombinasyonudur. Gaz kromatografisi, karışımdaki bileşenleri ayırır. Kütle spektroskopisi, her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasında yardımcı olur. Çok düşük miktarlardaki örneklerin tanımlanması, güçlü yapısal analiz, hızlı analiz süresi gibi önemli avantajları bulunmaktadır.

GS-MS analizleri Agilent 7890A GC'ye bağlı 5975C İnert Mass Selektif Dedektörden oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Hekzan özütü (yaklaşık 0,1g) 5 ml hekzanda çözüldü. Bu çözeltiden 1 ml alınıp üzerine 4 ml hekzan ve 5 ml 1 M potasyum hidroksit (MeOH'de çözünmüş) çözeltisi ilave edilerek şiddetli şekilde 30 saniye vortekslenerek esterleştirme işlemi yapıldı. Oluşan üst fazdan (hekzan) 1 ml alındı ve 0,45 µm'lik filtreden şırınga yardımıyla süzülerek GC-MS cihazına yüklendi. GC-MS şartları Tablo 2.3'te verilmektedir.

Tablo 2. 3: GC-MS şartları;

Başlangıç	Hız (°C/dk)	Değer	Tutulma süresi (dk)	Gelme süresi (dk)
Ramp1		120	8	8
Ramp2	8	150	2	13,75
Ramp3	8	200	10	30
Ramp4	8	250	35	71,25

Esterleştirilen hekzan özütü DB-WAXETR MS kapillar kolondan geçirilmiştir (60 m x 320 µm x 0,25 µm). Taşıyıcı gaz olarak Helyum gazı kullanılmıştır. Akış hızı olarak 1ml/dakika olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 120 °C olup, 20 dakikada 250 °C'ye ulaşması sağlanmış ve bu değerde sabit tutulmuştur. Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada bileşenlerin karakterizasyonu için dbwax, Wiley7, Nist05, Nist02 kütüphaneleri kullanılarak çıkan spektrumların otomatik taranması ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.3 LC-MS Analizi

Sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi (LC-MS), tekniğinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir.

Küçük ısırgan otundan elde edilen kloroform ve etil asetat özütlerinin LC-MS analiz çalışmaları yapıldı. LC-MS analizleri Agilent 1260 infinity LC (Agilent technologies)'ye bağlı 6210 TOF-MS (Agilent technologies) oluşan LC/MS kullanılarak yapılmıştır. Ham özütler 1000 ppm derişiminde hazırlandı. Bu örneklerden 100 µl alınarak 1000 µl'ye seyreltildi ve 0,45 µm'lik filtreden şırınga yardımıyla viale süzülerek LC-MS cihazına verildi. Özütler ZORBAX SB-C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm) kolondan geçirilmiştir ve akış hızı olarak 0,6 µl/dk belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 350 °C'de tutulmuştur. Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır.

2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.4.1 LNCaP Hücre Hattı

Çalışmamızda kullanılan insan prostat kanseri hücre hattı (LNCaP) American Type Culture Collection (ATCC, CRL1740)'dan satın alınmıştır. LNCaP hücre hattı androjen-bağımlı epitelyum kökenli prostat kanseri hücresidir.

2.2.4.2 Hücre Kültürünün Kurulması

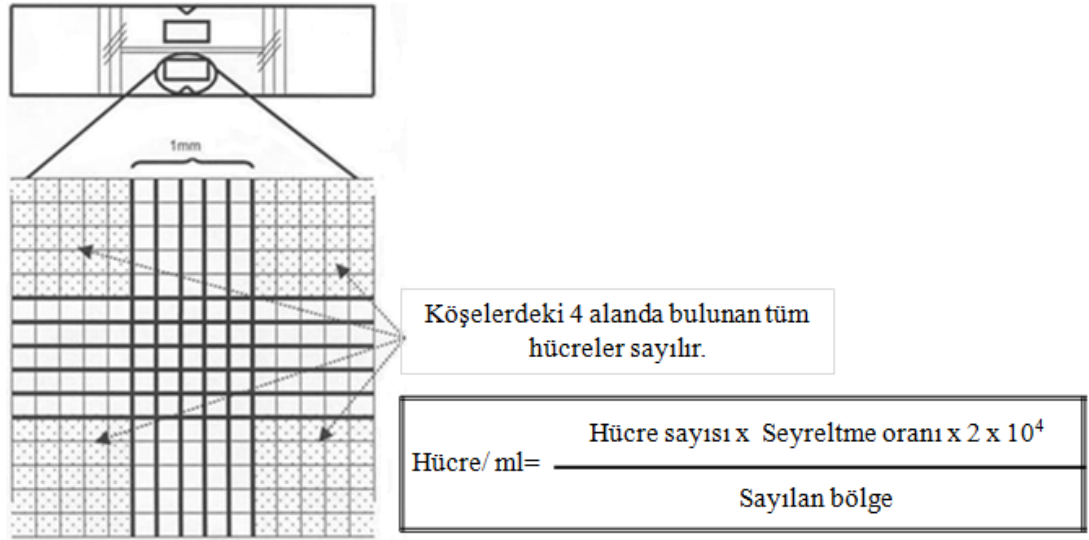
LNCaP hücre hattı hücre kültürü laboratuvarımızda 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücrelerin gelişimi ve çoğaltılması %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin içeren Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640) besi yeriyle gerçekleştirildi. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirildi. Steril 75 cm²'lik kültür flasklarında üretilen hücreler yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaşınca kadar beslendi, ancak bu

yoğunluktan sonra Tripsin-EDTA yardımıyla flasksın yüzeyinden kaldırıldı ve santrifüjde çöktürme işleminden sonra yine kendi medyumunu içerisinde yeni bir flaska aktarıldı. Böylece hücrelerin çoğalması sağlandı. Kültürleme işlemi sırasında hücreler fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkandı. Hücre sayımı ise tripan mavi solüsyonu ile toma lamında gerçekleştirildi.

2.2.4.3 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

2.2.4.3.1 Tripan Mavi Boyamasıyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Tripan mavi boyası hücrelerin canlılığını belirlemede kullanılan negatif yüklü bir boyadır. Eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girmez. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Sonrasında hücreler, hemositometre ile mikroskop altında sayılır (Şekil 2.2).

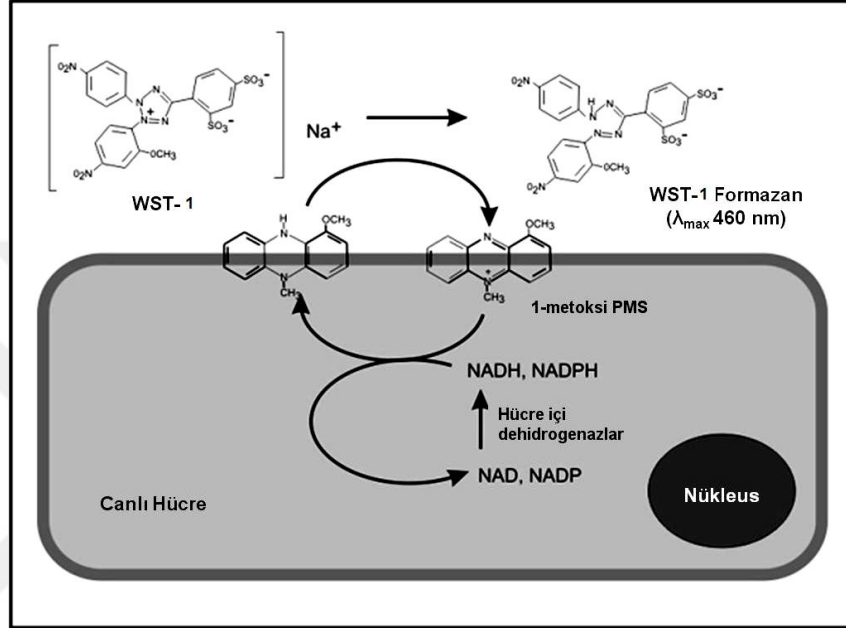


Şekil 2. 2: Hemositometre ile hücre sayımı.

2.2.4.3.2 WST Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Deneyin prensibi WST-1'in (Tetrazolium tuzu), bir elektron taşıyıcısı olan 1-metoksi fenazin metosülfat (1-metoksi PMS) varlığında mavi renkli formazana

indirgenmesi esasına dayanır (Ishiyama ve diğ. 1996). Elektron taşıyıcılığı görevini ise, canlı hücrelerdeki dehidrogenazlar gerçekleştirir (Şekil 2.3). Dolayısıyla formazan oluşumu, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan rengin yoğunluğu 450 nm’de spektrofotometrede ölçülür. Nonradyoaktif olan WST-1 deneyi, hücre proliferasyonu ve sitotoksitesi deneylerinde canlı hücrelerin sayısının tayin edilmesine izin veren hassas kolorimetrik bir ölçüm yöntemidir.



Şekil 2. 3: WST'nin formazana indirgenmesi (Paul 2009).

Hücrelerin, ısrırgan özütleri ile muamelesinin takibinde gelişen sitotoksik cevabın saptanması amacıyla yapıldı. Özütler suda çözülemediğinden hücre kültürü işlemlerinde iyi bir çözücü olarak bilinen DMSO içerisinde çözüldü. Hücreler hemositometre ile sayılarak 96’lık plakaya 1×10^3 /kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saat sonrasında değişik konsantrasyonlarda (son DMSO konsantrasyonu %0,1) hazırlanan özütler hücrelere uygulandı. Uygulamadan sonraki 48 saatin sonunda 96 kuyucuklu plakadaki hücreler üzerine 10 μl WST reaktifi eklenerek hücrelerin yaşam oranları mikropilaka okuyucu kullanılarak 450-690 nm’de 45 dakikalık inkübasyon sonunda ölçüldü. Hiç özüt ile muamele etmediğimiz kontrol grubuna ise %0,1 DMSO içeren besi yeri konuldu. Kör olarak hücrenin medyumunu kullanıldı. Ayrıca hücre sitotoksitesinin ölçümü, her bir deneyde üçlü olmak üzere birbirinden bağımsız deneylerle üç farklı zamanda tekrarlanmıştır. Değişik konsantrasyonlardaki ısrırgan özütleri ile muamele ettiğimiz grubu kontrol grubu ile karşılaştırarak, özütlerin hücre canlılığına olan etkisi saptandı.

2.2.5 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu TRIzol® solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlarına göre gerçekleştirildi ancak kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulandı. Buna göre sitotoksite çalışmalarında belirlenen dozlar uygulanan hücrelere 600 µl TRIzol® solüsyonu eklendi ve 18G uçlu steril iğne ile 10 defa çekip bırakılarak homojenize edildi. Ardından 100 µl kloroform eklenerek 1 dakika düşük hızda karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında ve 5 dakika buzda inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. RNA içeren supernatant yeni steril eppendorfa alınarak üzerine eşit hacimde soğuk saf izoprapanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklendi ve oluşan pelet dağıtıldı. 7.500 rpm'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüjden sonra RNA içeren pelet alet çatısı altında kurutuldu ve 45 µl RNAaz içermeyen su ile çözülerek -80 °C muhafaza edildi. İzole edilen RNA kalitesi %1 agoroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlendi.

2.2.5.1 RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrotometre (NanoDrop, MN913) kullanılarak ölçüm yapıldı. 260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin ve 230 nm ise fenolün maksimum absorbands verdiği dalga boyudur. RNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmaktadır. A260/A280 oranının 1,9 ve A260/A230 oranının ise 1,8-2,2 olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Protein, fenol veya diğer kontaminantların varlığı durumunda oranlar düşük çıkmaktadır.

2.2.5.2 Total RNA'nın Agoroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen RNA'lar %1'lik agoroz jel hazırlanarak yatay agoroz jel elektroforezi ile yürütüldü. %1'lik agoroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agoroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapılmıştır. Çözünme işleminden sonra agoroz solüsyonu soğutularak üzerine

1 µL EtBr eklendi ve elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroforez tankına, kuyucuklar RNA'nın '–' den '+' ya yürüyebilmesi için elektroforezin (–) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tankı RNA'yı yürütmek için 1X TAE yürütme tamponuyla dolduruldu. 3 µl RNA örneği, 5 µl steril su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 Volt, maksimum 500 mA de 45 dakika süresince yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis ProImage Analysis System cihazında fotoğraflandı.

2.2.6 cDNA Sentezi

cDNA sentezi Easy Script Plus cDNA sentez kiti ile oligod(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü ve yapılışı Tablo 2.4'te verilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR yapmak üzere -20 °C muhafaza edilmiştir.

Tablo 2. 4: cDNA sentez karışımı ve prosedürü.

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	---	2,5 µg/ml
Oligo (dT) Primer	1 µl	0,5 µM
dNTP Karışımı (herbiri 10 mM)	1 µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	---	14,5 µl
Hazırlanan reaksiyon karışımı 65 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza alınır.		
5X RT Tamponu	4µl	1X
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1 µl	200 U/rxn
Karışım cDNA sentezi için 50 °C'de 50 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak için 85 °C'de 5 dakika bekletilir.		

2.2.7 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1980 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmış olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği moleküler araştırmaların yapılmasında büyük kolaylıklar sağlamış ve günümüzdeki PZR çalışmalarının temelini atmıştır. PZR, özgül primerler aracılığı ile, bir DNA parçasının çoğaltılmasına dayanan *in vitro* bir yöntemdir. Bu reaksiyonda temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp, karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan deoksiniükleosid trifosfatlar (dNTP), polimerazın çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve kofaktör olan Mg^{+2} iyonları kullanılmaktadır.

PZR'da reaksiyonunda birbirini izleyen basamaklar;

- Denatürasyon basamağı: Yüksek ısı ile örnekteki hedef çift sarmal DNA'nın tek zincir DNA'ya dönüşmesi sağlanır.
- Bağlanma (annealing) basamağı: Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacı ile ikinci bir primer kullanılır. Primerlerden birisi, ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerindeki sonlandırıcı bölgeye bağlanır.
- Uzama basamağı (extention): DNA polimeraz enziminin yardımı ile, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin komplementeri oluşturulur.

Bu aşamaların sonunda iki adet dsDNA oluşur. Oluşan dsDNA'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenir. Bu işlem 30-35 döngü tekrarlandığı zaman, birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir.

PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (qRT-RZR), İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (Kubista 2008).

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları Bioneer AccuPower® GreenStar qPCR Premix Sybergreen kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Primer ve cDNA miktarları laboratuvarımızda optimize edildi. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak hesaplandı ve “house keeping” β -aktin’e göre normalize edildi. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı. Amplifikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak çalışmamızda belirtilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde özüt uygulaması sonucunda meydana gelen değişimler belirlendi.

2.2.8 Protein Düzeyinde Ekspresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi

2.2.8.1 RİPA Tamponu ile Protein İzolasyonu

Radio-immünopresipitasyon deneyi (RIPA) tamponu tüm hücre içeriğinde ki ve membrana bağlı proteinlerin izolasyonu ayrıca NP-40 ya da Triton X-100 ilavesiyle de nükleer proteinlerin izolasyonu için de kullanılmaktadır. RIPA tamponunun hazırlanışı Tablo 2.5’de belirtilmiştir.

Tablo 2. 5: RIPA hazırlanışı.

RIPA Tamponu
150 mM Sodyum klorür %1 NP-40 ya da Triton X-100 %0,5 Sodyum deoksikolat %0,1 SDS (Sodyum dodesil sülfat) 50 mM Tris, pH 8.0

Tampon için hazırlanan %10’luk sodyum deoksikolat stoğu ışıktan korunmalıdır. Ayrıca kullanımdan hemen önce proteaz inhibitör tabletinden ilave edilir. Hücreler RIPA tamponu ile toplandıktan sonra 20 dakika buzda bekletilip +4 °C’ de 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı yeni bir ependorfa alınarak -20 °C’de saklandı.

2.2.8.2 Bikinkoninik Asit ile Protein Tayini

Bikinkoninik asit (BCA) aracılığıyla yapılan protein tayini, alkali şartlarda Cu^{+2} 'nin proteinlerle kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve sonrasında da BCA ile kompleks oluşturması prensibine dayanır. Oluşan bu kompleksin absorbansı, 562 nm dalga boyunda ölçülerek, standartlar varlığında köre karşı protein miktar tayini yapılır (Smith ve diğ. 1985).

Protein tayininde protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) 0,02 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,075 mg/ml ve 0,1 mg/ml olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı. Protein tayini için gerekli olan BCA solüsyonu Tablo 2.6'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2. 6: BCA solüsyonu.

BCA Solüsyonu	
Mikro BCA Reaktifi A	0,2 N NaOH içerisinde Sodyum karbonat, Sodyum bikarbonat ve Sodyum tartarat
Mikro BCA Reaktifi B	%4 Bikinkoninik asit
Mikro BCA Reaktifi C	%4 Bakır sülfat
Deneye başlamadan önce reaktifler 25: 24: 1 oranında karıştırılarak hazırlanır.	

Standartlar ve belirli oranda seyreltmeler yapılan protein numuneleri 96 kuyucuklu plakaya 0,1 ml konulduktan sonra üzerine 0,1 ml BCA solüsyonu eklenerek karıştırıldı. Sonrasında 15 dakika 60 °C'de inkübe edilerek mikropilaka okuyucuda 562 nm'de ölçüldü.

2.2.8.3 Immüno blot Analizi

LNCaP hücre hattında hekzan ve etilasetat özüt muamelesi sonrasında oluşan protein ekspresyonlarındaki değişiklikler immüno blotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Bu yöntem, elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre jelde ayrılan proteinlerin, membrana aktarılacak önce spesifik antikorları ile sonra da bunu tanıyan ve belirli bir

substrat ile reaksiyon verebilen ikincil bir antikora bağlanması sonucu oluşan yanıtın gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla hücre homejenatındaki proteinler önce Laemmli (1970)'de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği olan SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrışmalı, sonra ilgili primer antikoru ile blotlanmalıdır.

Deney süresince kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır;

- Ayrışma jeli tamponu (Separating Buffer): 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8). 18.15 gr Tris yaklaşık 60 ml distile suda çözündü. 10 M HCl ile pH'sı 8.8'e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı.
- Yükleme jeli tamponu (Stacking buffer): 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8). 6 gr Tris yaklaşık 40 ml distile suda çözündü. 10 M HCl ile pH'sı 6.8'e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Akrlamid-Bisakrlamid Solüsyonu (%30T, %2,67C): 29,2 gr akrilamid az suda çözüldükten sonra 0,8 gr bisakrlamid eklendi ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. İyice çözüldükten sonra filtre kağıdından süzüldü.

$$\%T = (\text{gr akrilamid} + \text{gr bis} / \text{toplam hacim}) \times 100$$

$$\%C = (\text{gr bis} / \text{gr akrilamid} + \text{gr bis}) \times 100$$

- %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS): 10 gr SDS distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.
- %10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 gr amonyum persülfat 1 ml distile suda çözünerek her seferinde taze olarak hazırlandı.
- N, N, N', N'-terametiletilediamin (TEMED): Akrlamid ve bisakrlamidin polimerizasyonunu katalizlemesi amacıyla kullanılan Temed solüsyonu, kullanıma hazır olarak Sigma'dan temin edilmiştir.
- Yükleme tamponu (Loading Dye): Tampon içeriğinde; 0,25 M Tris-HCl (pH 6.8), %40 gliserol, %20 beta-merkaptetanol, %8 SDS ve %0,01 bromfenol mavisi bulunduracak şekilde hazırlanarak tamponun pH'sı son hacime tamamlanmadan önce pH 6.8'e titre edildi.

- Elektroforez tamponu (Running Buffer): 15 gr Tris ve 72 gr Glisinin son hacmi 500 ml'ye tamamlanarak 10X stok olarak hazırlandı. Kullanım aşamasında ise bu stok solüsyon distile su ile 1X'e dilüe edilerek %0,1 olacak şekilde SDS ilave edildi.
- Blotlama tamponu (Transfer Buffer): 25 mM Tris, 192 mM Glisin ve %20 metanol olacak şekilde her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.
- TBST solüsyonu: Solüsyon; 20 ml 1 M Tris-HCl (pH7.4), 29,44 gr NaCl ve 0,5 ml Tween 20 (%0,05) karıştırılıp distile su ile son hacmi 1 lt' ye tamamlanarak hazırlandı.
- %5 Bloklama solüsyonu: 5 gr yağsız süt tozu, 100 ml TBST içerisinde çözünerek hazırlandı.
- Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikör solüsyonları: Herbiri üretici firmalarının belirlediği oranda %5'lik bloklama solüsyonu içerisinde hazırlandı.

2.2.8.3.1 SDS-PAGE Elektroforezi

Elektroforez, iki fazlı akrilamid jel üzerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla %8,5'luk ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli, Tablo 2.7'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2. 7: Ayırma ve yükleme jellerinin hazırlanması.

Jel içeriği		Ayırma jeli (%8,5)	Yükleme jeli (%4)
Akrilamid/Bisakrilamid		2,85 ml	0,75 ml
Distile su		4,5 ml	2,5 ml
Tris-HCl Tamponu	pH 8.8	2,5 ml	---
	pH 6.8	---	1,25 ml
%10 SDS		0,15 ml	0,1 ml
APS		0,05 ml	0,025 ml
TEMED		0,0065 ml	0,005 ml

Cam plakalar, jelin döküleceği standlara yerleştirilip plakalar arasına önce ayırma jeli arkasından yükleme jeli döküldü ve oda sıcaklığında sırasıyla 50 ve 20

dakika süreyle donmaya bırakıldı. Sonrasında ilk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan ladder, diğerlerine de protein miktarları BCA yöntemiyle önceden tayin edilen numuneler jele yüklenerek elektroforez başlatıldı. 1X elektroforez tamponu varlığında, numunelerin ayrışma jeline kadar aynı anda toplanabilmesi için akım önce 10 mA'e, daha sonra asıl ayrışmanın olması için 15 mA'e ayarlanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu standtan çıkarılarak oda sıcaklığında 45 dakika süreyle % 0,2 Coomassie pırlanta mavisi R-250, %50 metanol ve %12 asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı ve hem de sabitlendi. Ardından jel bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edilerek saklandı.

2.2.8.3.2 Western Blot Analizi

Elektroforez sonunda cam plakaların arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde nitroسلöloz membran ile sandviçlendi. Bu amaçla kullanılacak olan nitroسلöloz membran, süngerler ve filtre kağıtları soğuk 1X transfer tamponu ile önceden doyuruldu. Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, nitroسلöloz membran, filtre kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üstü üste yerleştirildi ve aparat sıkıca kapatıldı. Hazırlanan sandviçin anot kutbunun anotta, katot kutbunun da katotta olmasına dikkat edilerek Hoefer MiniVE transfer tankına yerleştirildi. Transfer işlemi 1X tamponu içerisinde +4 °C'de 45 V ve 350 mA'de 90 dakika süresince gerçekleşti.

Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla %5'lik bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Daha sonrasında membran primer antikora alınarak +4 °C'de duruma göre 2 saat ya da gece boyu bekletildi. Sonrasında işaretleyici enzim-alkali fosfataz (örneğin; anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla 1-2 saat inkübe edildi.

Görüntüleme için membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan Alkalen Fosfataz (ALP) substrat çözeltisi (1,5

M Tris-HCl (pH 8.8), 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM ZnCl₂, Dietanolamin, NBT, PMS ve BCIP) ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra blot kurutularak folyoda saklandı.

Bantların yoğunluğu ise Scion Image Analyzer yazılımı kullanılarak belirlendi.

2.2.9 Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)'dan elde edilen özütlerin Topoizomeraz I ve II üzerine olan inhibisyon etkileri araştırıldı. Deneyin ilkesi topoizomeraz I ve II enziminin süpersarmal DNA substratını relakse etmesine ve bu özelliğin özütler tarafından ne kadar inhibe edildiğinin belirlenmesine dayanmaktadır. İlk olarak Topoizomeraz I enziminin çalışması optimize edilerek özütler denenmeye başlandı. Bu amaçla, 20 µl hacimde; 3 ünite topoizomeraz I enzimi, 0,3 µg süpersarmal plazmid substratı (pBR322), değişik konsantrasyonlarda özüt, 2 µl 10X Topo I tamponu (35 mM Tris-HCl, pH 8.0; 72 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 5 mM spermidin) karıştırılarak son hacim su ile 20 µl'ye tamamlandı. Karışım, 37 °C 30 dakika inkübe edildi. Her tüpe 6X yükleme tamponu eklenerek 90 voltta EtBr içeren %1'lik agaroz jelde, TAE pH 8.0 tamponunda yürütüldü. Elde edilen jeller DNR Bio-imaging system görüntüleme sisteminde kullanılarak fotoğraflandı.

Tip II topoizomeraz enzimi; katene DNA ile dekatene ürünler arasındaki yapısal farkların analizleri sonucunda topoizomeraz II inhibitörlerinin tanımlanması yapılmaktadır. Bu amaçla, Topoizomeraz II enziminin çalışması optimize edilerek özütlerin inhibisyon etkisi belirlendi. Topoizomeraz I enzim aktivitesinde olduğu gibi, 20 µl hacimde; 4 ünite topoizomeraz II enzimi, 0,35 µg katene DNA (kDNA), değişik konsantrasyonlarda özüt, 2 µl 10X ATP Topo II tamponu (50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 120 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP; 0,5 mM Dithiothreitol) karıştırılarak son hacim su ile 20 µl'ye tamamlandı. Özütlerin varlığında ve yokluğunda enzimin kinetoplast DNA substratları ile 37 °C'de 30 dakika inkübasyon süresinde gösterdiği dekatasyon aktivitesine ait reaksiyon ürünleri 0,5 µg/ml EtBr içeren %1'lik agaroz jelinde 90 dakika yürütüldükten sonra DNR Bio-imaging system görüntüleme sisteminde görüntülenerek analiz edildi.

2.2.10 Tüm Genom Transkriptom Çalışmaları

Mikroarray teknolojisi, parçalanmış DNA'nın bir substrata yapıştırılıp ve daha sonra bilinen bir gen veya fragman ile araştırılan Southern Blot yönteminden geliştirilmiş bir tekniktir. Mikroarray tekniği çok geniş kapsamlı bir teknoloji olup, aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisini öğrenebilme imkanı sağlamaktadır. Ayrıca bir hücreye yapılan bir uygulamanın hücreyi nasıl etkilediği, hangi yolların uyarıldığı hangilerinin sustuğu uygulama öncesine göre kıyasla ortaya konulması ve hangi genlerin ifadesinin artıp hangilerinin inhibe olduğu, yeni genlerin/ yolların keşfedilmesi açısından tercih edilme sebebidir.

Genlerin ifade paternlerini bilmek fonksiyonları hakkında önemli bilgiler verir. Genler ve gen ürünleri arasındaki etkileşimi anlamak için; genomdaki, binlerce-onbinlerce genin ifade düzeylerini analiz etmek gereklidir. DNA mikroarray, genomdaki tüm genlerin ifade analizlerini hızlı bir şekilde yapmak üzere geliştirilmiş bir metottur.

Mikroarray kullanımında amaç şu sorunun cevabını verebilmektir. Bir organizmanın belirli bir hücresinde, belirli bir zamanda ve belirli koşullar altında hangi genler ifade edilmektedir?

DNA veya RNA'yı saptamak için kullanılan DNA mikroarray (gen çipi, DNA çipi ya da biyoçip olarak da bilinir) yaşayan hücrelerin mRNA gen ürün seviyelerini ölçen 'chip' teknolojisini kullanan bir yöntemdir. Array' deki her bir nokta 'chip'e bağlanmış olarak bir DNA dizisinin milyonlarca kopyasını içermektedir. Bunların her birine 'prob' denir. Problar, array yüzeyine yerleştirilmeden önce sentezlenmekte ve daha sonra kovalent bağ ile bir kimyasal matriks (poliakrilamid, lizin, amino silan vs.) içeren bu katı yüzey üzerine nokta şeklinde yerleştirilmektedir.

Çalışma kapsamında LNCaP hücre hattında hekzan ve etilasetat özütlerinin RNA örneklerinin cRNA dönüşümleri yapıp Illumina iScan platformunda 47 binden fazla prob kullanılarak, "Human HT-12 BeadChip" ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır. Kullanılan beadçipler üzerinde kodlanmış ve üzerine purifiye edilmiş cRNA' ların hibridize olabileceği şekilde tasarlanmış beadler bulunmaktadır. Total

mRNA örneklerinden pürifiye edilmiş cRNA örnekleri, beadçip yüzeyindeki beادلere direk olarak hibridize edilir. İşlem basamakları aşağıda belirtildiğı şekilde gerçekleştirilmiştir;

Örneğın İşaretlenmesi (cRNA Purifikasyonu): Ambion Illumina TotalPrep RNA Amplifikasyon kiti kullanılarak total mRNA' dan PZR ile cDNA sentez edildi ve çift iplikli cDNA sentezlettirilerek saflaştırıldı. Ardından in vitro transkripsiyonla cRNA sentezlettirilerek saflaştırıldı.

cRNA Konsantrasyonunun Ölçümü: Nanodrop cihazı kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Mikrodizin Beadçip Uygulanması: tüm genom gen ekspresyonu uygulama beadçipleri için gerekli olan cRNA miktar 750 ng'dır. Bir beadçip yüzeyinde aynı anda 12 örnek çalışılmaktadır.

- Mikrodizin beadçipleri uygulamadan 10 dakika önce oda sıcaklığına getirilmelidir.
- 5 µl cRNA örneğine 10 µl hibridizasyon tamponu eklenerek, toplamda 15 µl hacimli örnek çip yüzeyindeki örnek yükleme kanallarına yüklenmiştir.
- Tüm örnek kanalları yüklenen Beadçip, hibridizasyon çemberi içerisine alınarak hibridizasyon fırını içerisinde 58 °C'de gece boyu (14-20 saat) hibridizasyona bırakılmıştır.
- Hibridizasyon işlemini takiben, bağlanmayan ürünlerin uzaklaştırılması ve streptavidin işaretlemesi öncesinde çip yüzeyinin iki farklı sıcaklıktaki yıkama serisinden geçirilmesiyle temizlenmesi sağlanmıştır. Bu yıkamalar sırasıyla oda sıcaklığında ve yüksek sıcaklıkta yapılan yıkamalardır. Her iki yıkamada da kullanılan yıkama solüsyonları beadçipler ile birlikte gelen 2 farklı yıkama solüsyonları ile gerçekleştirilmiştir.
- Yıkama işleminden sonra Beadçip streptavidin ile işaretlenmiştir.
- Okuma işleminin öncesinde Beadçip +4 °C ve 1.400 rpm'de santrifüj işlemi ile karanlık ortamda kurutulmuştur.
- Son olarak ta, Beadçip mikrodizin lazer okuyucunda okutulmuştur.

Biyoinformatik Analiz: Elde edilen veriler mikrodizin sistemine ait 'Genome Studio' yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İşlem basamakları;

- **Veri Normalizasyonu:** Mevcut analizde kullanılan veriler, üzerinde hiçbir işlem yapılmamış olan ham verilerdir. Bu veriler üzerinde istatistiksel ve biyoinformatik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için verinin işlenmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda, bu verilere normalizasyon uygulanmıştır. Illumina beadçip verileri için önerilen ve yaygın olarak kullanılan normalizasyon yöntemi '*quantile normalizasyonu*'dur.
- **Veri Analizi:** Verilerin analizinde anlamlı olarak değişen mRNA'ların tespit edilmesi ve bu elde edilen mRNA setinin hedef genlerinin bulunması, ardından da bu genlerin yolak ve zenginleştirme analizlerinin yapılması sağlanmıştır. Bu doğrultuda, hedef mRNA setlerinin t-test yöntemi ile çıkartılması ve bu mRNA'ların hedef genlerine yönelik yolak, ortak protein bölgesi ve gen ontolojisi (GO) analizi yapılmıştır. Bu aşamada, t-test değeri sonucunda çıkacak p-değerinin 0,05'ten daha düşük olması ve kat değişiminin de 2'den büyük olması beklenmiştir. Anlatımı anlamlı olarak değişen mRNA'ların hedeflediği gen listeleri KEGG veritabanı üzerinde gösterilmiştir.

2.2.11 İstatiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında anlamlı bir fark olup olmadığını analiz etmek için Student's t-test ve parametrik olmayan Mann-Whitney U testleri uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 *Urtica urens*'te Özütleme

Gölgede kurutularak toz hale getirilen bitkisel materyal olan *Urtica urens* bitkisinde ekstraksiyon çalışmalarına başlamadan önce nem tayini yapılmış ve özüt verimleri nem miktarı dikkate alınarak kuru baz üzerinden yapılmıştır. Çalışma kapsamında hedeflendiği üzere *Urtica urens* bitkisinin oda koşullarında sırasıyla hekzan, kloroform ve etil asetat ile ekstraksiyonları yapılarak özütler elde edilmiştir. Özüt miktarlarını arttırmak için ekstraksiyon işlemi 4 defa tekrarlanmış ve verim ortalamaları Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3. 1: *Urtica urens* yapraklarından elde edilen özütlerin verimleri.

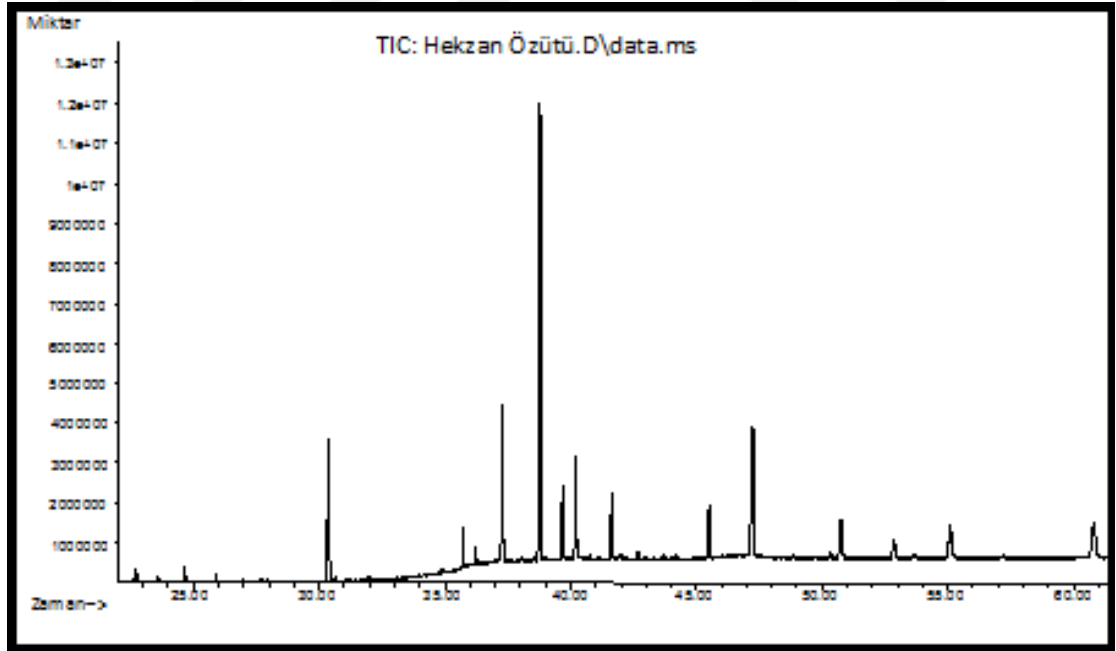
Özütler	Verim (%)
n-Hekzan	1,60
Kloroform	1,22
Etil asetat	1,38

3.2 Hekzan Özütünün GC-MS Analizi

Küçük ısırgan otunun (*Urtica urens*) fraksiyonlanması sonucunda oluşan hekzan özütünün GC-MS analiziyle saptanan maddelere ait sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmektedir (Tablo 3.2). Ayrıca GC kromatogramı da Şekil 3.1'de verilmektedir. Buna göre, hekzan özütünde majör bileşen olarak %93,01 oranında 13 adet bileşik tespit edilmiştir ve teşhis edilen bileşikler genellikle yağ asiti ve basit alken ağırlıklıdır.

Tablo 3. 2: Hekzan ana özütünün GC-MS ile içerik analizi.

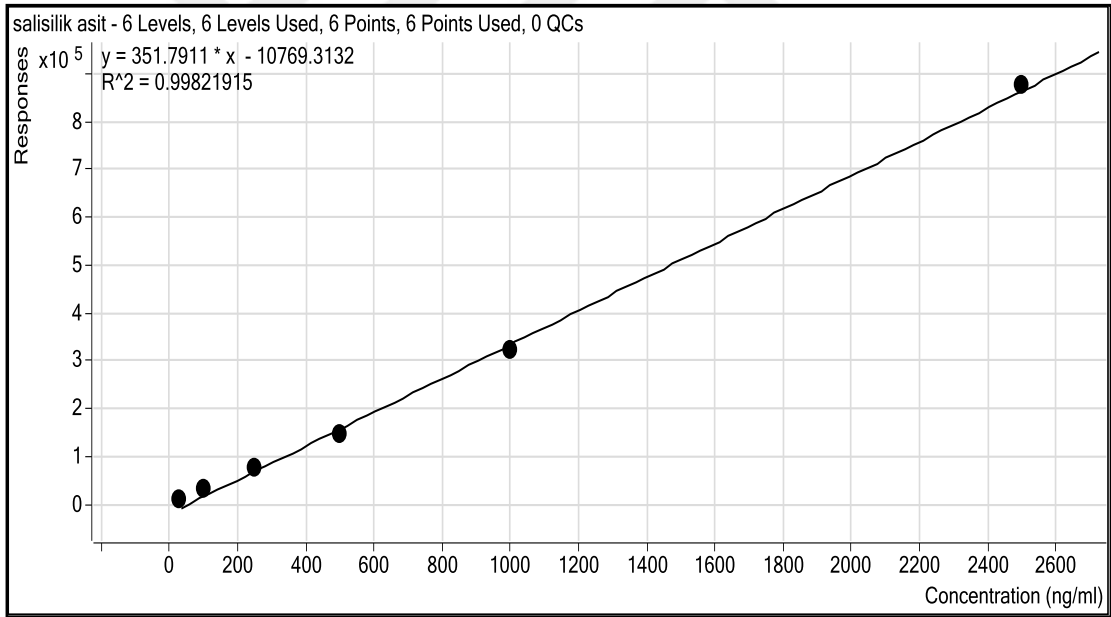
No	Alıkonma süresi (dk)	Bileşik adı	Alan
1	24.64	Tetradekanoik Asit (Miristik asit, C 14:0)	0,9
2	30.37	Heksadekanoik Asit (Palmitik asit, C 16:0)	10,61
3	35.73	Oktadekanoik Asit (Stearik asit, C18:0)	2,08
4	37.28	9,12-Oktadekadienoik Asit (Linoleik asit, C 18:2)	8,34
5	38.78	6,9,12-Oktadekatrienoik Asit (Gama-linoleik asit, C 18:3)	28,11
6	39.68	Fitol	4,33
7	40.20	Eikosanoik Asit (Araşidik asit, C 20:0)	5,91
8	41.63	Heptacosane	4,39
9	45.50	Docosanoik Asit (Behenik asit, C 22:0)	4,23
10	47.24	Nonaksan	13,17
11	50.75	2-Metil-1-heksadekanol	4,35
12	52.86	Tetracosanoik Asit (Lignoserik asit, C 24:0)	2,13
13	55.10	Hentriacontane	4,46



Şekil 3. 1: Hekzan ana özütünün GC kromotogramı.

3.3 Kloroform ve Etil Asetat Özütlerinin LC-MS Analizi

Küçük ısırgan otunun fraksiyonlanması sonucunda oluşan kloroform ve etil asetat özütlerinin LC-MS analiziyle bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada salisilik asit, kersetin, gentisik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, 4-hidroksibenzaldehid, p-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glukozit, rosmarinik asit, protokateşuik asit etil ester, sinamik asit, kamperol, gallik asit, klorojenik asit, kateşol, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, rutin, hesperidin gibi fenolik maddeler standart olarak kullanılmış ve bu maddelerin değişik konsantrasyonlarının kolonda yürütülmesiyle elde edilen sonuçlar standart eğri çizimi için kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu standart eğri grafiği özütlerin içerisinde bulunan aynı fenolik madde miktarlarının tayini için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3. 2: 25,00, 100,00, 250,00, 500,00, 1000,00 ve 2500,00 ng/ml salisilik asit standart çözeltileri kullanılarak, özütlemeye çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 3. 3: Kloroform ve etil asetat özütlerinin LC-MS ile içerik analizi.

Fenolik Standartlar	Kloroform Özütü (ppb)	Etil Asetat Özütü (ppb)
4-Hidroksibenzaldehit	7,07	8,36
4-Hidroksibenzoik asit	11,76	20,55
Salisilik asit	33,59	42,62
Kafeik asit	20,11	45,85
Klorojenik asit	trace	99,59
p-Kumarik asit	trace	45,69
Gallik asit	48,12	39,99
Gentisik asit		15,77
Ferulik asit		20,09
Naringenin	trace	trace
Kamferol		trace
Rosmarinik asit		15,23
Hesperidin		trace
Protokateşuik asit		32,15
Protokateşuik asit etil ester	trace	trace
Kuarsetin		

3.4 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

3.4.1 Tripan Mavi Boyamasıyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi

LNCaP hücre hattına, farklı konsantrasyonlarda hekzan ve etil asetat özütlerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla WST metoduna ek olarak tripan mavi boyamasıyla da hücreler mikroskopta sayıldı. Hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5×10^3 olacak şekilde ekilerek belirlenen dozlarda özütler uygulandı. Canlı ve ölü hücrelerin sayımı sonucunda dozlara karşılık gelen canlılık yüzdeleri hesaplandı (Tablo3.4-3.5).

Tablo 3. 4: LNCaP hücre hattında hekzan özütü uygulamasından sonra tripan mavi boyamasıyla hücre sayımı.

Hekzan özütü	Toplam hücre sayısı	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı	Canlılık (%)
Kontrol	$2,2 \times 10^4$	2×10^4	2×10^3	91
12,5 µg/ml	$1,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	3×10^3	84
25 µg/ml	$2,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	9×10^3	60,5
37,5 µg/ml	$2,2 \times 10^4$	1×10^4	$1,2 \times 10^4$	46
50 µg/ml	$2,1 \times 10^4$	9×10^3	$1,2 \times 10^4$	43
62,5 µg/ml	$2,1 \times 10^4$	6×10^3	$1,5 \times 10^4$	29
75 µg/ml	$1,1 \times 10^4$	3×10^3	8×10^3	27

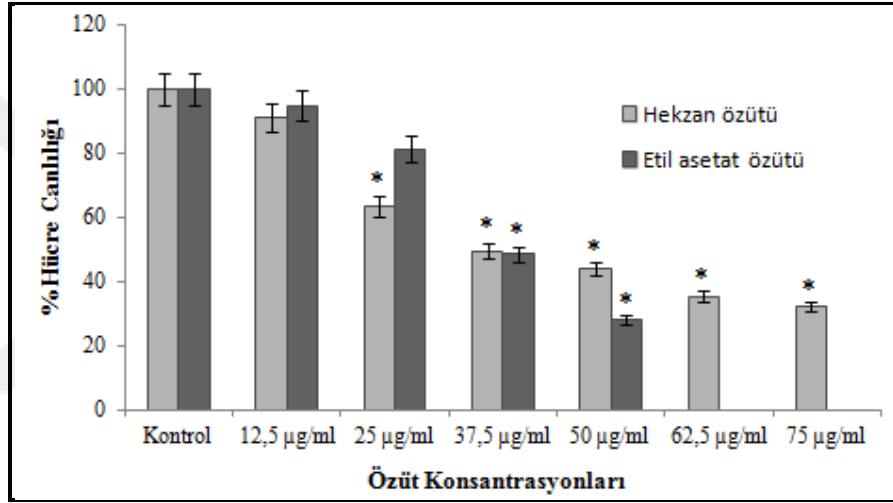
Tablo 3. 5: LNCaP hücre hattında etil asetat özütü uygulamasından sonra tripan mavi boyamasıyla hücre sayımı.

Etil asetat özütü	Toplam hücre sayısı	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı	Canlılık (%)
Kontrol	$1,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	2×10^3	89
12,5 µg/ml	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	1×10^3	92
25 µg/ml	$1,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	5×10^3	72,5
37,5 µg/ml	$1,9 \times 10^4$	9×10^3	1×10^4	47,5
50 µg/ml	$1,9 \times 10^4$	6×10^3	$1,3 \times 10^4$	31
62,5 µg/ml	7×10^3	1×10^3	6×10^3	29
75 µg/ml	1×10^3	0	1×10^3	0

3.4.2 WST Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışmanın ileri deneylerinde kullanılacak en uygun özüt dozunun saptanması amacıyla yapılan hücre sitotoksosite ölçümü için hücreler 1×10^3 olacak şekilde ekilerek, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 37,5 µg/ml, 50 µg/ml, 62,5 µg/ml ve 75 µg/ml olmak üzere 6 farklı hekzan ve etil asetat özütü dozu ile muamele edildiler. Sonuçlar, herhangi bir özüt muamelesinin olmadığı durumda elde edilen verilere oranlanarak % kontrol olarak değerlendirildi. Buna göre; 12,5 µg/ml hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi. Buna karşılık 25 µg/ml ve 37,5 µg/ml hekzan özütünün, hücre canlılığı üzerinde sırasıyla %36 ve %50 oranında inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edildi. 50 µg/ml ve

üstündeki dozlarda hekzan özütünün ortalama %65 gibi büyük bir oranda canlılığı baskılayarak toksik etkiye sahip olduğu saptandı. Etil asetat uygulaması sonucunda ise 50 µg/ml ve üzerindeki dozlarda ortalama %90 gibi oldukça büyük bir oranda canlılığı baskılayarak LNCaP hücre hattında toksik bir etkiye sahip olduğu saptandı (Şekil 3.3). Ayrıca küçük ısırgan otunun artan polariteye bağlı yapılan özütleme işlemlerinde elde edilen kloroform özütünde hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla da sitotoksikite deneyi yapıldı fakat diğer özütlere oranla daha düşük sitotoksik aktivite elde edildi. Ek olarak LC-MS analizi ile belirlenen sonuçlarda dikkate alınarak çalışmalarımızın devamında bu özütün kullanılmamasına karar verildi.



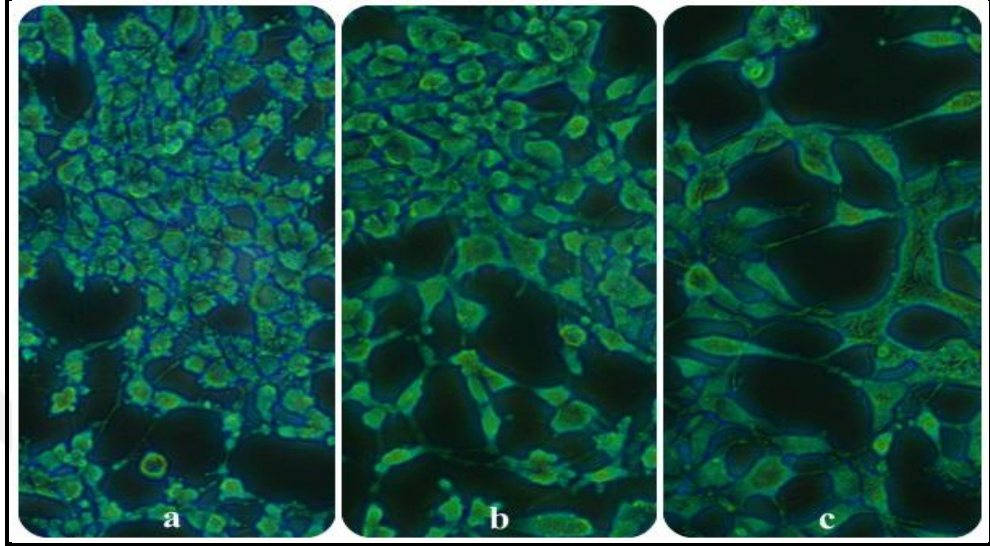
Şekil 3. 3: Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu %100 alınmış ve özüt sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız iki tekrarın ortalama değerleridir. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

Tüm bu veriler dikkate alınarak LNCaP hücre hattında çalışmanın ileri deneylerinde kullanılmak üzere hekzan ve etil asetat özütleri için üstel eğilim çizgisi kullanılarak hesaplanan Tablo 3.6'da verilen değerler kullanılmıştır.

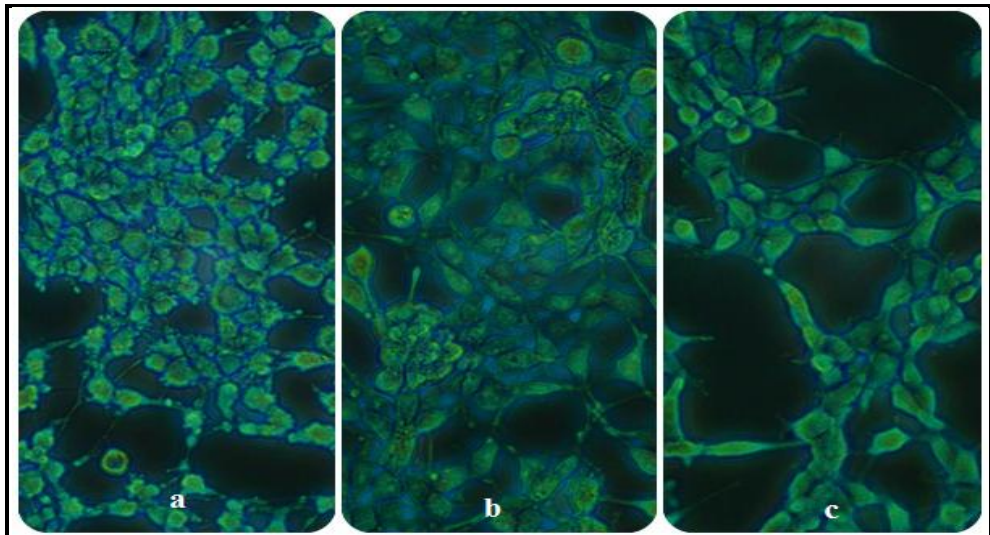
Tablo 3. 6: LNCaP hücre hattında hekzan ve etil asetat için belirlenen etkin dozlar.

LNCaP Hücre Hattı		
Etkin Doz	Hekzan özütü	Etil asetat özütü
ED (8)	5,12 µg/ml	10,83 µg/ml
ED (25)	17,71 µg/ml	18,38 µg/ml
ED (50)	42,77 µg/ml	33,96 µg/ml

LNCaP hücre hattında hekzan ve etil asetat özütleri için belirlenen etkin dozlar 24 saat öncesinde 1×10^6 hücre olacak şekilde 75 cm^2 'lik steril hücre kültürü kaplarına ekilen hücrelere uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonrasında hücreler invert faz kontrast mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 3.4-3.5).



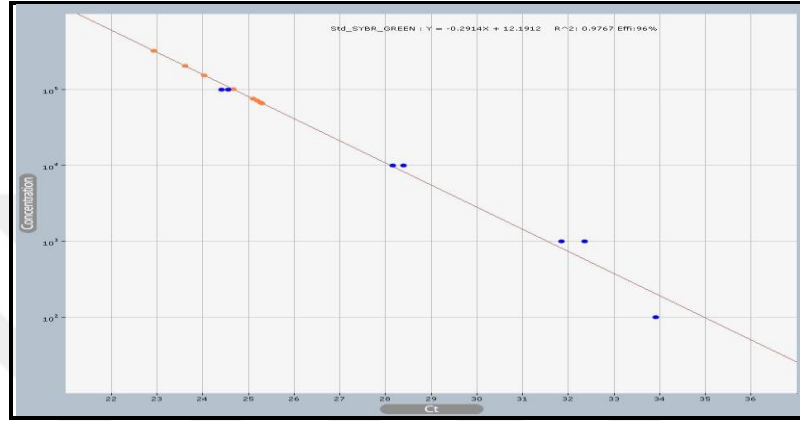
Şekil 3. 4: LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu hekzan özütünün uygulanmasından 48 saat sonrasında invert faz kontrast mikroskobunda 20X büyütülerek çekilen görüntü. a. LNCaP hücre hattı kontrol grubu. b. LNCaP hücre hattında hekzan özütü ED(8) uygulanan hücreler. c. LNCaP hücre hattında hekzan özütü ED(50) uygulanan hücreler.



Şekil 3. 5: LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu etil asetat özütünün uygulanmasından 48 saat sonrasında invert faz kontrast mikroskobunda 20X büyütülerek çekilen görüntü. a. LNCaP hücre hattı kontrol grubu. b. LNCaP hücre hattında etil asetat özütü ED(8) uygulanan hücreler. c. LNCaP hücre hattında etil asetat özütü ED(50) uygulanan hücreler.

3.5 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR deneylerine, ilk olarak cDNA örneğinin belirli oranlarda seyreltildiği standartlar ile başlandı. Standartların “housekeeping gen” olan B-aktin primeri kullanılarak RT-PZR ile analizi sonucunda Şekil 3.6’da verilen standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

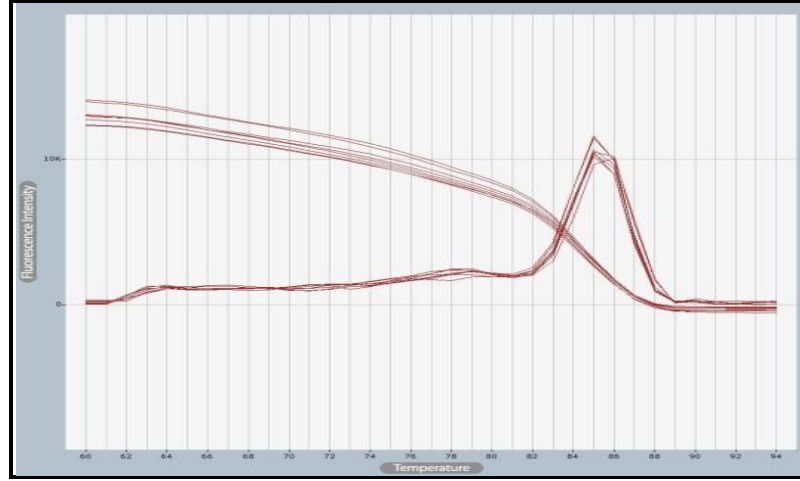


Şekil 3. 6: Standart kalibrasyon eğrisi.

Elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak hesaplanmış ve her bir gen için ayrı ayrı her kuyucuktaki floresan değerini gösteren amplifikasyon analizi ve reaksiyon sonunda oluşan ürünün erime sıcaklığını gösteren erime eğrisi analizi yapılmıştır. B-aktin’e ait amplifikasyon ve erime eğrisi grafikleri Şekil 3.7 ve 3.8’de verilmektedir.



Şekil 3. 7: B-aktin primeri ile yapılan qRT-RZR sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3. 8: B-aktin primeri ile yapılan qRT-RZR sonucunda elde edilen erime eğrisi.

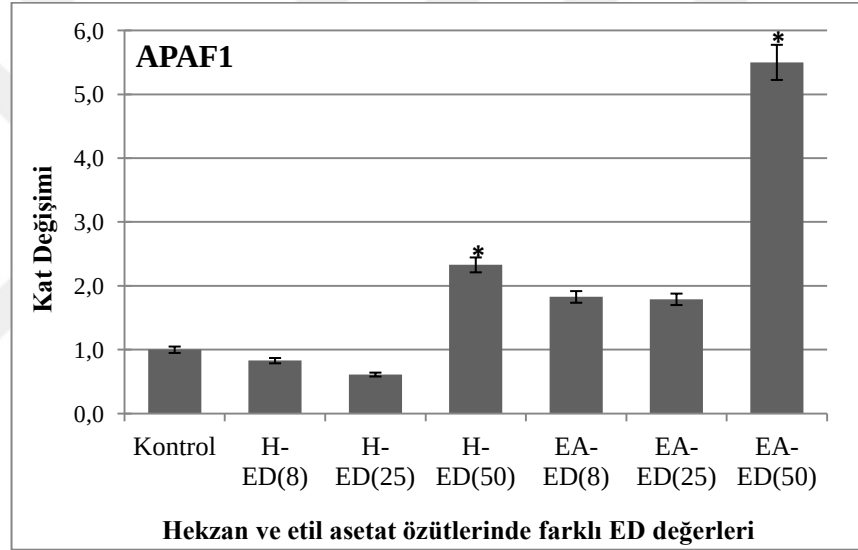
Sonuçlar karşılaştırmalı Ct yöntemi ile aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Önce kontrol ve tedavi grubu örneklerinin ortalama Ct değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra bu formüle göre hem tedavi hemde kontrol grubu ortalama Ct değerlerinden tek tek “housekeeping” gen olarak kullanılan B-aktin ortalama değerleri çıkartılarak ΔCt (delta Ct) değerleri hesaplandı. Sonrasında hesaplanan kontrol grubu ΔCt değerleri hasta grubu ΔCt değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. Bu değerinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nin hesaplanması ile de hasta grubunda çalışılan genlerin kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğu B-aktin gen ekspresyonun internal kontrol olarak kullanılmasıyla relatif olarak belirlenmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[(\text{İlgili genin Ct değeri} - \text{internal kontrol Ct değeri}) \text{ tedavi grubu} - (\text{ilgili genin Ct değeri} - \text{internal kontrol Ct değeri}) \text{ kontrol grubu}]}{}$$

Çalışma kapsamında birçok farklı yolakla ilişkili 31 adet genin LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)’ndan elde edilen hekzan ve etil asetat özütləri için belirlenen etkin doz (ED) değerlerinin uygulanması sonucunda mRNA düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait sonuçlar elde edildi. 31 adet gen kendi içerisinde rol aldıkları yolaklar ile ilişkilendirilerek elde edilen sonuçlar apoptoz yolağı genleri, hücre döngüsünü düzenleyici genler, proliferatif hücre içi sinyal yolağı genleri, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve ilaç regülasyonunda görev alan genler olmak üzere verilmiştir.

3.5.1 Apoptoz Yolağı İle İlişkili Genler

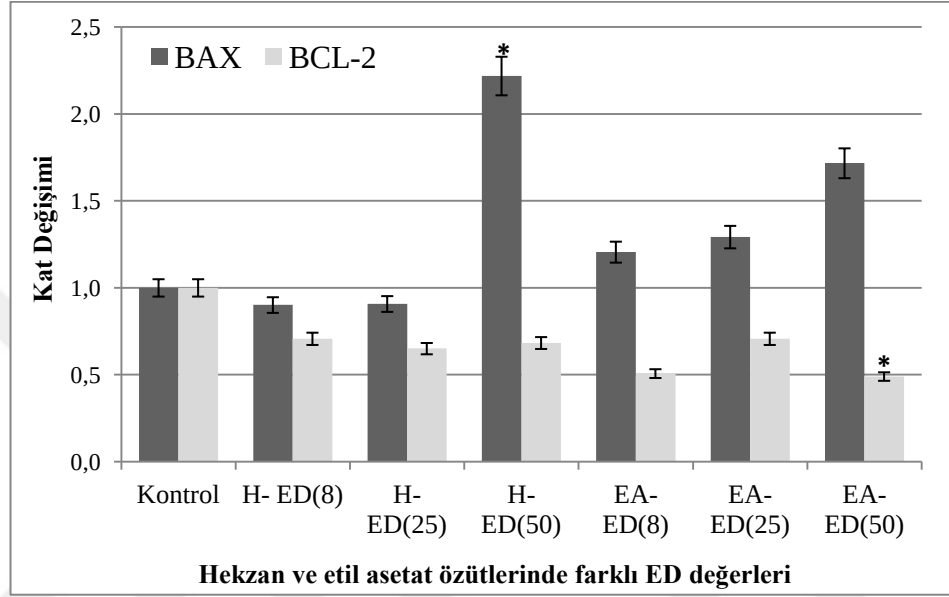
LNCaP hücre hattında belirlenen dozlarda hekzan ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda apoptoz yolaklarında çeşitli görevleri olan APAF1, BAX, BCL-2, CASP-3, CASP-8, CASP-9, FAS, PARP, TNF ve TRAF2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. LNCaP hücre hattında APAF1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde *Urtica urens* hekzan özütü ED(8) ve (25) uygulamasında 1,20 ve 1,63 kat azalış gözlenirken; ED(50)'de 2,33 kat artış gözlemlendi. Etil asetat özütünde elde edilen sonuçlarda ise ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,83, 1,79 ve 5,50 kat artış elde edildi (Şekil 3.9). Bu artışlardan sadece H-ED(50) ve EA-ED(50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 9: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili APAF-1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Apoptoz yolağında birbirleriyle ilişkili olduğu bilinen BAX ve BCL-2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında BCL-2 için hekzan özütü ED(8), (25), (50), etil asetat özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,40, 1,53, 1,47, 1,96, 1,40 ve 2,04 kat azalış elde edildi. BAX geni için ise hekzan özütü

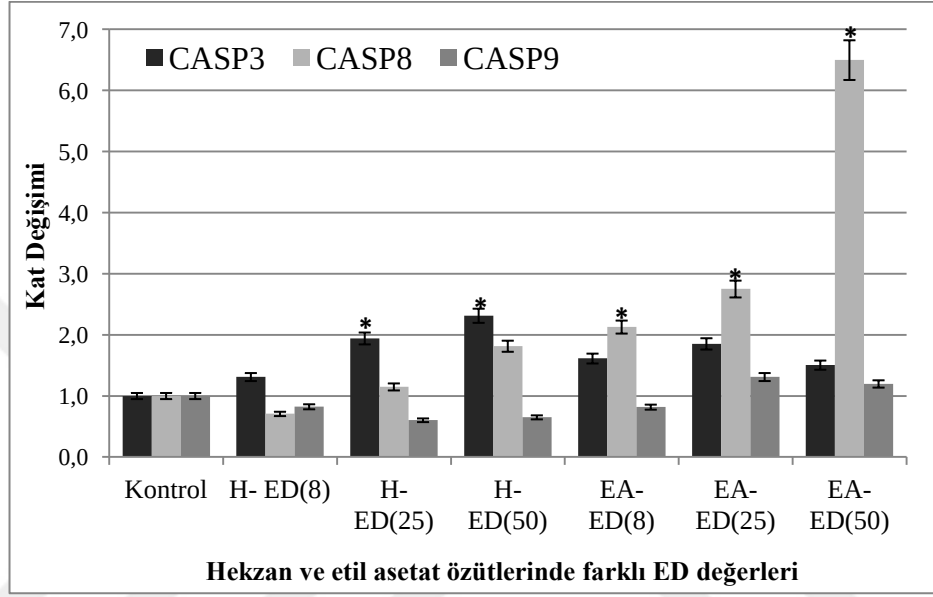
ED(8) ve ED(25) değişim gözlenmezken; diğer ED(50)'de 2,22 kat artış saptandı. Etil asetat özütünden elde edilen sonuçlarda ise ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,21, 1,29 ve 1,72 kat artış elde edildi (Şekil 3.10). Bcl-2 geni için elde edilen azalışlardan sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; Bax geni için elde edilen artışlardan da sadece H-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 10: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili BAX ve BCL-2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

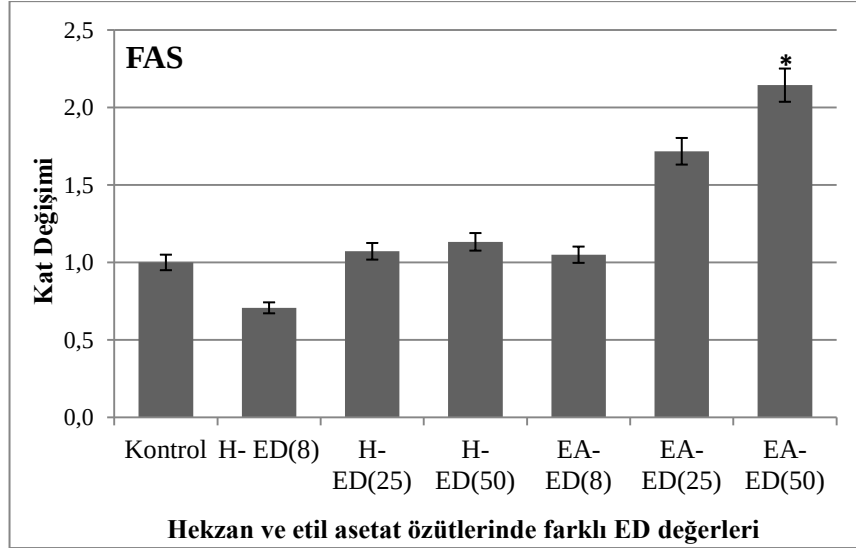
Apoptoz yolağında görevli kaspaz ailesi üyelerinden CASP-3, -8 ve -9 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlere bakıldığında CASP-3 için hekzan ve etil asetat özütlerinde 3 farklı etkin dozda sırasıyla 1,31, 2,04, 2,31, 1,61, 1,85 ve 1,51 kat artış elde edildi. CASP-8 geninden elde edilen sonuçlarda hekzan özütü ED(8) ve (25)'de değişim gözlenmezken; ED(50) uygulamasında 1,82 kat artış gözlemlendi. Etil asetat özütü uygulaması sonrasında ise her bir doz için sırasıyla 2,13, 2,75 ve 6,50 kat artış elde edildi. Diğer bir gen CASP-9 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde ise hekzan özütü ED(8)'de değişim gözlenmezken; diğer ED(25) ve (50) uygulamalarında 1,66 ve 1,53 kat azalış elde edildi. Etil asetat özütünde ise ED(8)'de

değişim gözlenmezken; ED(25) ve (50) uygulamasında 1,31 ve 1,20 kat artış tespit edildi (Şekil 3.11). CASP-3 geni için elde edilen artışlardan sadece H-ED(25) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; CASP-8 geni için elde edilen artışlardan da etil asetat özütünün tüm ED değerlerindeki uygulamalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna karşın, CASP-9 geni için elde edilen değişimlerden herhangi biri istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.



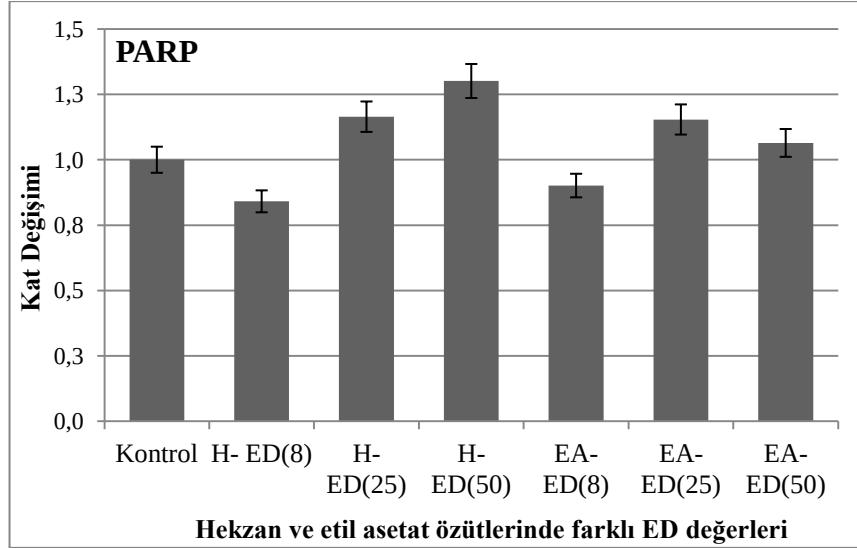
Şekil 3. 11: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili CASP-3, -8 ve -9 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

FAS geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde *Urtica urens* hekzan özütü ED(8), (25), (50) ve etil asetat özütünde ise ED(8) uygulamasında değişim gözlenmezken; ED(25) ve (50)'de 1,72 ve 2,14 kat artış elde edildi (Şekil 3.12). Bu artışlardan sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



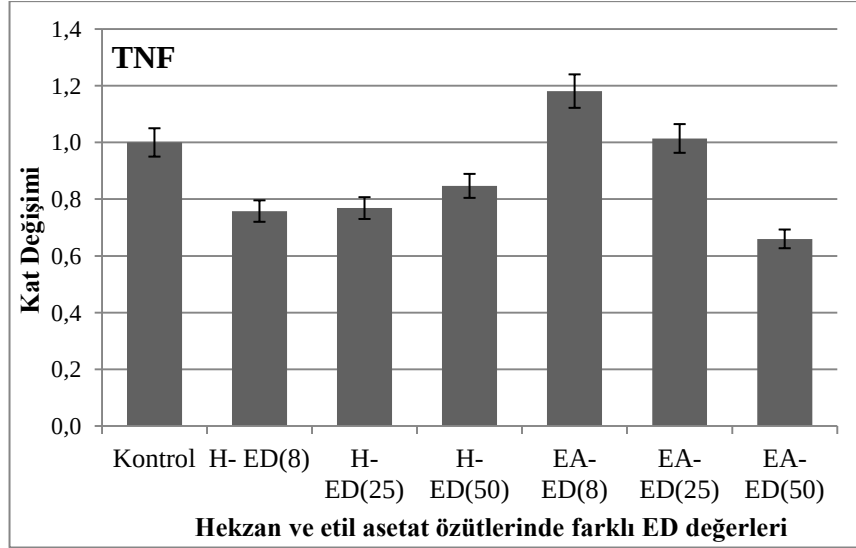
Şekil 3. 12: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili FAS geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Apoptoz yolağındaki PARP geninin mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise hekzan özütünde ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,19 kat azalış, 1,16 ve 1,30 kat artış tespit edilirken; etil asetat özütünde ise 1,11 kat azalış, 1,15 ve 1,06 kat artış tespit edildi (Şekil 3.13). Bu değişimlerden herhangi biri istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.



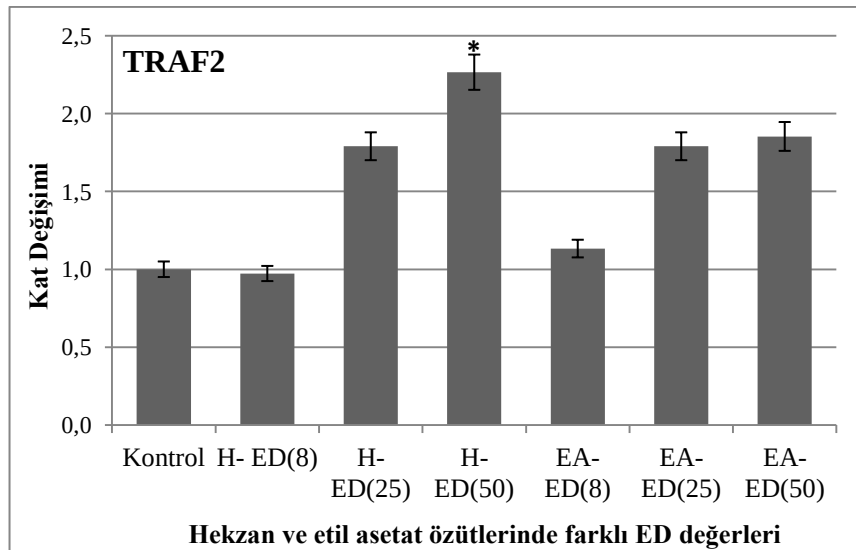
Şekil 3. 13: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili PARP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

LNCaP hücre hattında TNF geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde *Urtica urens* hekzan özütü ED(8), (25), (50) uygulamasında sırasıyla 1,31, 1,29 ve 1,17 kat azalış elde edilirken; etil asetat özütünde ise ED(8)'de 1,18 kat artışa karşılık ED(50)'de 1,51 kat azalış elde edildi (Şekil 3.14). Bu değişimlerden herhangi biri istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 3. 14: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili TNF geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca TRAF2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü için ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,03 kat azalış, 1,79 ve 2,27 kat artış gözlenirken; etil asetat özütü içinse sırasıyla 1,13, 1,79 ve 1,85 kat artış saptandı (Şekil 3.15). Bu artışlardan sadece H-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

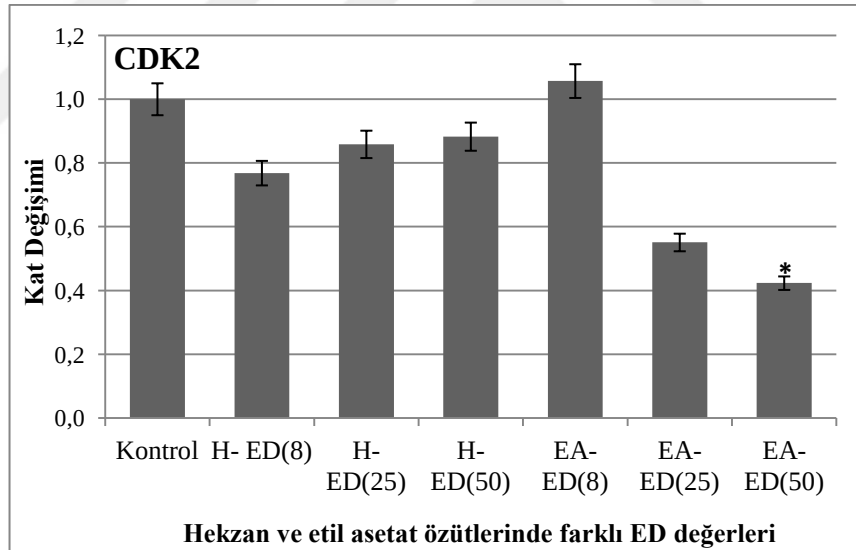


Şekil 3. 15: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında apoptoz yolağıyla ilişkili TRAF2 geninin mRNA

seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

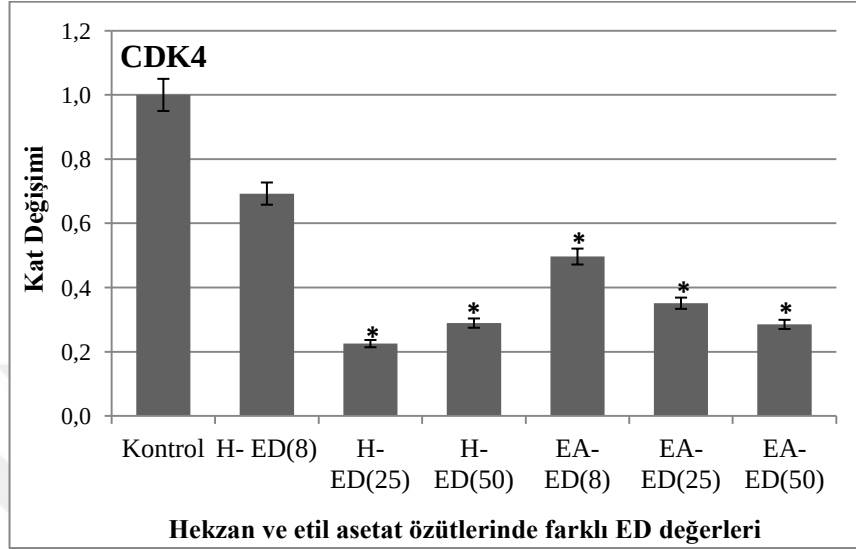
3.5.2 Hücre Döngüsünü Düzenleyici Genler

LNCaP hücre hattında belirlenen dozlarda hekzan ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda hücre döngüsünü düzenleyici CDK2, CDK4, CDKN1A, CyclinD1 ve CyclinD2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Verilerden elde edilen sonuçlara göre CDK2 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,29, 1,16 ve 1,13 kat azalış gözlenirken; etil asetat özütünde ED(8)'de değişim olmazken (25) ve (50)'de 1,81 ve 2,38 kat azalış gözlemlendi (Şekil 3.16). Bu azalışlardan sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



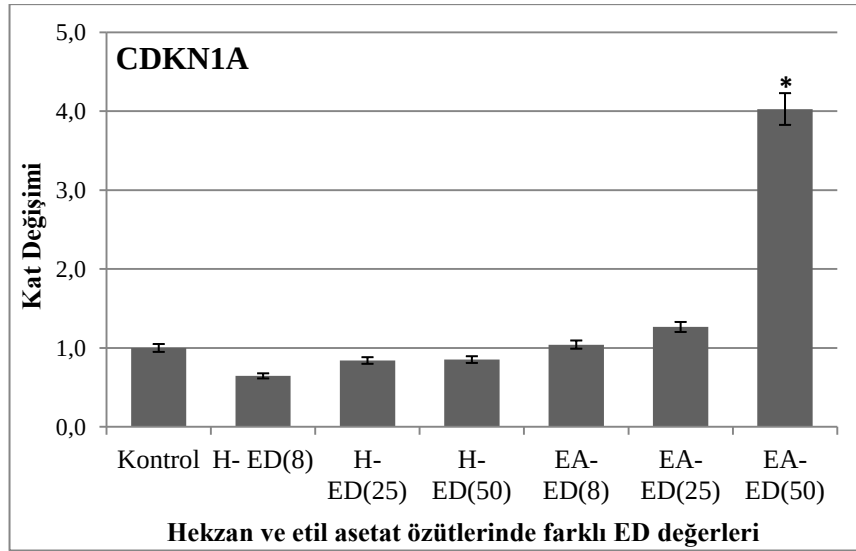
Şekil 3. 16: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CDK2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Diğer bir hücre döngüsü düzenleyici CDK4 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde hekzan ve etil asetat özütlerinin her bir etkin dozu için sırasıyla 1,44, 4,34, 3,44, 2,0, 2,85 ve 3,44 kat azalış gözlemlendi (Şekil 3.17). Bu azalışlardan H-ED(8) uygulaması hariç diğer etkin doz değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



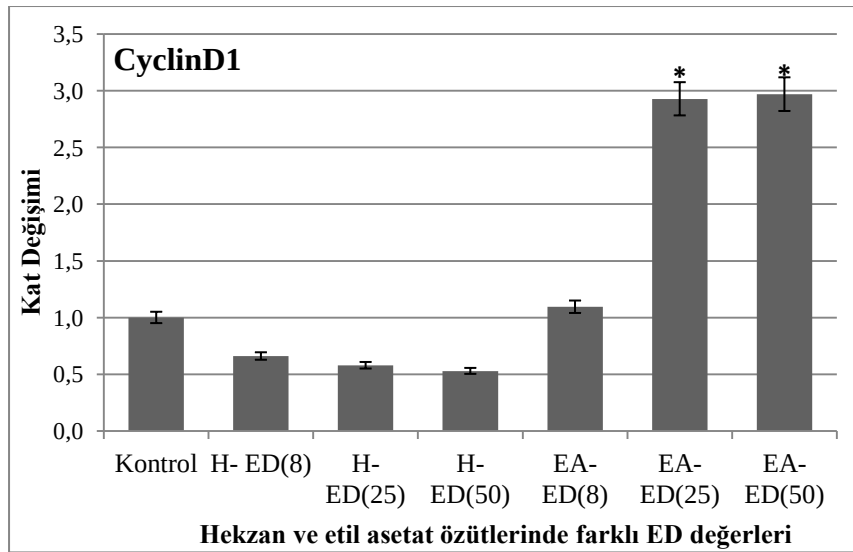
Şekil 3. 17: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CDK4 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden olan CDKN1A geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamalarında sırasıyla 1,53, 1,19 ve 1,17 kat azalış gözlenirken; etil asetat özütünde 1,04, 1,27 ve 4,03 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.18). Bu artışlardan sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



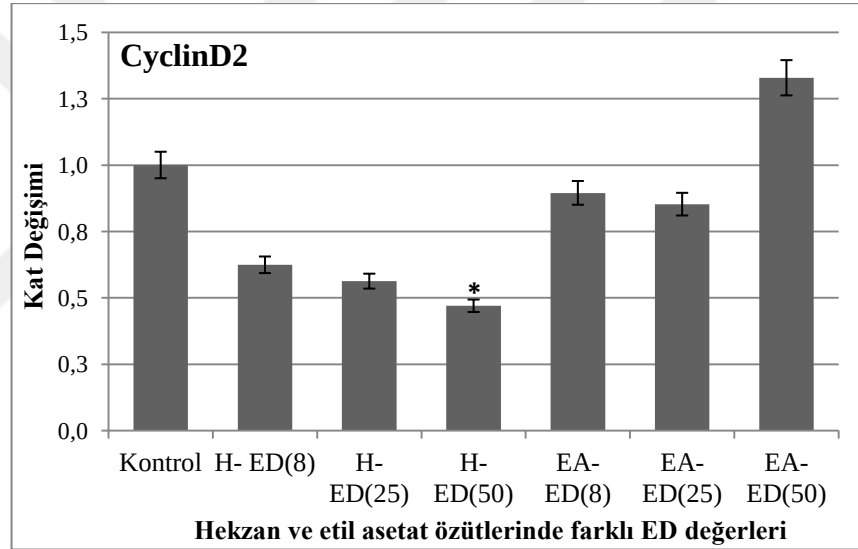
Şekil 3. 18: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CDKN1A geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Diğer bir gen olan SiklinD1 mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü için ED(8), (25) ve (50) uygulamalarında sırasıyla 1,51, 1,72 ve 1,88 kat azalış gözlenirken; etil asetat özütünde 1,09, 2,93 ve 2,97 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.19). Bu artışlardan sadece EA-ED(25) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 19: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CyclinD1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Son olarak ta hücre döngüsünü düzenleyici diğer bir gen olan SiklinD2 mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü için ED(8), (25) ve (50) uygulamalarında sırasıyla 1,61, 1,78 ve 2,12 kat azalış gözlenirken; etil asetat özütünde 1,11, 1,17 kat azalış ve 1,33 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.20). Bu değişimlerden sadece H-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

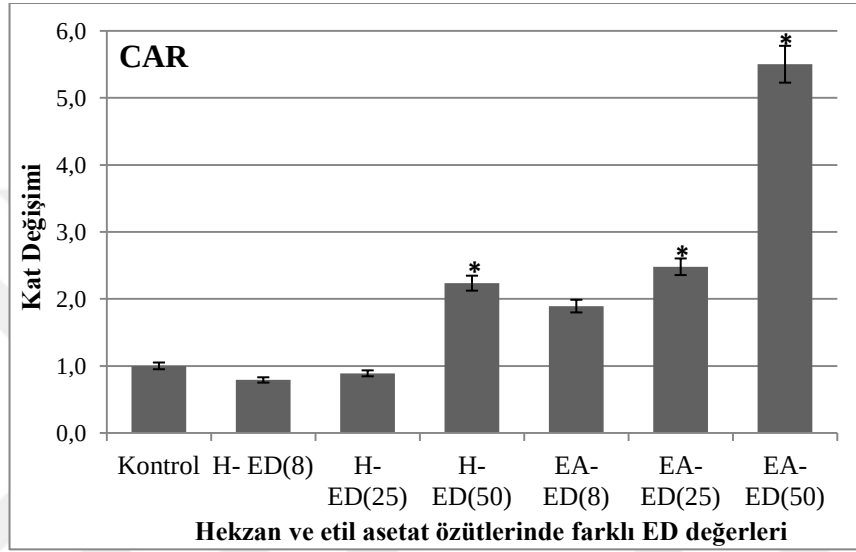


Şekil 3. 20: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici CyclinD2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.5.3 İlaç Regülasyonu İlişkili Genler

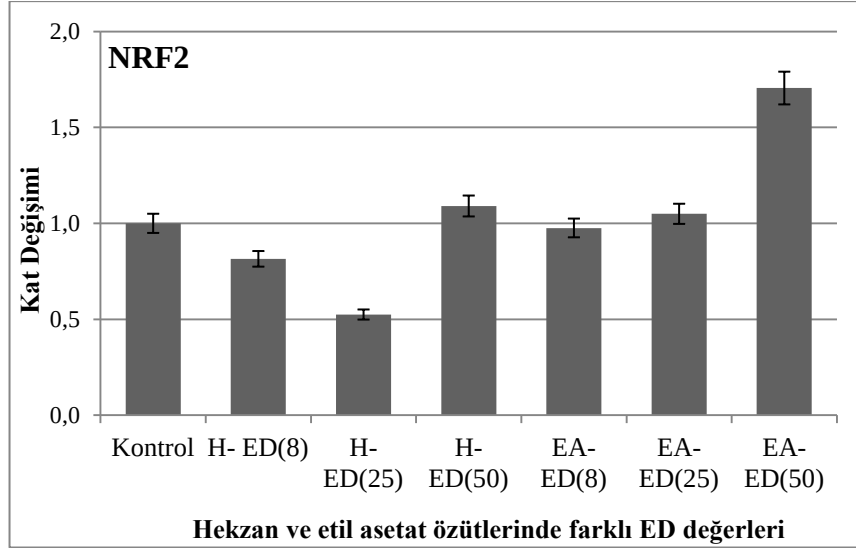
LNCaP hücre hattında belirlenen dozlarda hekzan ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda ilaç metabolizması ile ilişkili olduğu bilinen CAR, NRF2, PXR ve RXR gibi genlerin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Verilerden

elde edilen sonuçlara göre prokarsinojen/karsinojen metabolizmasında önemli spesifik sitokrom P450 izozimlerinin düzenlenmesinde rol alan genlerden CAR geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan özütü için ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,26, 1,12 kat azalış ve 2,23 kat artış elde edilirken, etil asetat özütü için 1,89, 2,48 ve 5,50 kat artış elde edildi (Şekil 3.21). Bu değişimlerden sadece H-ED(50), EA-ED(25) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



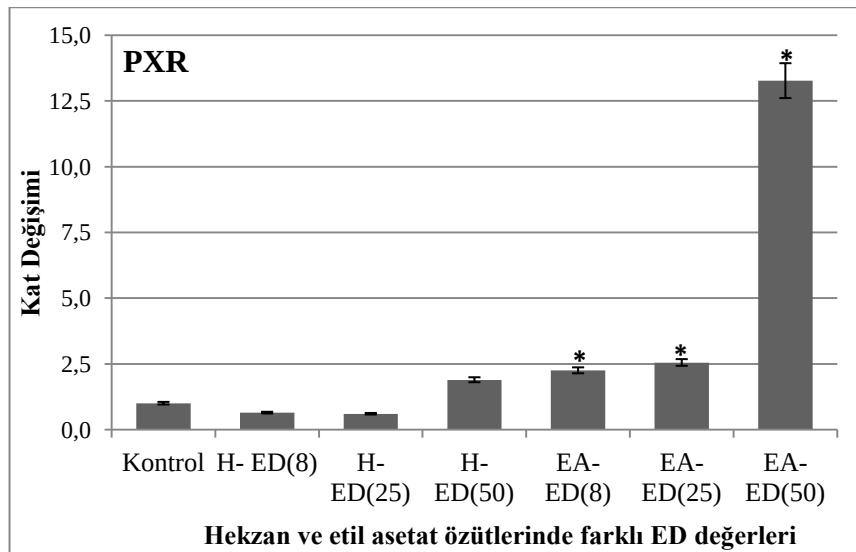
Şekil 3. 21: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında İlaç regülasyonu ile ilişkili CAR geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

İlaç regülasyonu ile ilgili diğer bir gen olan NRF2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü için sırasıyla 1,21, 1,92 kat azalış ve 1,09 kat artış gözlenirken; etil asetat özütü için ED(8) ve (25) uygulamasında bir değişim olmazken ED(50)'de 1,71 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.22). Bu değişimlerden herhangi biri istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 3. 22: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında ilaç regülasyonu ile ilişkili NRF2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

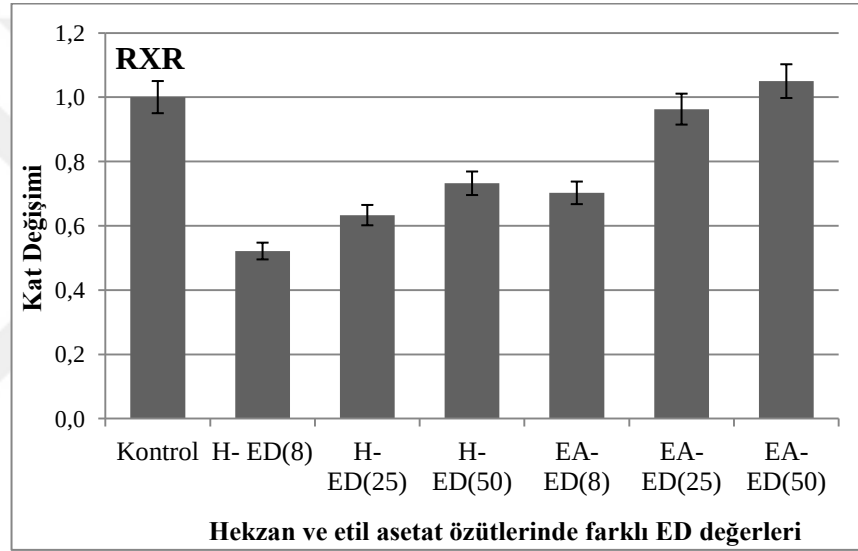
İlaç regülasyonu ile ilgili diğer bir gen olan PXR geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü için sırasıyla 1,56, 1,66 kat azalış ve 1,89 kat artış gözlenirken; etil asetat özütü için 2,25, 2,55 ve 13,27 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.23). Bu artışlardan sadece etil asetat uygulamasındaki ED değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 23: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında ilaç regülasyonu ile ilişkili PXR geninin mRNA

seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Son olarak ta ilaç regülasyonu ile ilgili diğer bir gen olan RXR geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü için sırasıyla 1,92, 1,58 ve 1,36 kat azalış gözlenirken; etil asetat özütü için ED(8)'de 1,42 kat azalışa karşı ED(25) ve (50) uygulamasında değişim elde edilmedi (Şekil 3.24). Bu azalışların hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı değildir.

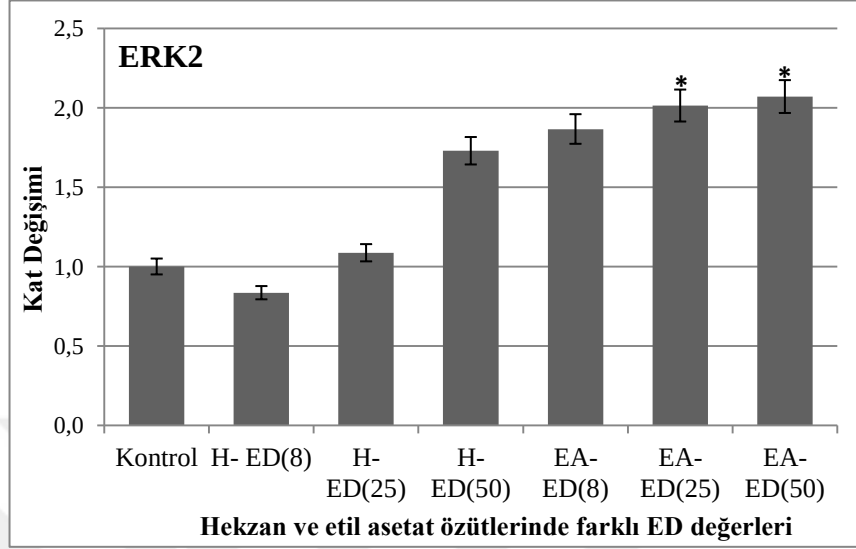


Şekil 3. 24: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında ilaç regülasyonu ile ilişkili RXR geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.5.4 Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolaklarıyla İlişkili Genler

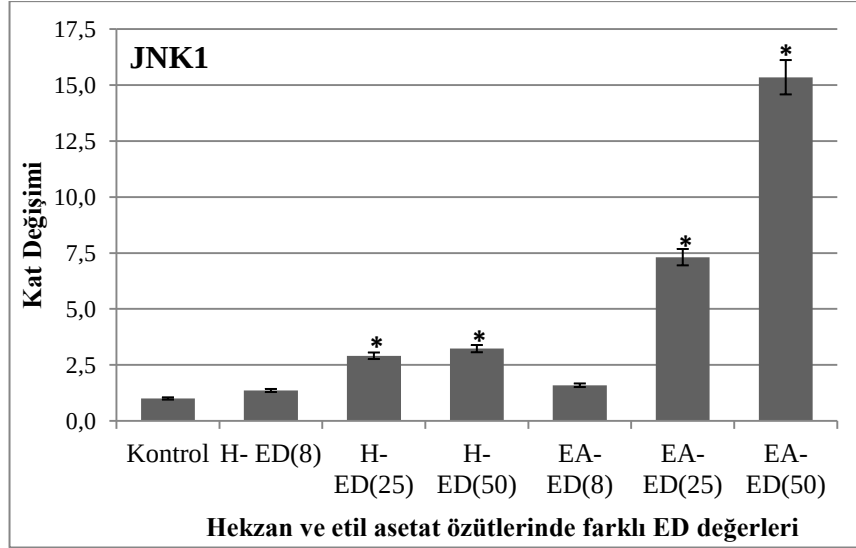
LNCaP hücre hattında belirlenen dozlarda hekzan ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda proliferatif hücre içi sinyal yolaklarıyla ilişkili olduğu bilinen ERK2, JNK1, P38 ve AKT genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Verilerden elde edilen sonuçlara göre; ERK2 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan özütü ED(8) ve (25) uygulamasında değişim gözlenmezken ED(50)'de 1,73

kat artış elde edildi. Etil asetat özütünde ise sırasıyla 1,87, 2,01 ve 2,07 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.25). Bu artışlardan sadece EA-ED(25) ve (50) değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



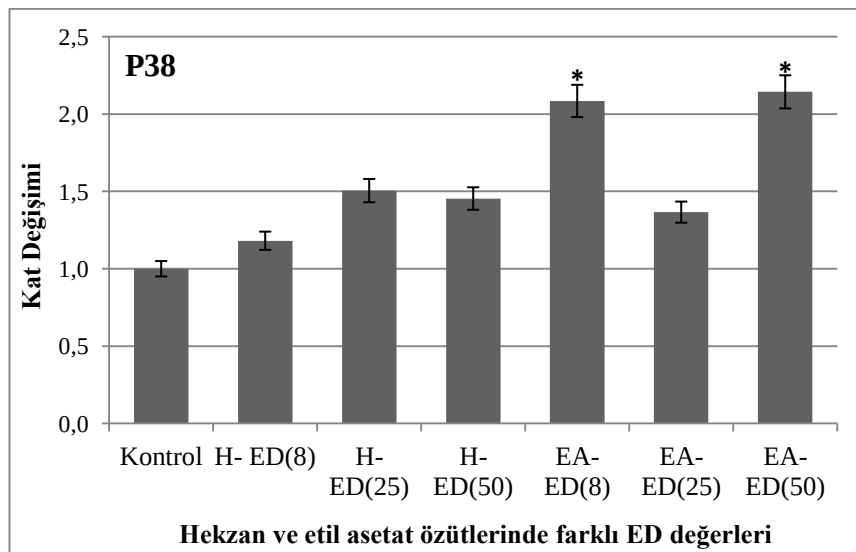
Şekil 3. 25: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yollarıyla ilişkili ERK2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

JNK1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan ve etil asetat özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,36, 2,91, 3,23, 1,59, 7,31 ve 15,35 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.26). Bu artışlardan hekzan ve etil asetat özütlerinin ED(8) değerleri hariç diğer uygulama değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 26: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yollarıyla ilişkili JNK1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

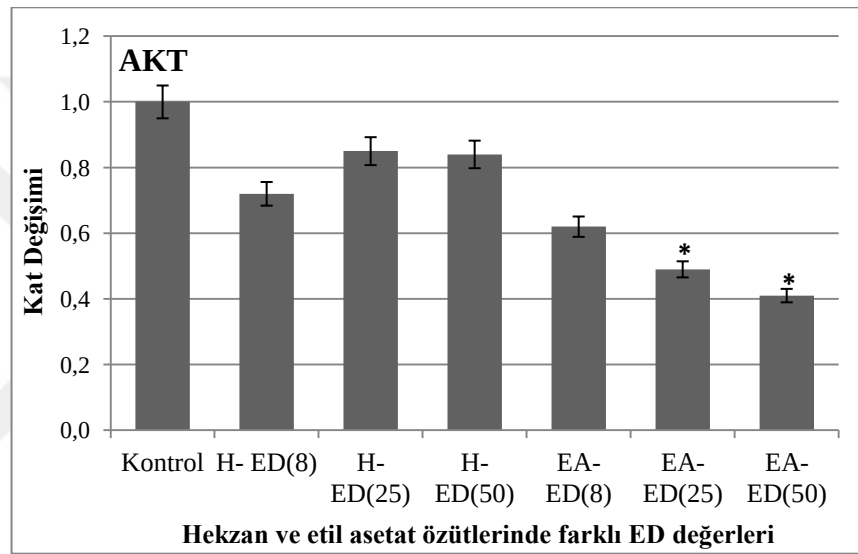
P38 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan ve etil asetat özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,18, 1,51, 1,45, 2,08, 1,37 ve 2,14 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.27). Bu artışlardan sadece EA-ED(8) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 27: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yollarıyla ilişkili P38

geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Son olarak ta AKT geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan ve etil asetat özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,38, 1,17, 1,19, 1,61, 2,04 ve 2,43 kat azalış gözlemlendi (Şekil 3.28). Bu azalışlardan sadece EA-ED(25) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

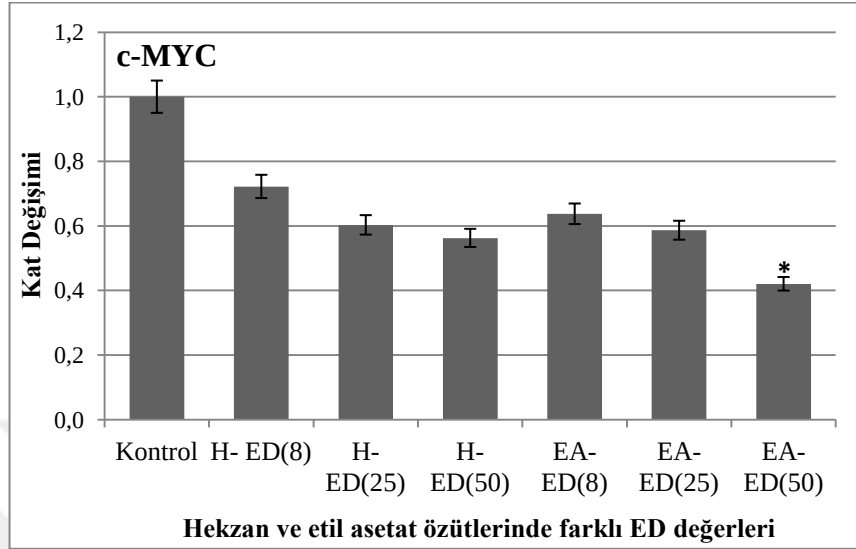


Şekil 3. 28: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yollarıyla ilişkili AKT geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.5.5 Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Genler

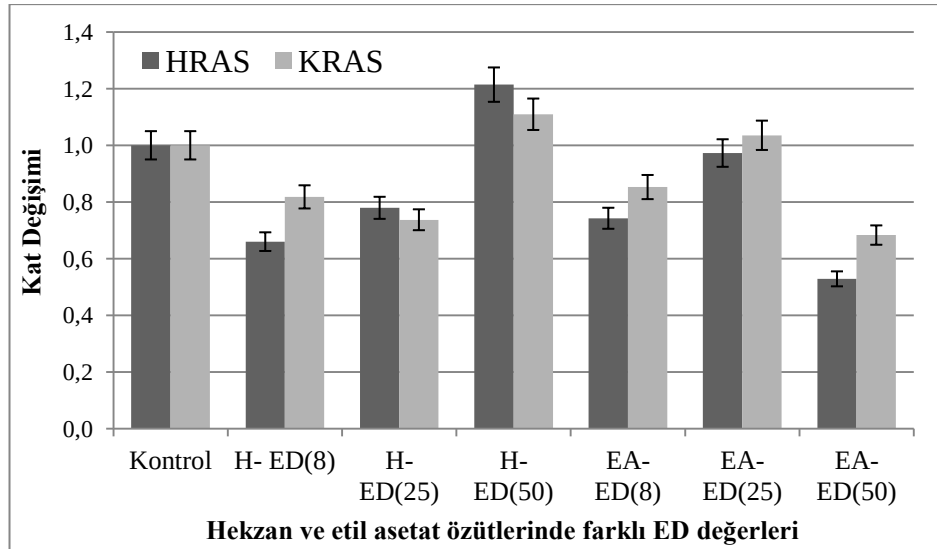
LNCaP hücre hattında belirlenen dozlarda hekzan ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda c-MYC, HRAS ve KRAS gibi onkogenik genlerin ve ABL1, E2F4, PTEN, P53 ve RB gibi tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Verilerden elde edilen sonuçlara göre onkogenik c-MYC geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan ve etil asetat özütü ED(8), (25) ve (50)

uygulamasından sonra sırasıyla 1,38, 1,66, 1,78, 1,56, 1,69 ve 2,38 kat azalış gözlemlendi (Şekil 3.29). Bu azalışlardan sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



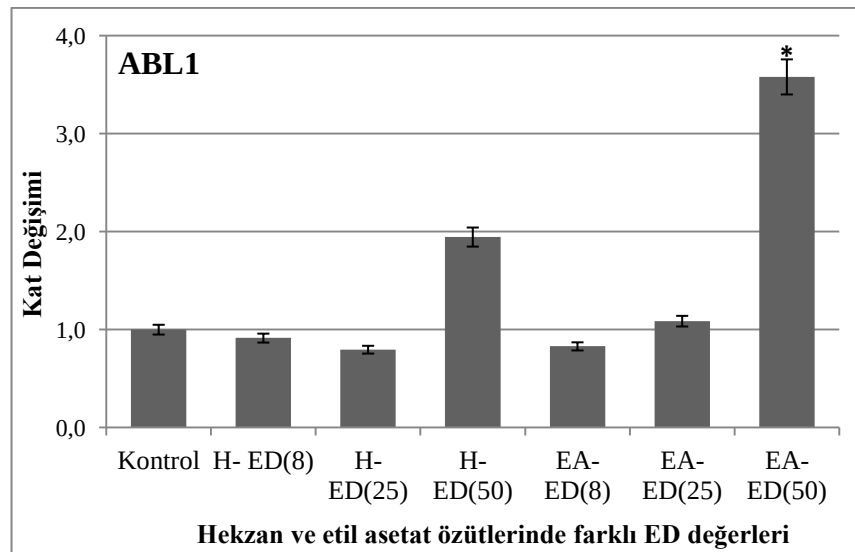
Şekil 3. 29: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında onkogenik bir gen olan c-MYC geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Diğer onkogenik HRAS ve KRAS genlerinde mRNA ekspresyon düzeylerinde HRAS geni için hekzan ve etil asetat özütünde ED(8), (25) ve (50) uygulamalarında sırasıyla 1,51 ve 1,28 kat azalış, 1,21 kat artış, 1,35, 1,03 ve 1,88 kat azalış elde edildi. KRAS geni için yapılan analizlerde ise mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütünde ED(8) ve (25)'te 1,21 ve 1,35 kat azalış tespit edilirken ED(50) uygulamasında 1,11 kat artış elde edildi. Etil asetat özütünde ise ED(25) uygulamasında değişim gözlenmezken ED(8) ve (50)'de sırasıyla 1,17 ve 1,47 kat azalış saptandı (Şekil 3.30). Bu değerlerin hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 3. 30: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında onkogenik bir gen olan HRAS ve KRAS genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

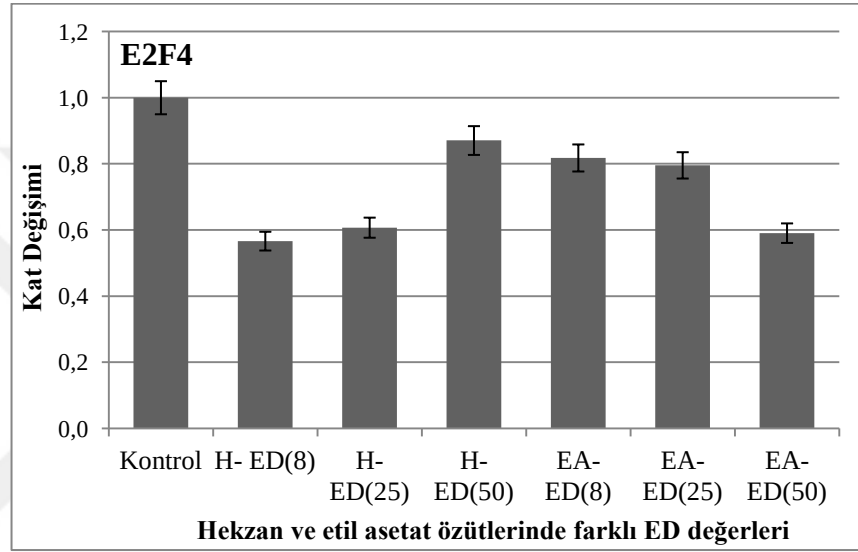
Diğer yandan ABL1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan ve etil asetat özütlerinin ED(8) ve (25) uygulamasında değişim gözlenmezken ED(50)'de sırasıyla 1,95 ve 3,58 kat artış tespit edildi (Şekil 3.31). Bu değişimlerden sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 31: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında ABL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol

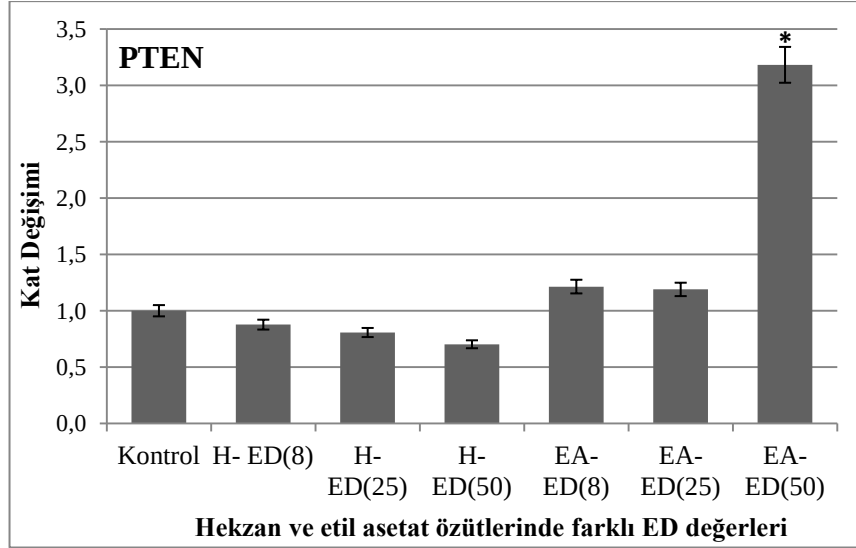
grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

E2F4 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan ve etil asetat özütlerinin ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,75, 1,63, 1,14, 1,21, 1,25 ve 1,69 kat azalış gözlemlendi (Şekil 3.32). Bu azalışların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildir.



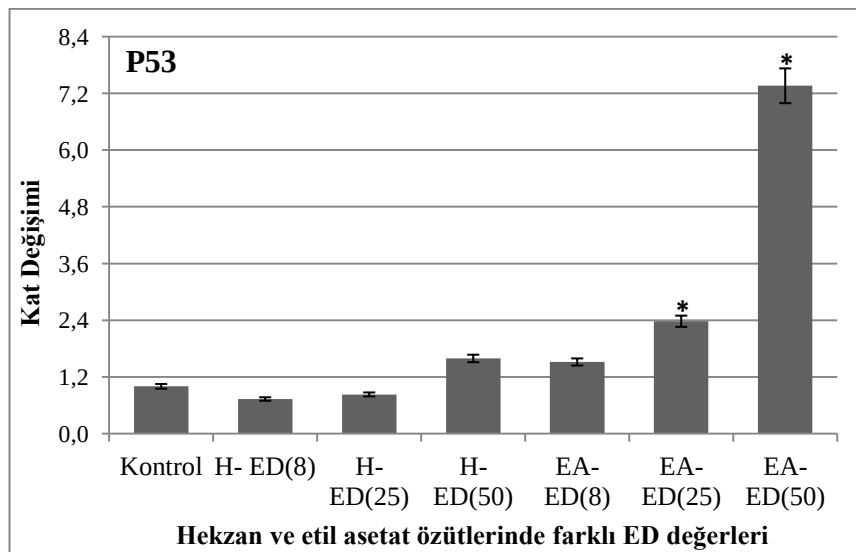
Şekil 3. 32: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında E2F4 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Diğer yandan tümör baskılayıcı PTEN geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan özütü ED(8), (25) ve (50) uygulaması sonucunda sırasıyla 1,13, 1,23 ve 1,42 kat azalış tespit edilirken; etil asetat özütünde ise 1,21, 1,19 ve 3,18 kat artış tespit edildi (Şekil 3.33). Bu artışlardan sadece EA-ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 33: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

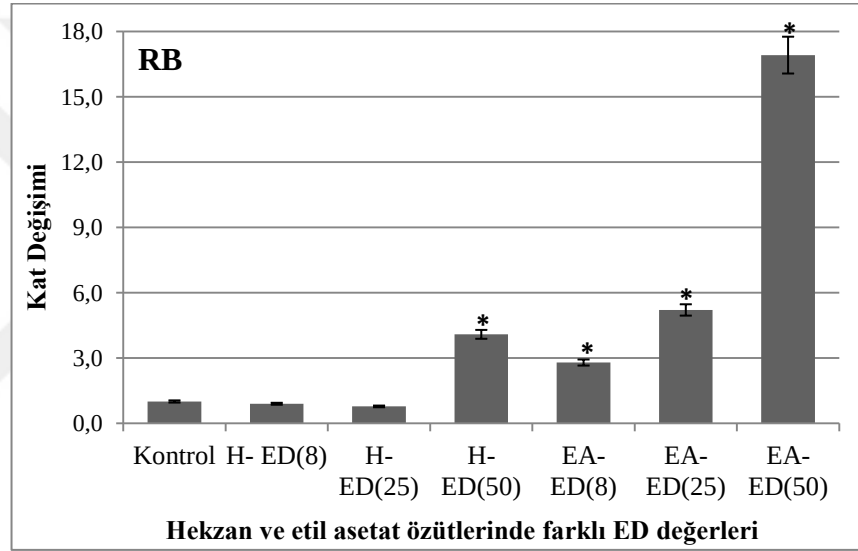
P53 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde ise hekzan özütü ED(8), (25) ve (50) uygulamasında sırasıyla 1,36 ve 1,20 kat azalış, 1,59 kat artış tespit edilirken; etil asetat özütünde 1,52, 2,38 ve 7,36 kat artış saptandı (Şekil 3.34). Bu artışlardan sadece EA-ED(25) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 3. 34: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında tümör baskılayıcı bir gen olan P53 geninin mRNA

seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Son olarak ta RB geninin mRNA ekspresyon düzeyinde hekzan özütü ED(8) ve (25) uygulamasında 1,11 ve 1,29 kat azalış elde edilirken ED(50)'de 4,08 kat artış saptandı. Bunun yanında etil asetat özütünde ise sırasıyla 2,79, 5,21 ve 16,91 kat artış elde edildi (Şekil 3.35). Bu değişimlerden H-ED(8) ve (25) değerleri hariç diğer uygulamalar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

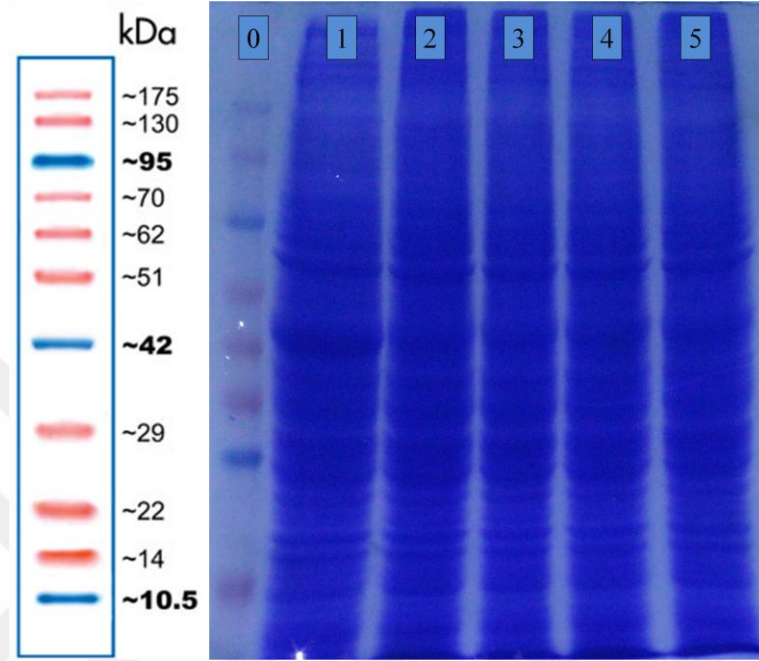


Şekil 3. 35: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattında tümör baskılayıcı bir gen olan RB geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$). Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sonuçlarda değişim oranı artışta >2 'den azalışta ise $<0,5$ 'ten olduğu durumlarda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.6 Immüno blot Analizi

3.6.1 SDS-PAGE Elektroforezi

LNCaP hücre katında kontrol grubuyla beraber hekzan ve etil asetat özütleri için belirlenen etkin doz (ED)'da uygulama yapılan hücrelerin protein profillerini belirlemek için SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı. SDS-PAGE sonucunda 5 farklı grup LNCaP hücre hattına ait proteinler Şekil 3.36'da verilmiştir.

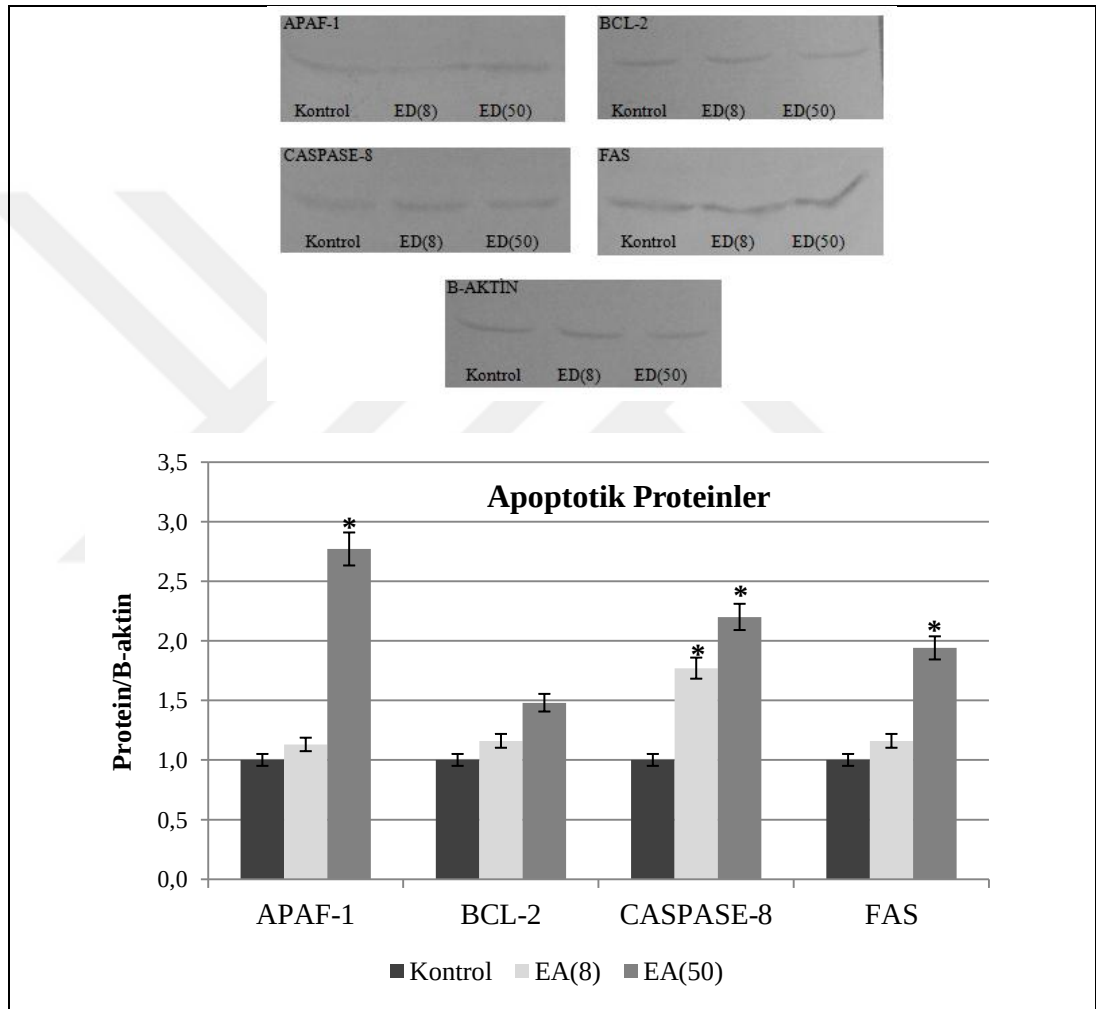


Şekil 3. 36: LNCaP hücre hattında özüt uygulaması sonrasında elde edilen protein profilleri. Hat 0: Protein ladder (Abm,G252), Hat 1: LNCaP hücre hattı kontrol grubu. Hat 2-3: LNCaP hücre hattına sırasıyla hekzan özütü ED(8) ve ED(50) uygulanan gruplar. Hat 4-5: LNCaP hücre hattına sırasıyla etil asetat özütü ED(8) ve ED(50) uygulanan gruplar.

3.6.2 Western Blot Analizi

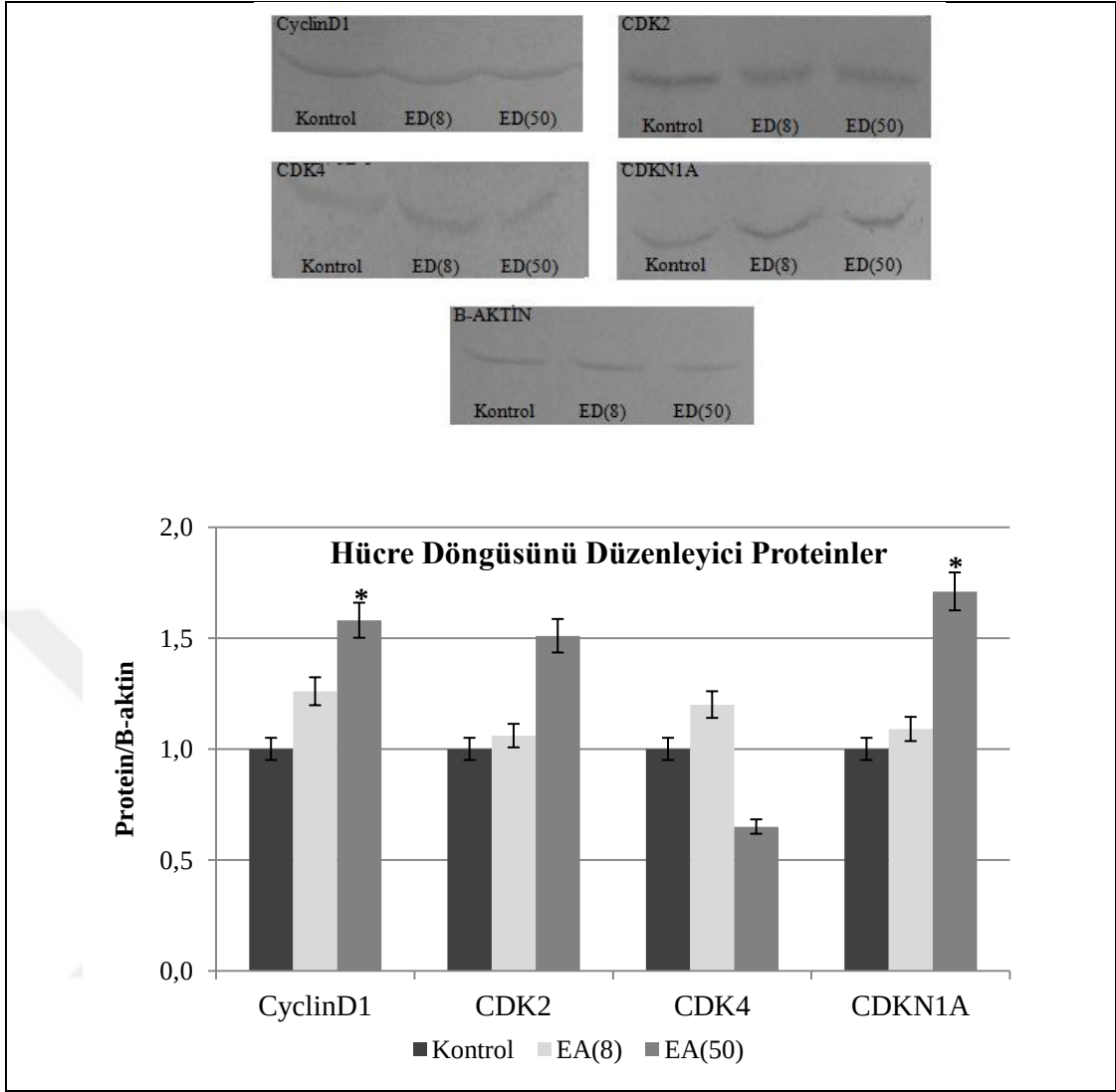
LNCaP hücre hattında *Urtica urens* bitkisinden elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) uygulaması sonucunda apoptoz yolaklarında çeşitli görevleri olan APAF1, BCL-2, CASP-8 ve FAS protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Bu proteinlerin seçiminde mRNA ekspresyon düzeylerindeki anlamlı değişimler etkili olmuştur. Etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulanan LNCaP hücre hattında APAF-1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla 1,13 ve 2,77 kat artış gözlemlendi. BCL-2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulamasında 1,16 ve 1,48 kat artış tespit edildi. Ayrıca caspase-8 protein bantlarının densitometrik

analizi sonucunda protein seviyesinde etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulamasında 1,77 ve 2,20 kat artış gözlemlendi. Son olarak ta FAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulamasında 1,16 ve 1,94 kat artış tespit edildi (Şekil 3.37). Apaf-1 ve FAS genleri için ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; CASP-8 geni için ED(8) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna karşılık, Bcl-2 geni için elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 3. 37: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında apoptotik proteinlerden Apaf-1, BCL-2, Caspase-8 ve FAS protein seviyelerine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

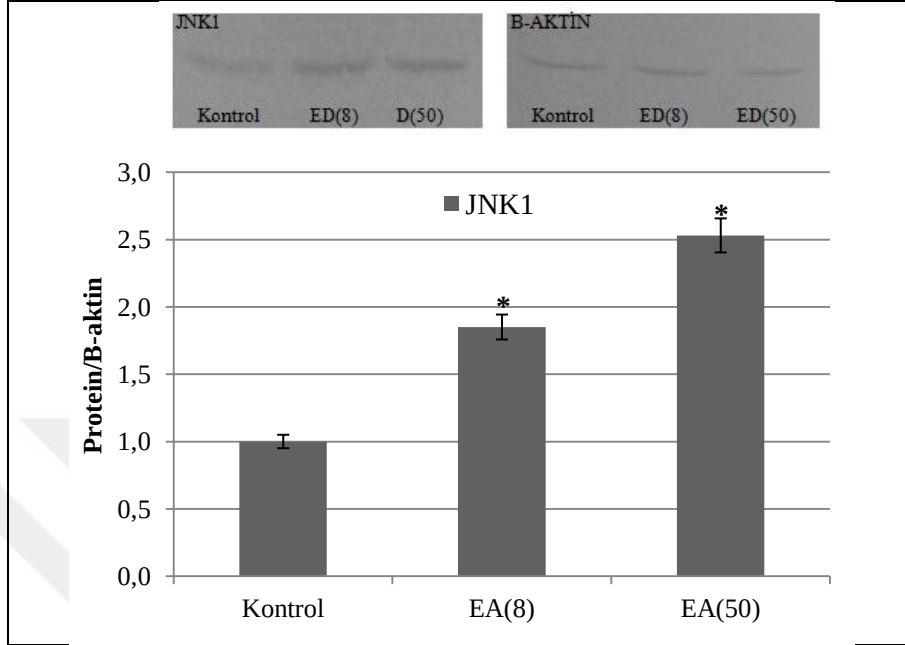
LNCaP hücre hattında *Urtica urens* bitkisinden elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) uygulaması sonucunda hücre döngüsünü düzenleyici görevleri olan CyclinD1, CDK2, CDK4 ve CDKN1A protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Bu proteinlerin seçiminde mRNA ekspresyon düzeylerindeki anlamlı değişimler etkili olmuştur. Etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulanan LNCaP hücre hattında CyclinD1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,26 ve 1,58 kat artış gözlemlendi. CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulamasında 1,06 ve 1,51 kat artış tespit edilirken; CDK4 için bu değerler sırasıyla 1,20 kat artış ve 1,53 kat azalış olarak tespit edildi. Ayrıca CDKN1A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulamasında 1,09 ve 1,71 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.38). Bu artışlardan CyclinD1 ve CDKN1A genleri için ED(50) uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; CDK2 ve CDK4 genleri için elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 3. 38: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında hücre döngüsünü düzenleyici CyclinD1, CDK2, CDK4 ve CDKN1A protein seviyelerine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

LNCaP hücre hattında *Urtica urens* bitkisinden elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) uygulaması sonucunda proliferatif hücre içi sinyal yollarında görev alan ERK2, JNK1 ve P38 protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Bu proteinlerin seçiminde mRNA ekspresyon düzeylerindeki anlamlı değişimler etkili olmuştur. Etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulanan LNCaP hücre hattında JNK1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla 1,85 ve 2,53 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.39). Bu artışlar

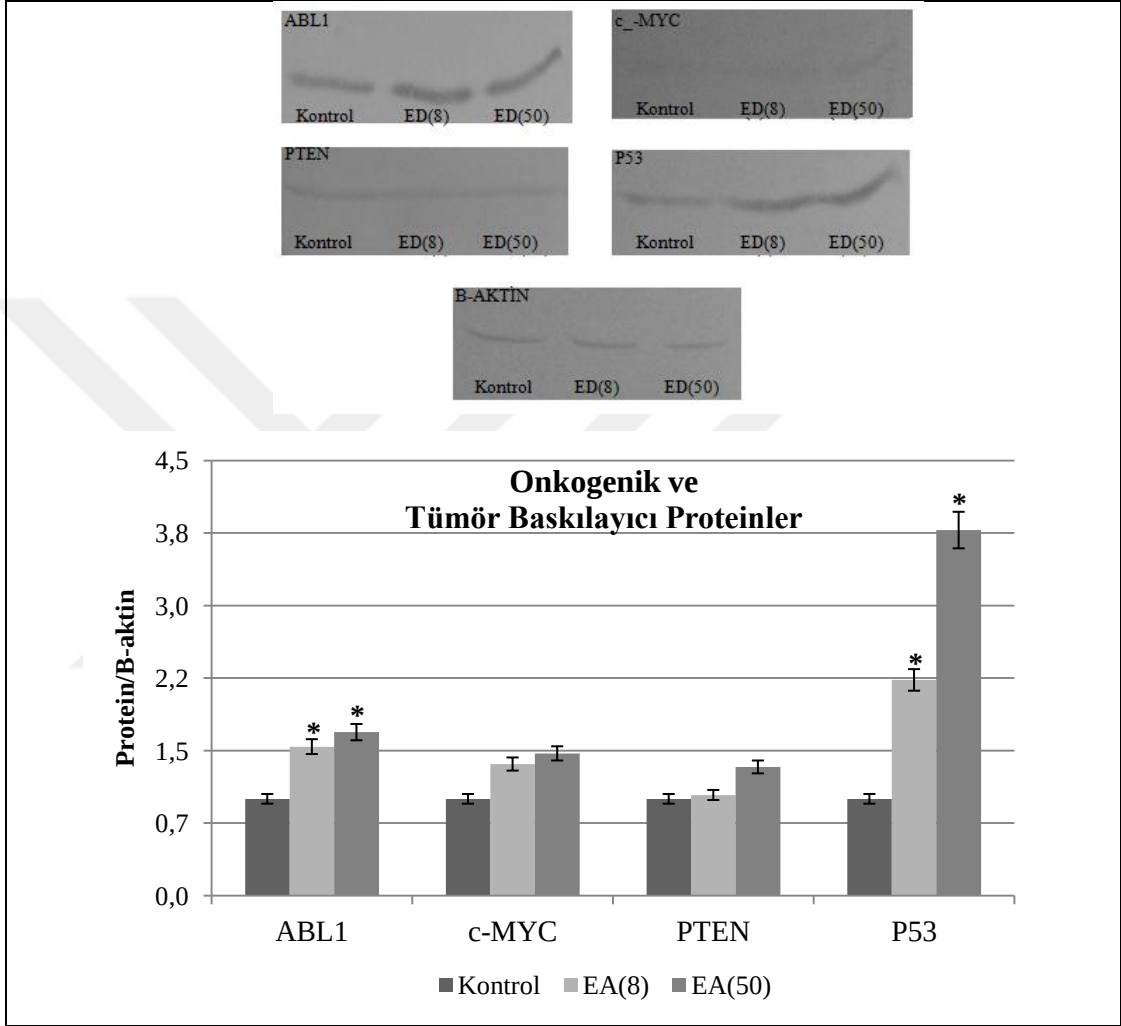
istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer yandan ERK2 ve P38 proteinlerinin western blot analizinde antikordan kaynaklanan sorunlar nedeniyle analiz için uygun sonuçlar elde edilemedi.



Şekil 3. 39: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında proliferatif hücre içi sinyal yolağında görev alan JNK1 protein seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

LNCaP hücre hattında *Urtica urens* bitkisinden elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) uygulaması sonucunda onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinler olan ABL1, c-MYC, PTEN, P53 ve RB protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Bu proteinlerin seçiminde mRNA ekspresyon düzeylerindeki anlamlı değişimler etkili olmuştur. Etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulanan LNCaP hücre hattında ABL1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla 1,54 ve 1,69 kat artış elde edildi. c-MYC protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde etil asetat özütü ED(8) ve (50) uygulamasında 1,36 ve 1,47 kat artış tespit edilirken; PTEN için bu değerler sırasıyla 1,04 ve 1,33 kat artış olarak tespit edildi. Ayrıca P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde etil asetat özütü ED(8) ve (50)

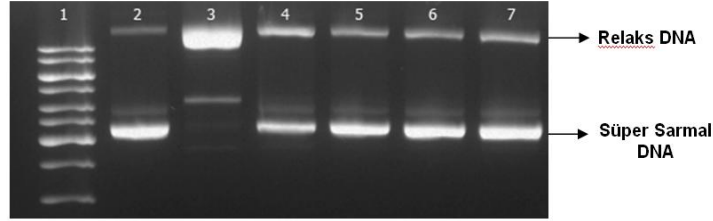
uygulamasında 2,23 ve 3,78 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.40). Ancak RB proteininin western blot analizinde antikordan kaynaklanan sorunlar nedeniyle analiz için uygun sonuç elde edilemedi. ABL-1 ve P53 genleri için ED(8) ve (50) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulunurken; c-MYC ve PTEN genleri için elde edilen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.



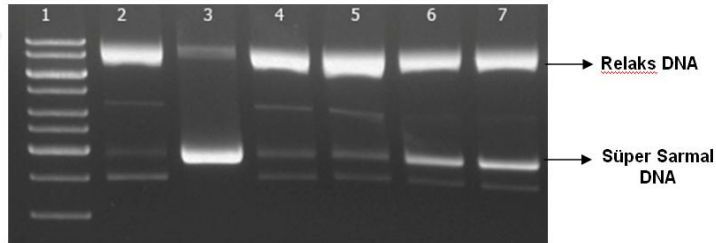
Şekil 3. 40: Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün ED(8) ve (50) değerlerinin LNCaP hücre hattında onkogenik ve tümör baskılayıcı ABL1, c-MYC, PTEN ve P53 protein seviyelerine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

3.7 Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)’ndan elde edilen özütlerin Topoizomeraz I ve II enzimlerine olan inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Topoizomeraz I relaksasyon analizinde hekzan ve etil asetat özütleri 2,5µg/ml gibi düşük konsantrasyonlar da dahi Topoizomeraz I üzerinde inhibisyon etkisi göstermektedir (Şekil 3.41 ve 3.42).

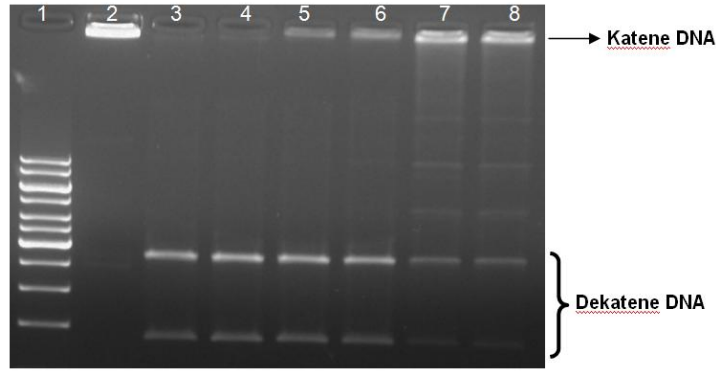


Şekil 3. 41: Değişik konsantrasyonlardaki *Urtica urens* yapraklarından elde edilen hekzan özütünün Topoizomeraz I enzimine etkisi. Hat 1: DNA ladder; Hat 2: 0,3 µg pBR322 DNA + %0,1 DMSO; Hat 3: 0,3 µg pBR322 DNA + 3 ünite Topoizomeraz I + %0,1 DMSO; Hat 4-7: 0,3 µg pBR322 DNA + 3 ünite Topoizomeraz I + 5, 12,5, 25 ve 50 µg/ml hekzan özütü.

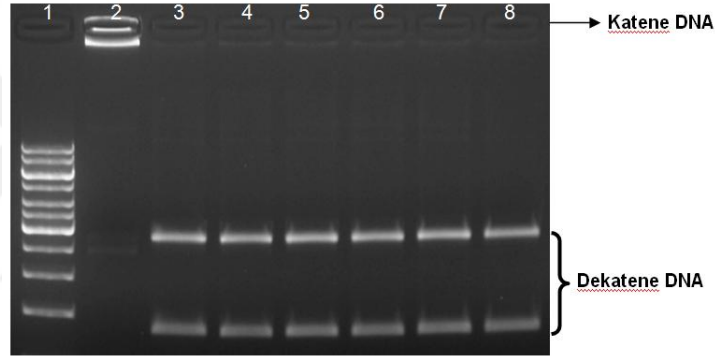


Şekil 3. 42: Değişik konsantrasyonlardaki *Urtica urens* yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün Topoizomeraz I enzimine etkisi. Hat 1: DNA ladder; Hat 2: 0,3 µg pBR322 DNA + 3 ünite Topoizomeraz I + %0,1 DMSO; Hat 3: 0,3 µg pBR322 DNA + %0,1 DMSO; Hat 4-7: 0,3 µg pBR322 DNA + 3 ünite Topoizomeraz I + 5, 12,5, 25 ve 50 µg/ml etil asetat özütü.

Tüm bunlara ek olarak, çalışma kapsamında Tip II topoizomeraz enzimi ile yapılan topoizomeraz dekatasyon testleri ile ısırgan otundan elde edilen özütlerin herhangi bir inhibisyon etkisi olup olmadığı belirlendi. Analiz sonuçlarına göre, etil asetat özütünde herhangi bir inhibisyon etkisi gözükmez iken, hekzan özütünde yüksek bir inhibisyon gözlemlendi (Şekil 3.43 ve 3.44).



Şekil 3. 43: Değişik konsantrasyonlardaki *Urtica urens* yapraklarından elde edilen hekzan özütünün Topoizomerez II enzimine etkisi. Hat 1: DNA marker; Hat 2: 0,35 µg kDNA + %0,1 DMSO; Hat 3: 0,35 µg kDNA + 4 ünite Topoizomerez II + %0,1 DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 kDNA + 4 ünite Topoizomerez II + 5, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml hekzan özütü.

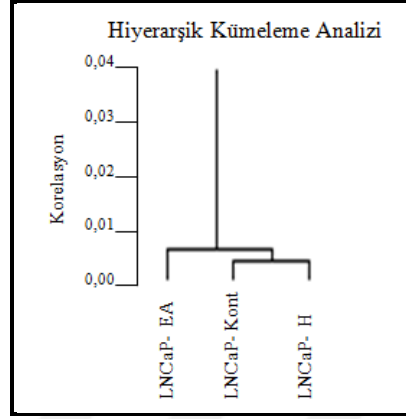


Şekil 3. 44: Değişik konsantrasyonlardaki *Urtica urens* yapraklarından elde edilen etil asetat özütünün Topoizomerez II enzimine etkisi. Hat 1: DNA marker; Hat 2: 0,35 µg kDNA + %0,1 DMSO; Hat 3: 0,35 µg kDNA + 4 ünite Topoizomerez II + %0,1 DMSO; Hat 4-8: 0,3 kDNA + 4 ünite Topoizomerez II + 5, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/ml etil asetat özütü.

3.8 Transkriptom Analizleri

LNCaP hücre hattında *Urtica urens* yapraklarından elde edilen hekzan ve etil asetat özütleri için belirlenen ED(50) değerleri uygulana hücreler 48 saat sonrasında toplanarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen RNA örnekleri transkriptom analizleri için Done Genetik firmasına gönderilmiştir. Analiz kapsamında numunelerin cRNA dönüşümleri yapılarak Illumina iScan platformunda 47 binden fazla prob kullanılarak, Human HT-12 V4 Beadçip ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır.

Ek olarak normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu Şekil 3.45'te verilmiştir. Hiyerarşik kümeleme 'Correlation-average' yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur.



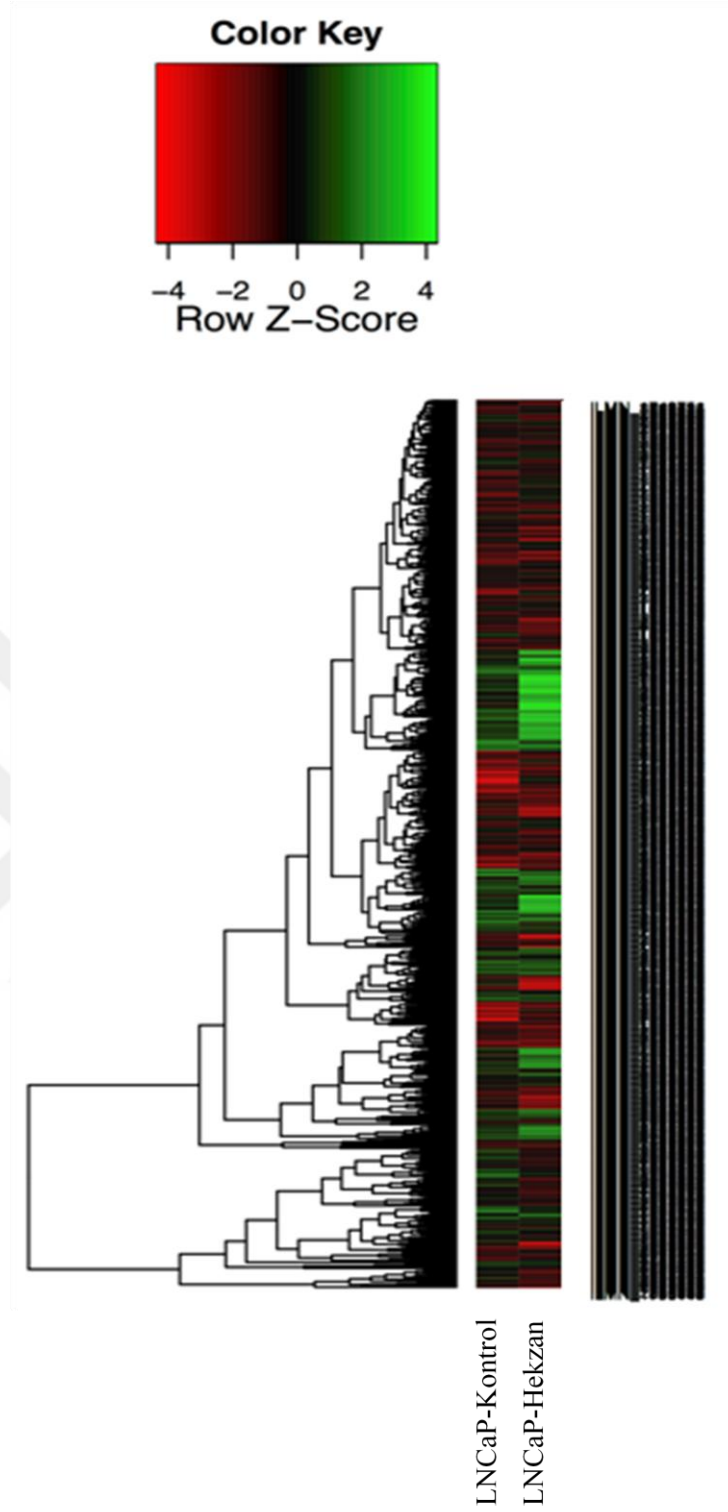
Şekil 3. 45: Correlation-average yaklaşımı kullanılarak oluşturulan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu.

Ön analizin tamamlanmasından sonra elde edilen veriler kullanarak oluşturulan örnekler gruplandırılarak diferansiyel ekspresyon analizi yapıldı. Farklı gen anlatımı gösteren problemlerin belirlenmesinde Rank Product metodu kullanıldı. Analizler yapılırken test örnekleri kontrol örnekleri ile karşılaştırıldı. Çalışmada örnek bazında sadece teknik replikalar altgrupları oluşturduğundan dolayı; problemlerin ekspresyon ölçümlerindeki 'kat değişim' (Fold Change) miktarları göz önünde bulunduruldu. Tablo 3.7'de özütler ve kontrole göre kat değişim limitleri ve bu limitin üzerinde değişim gösteren prob sayıları verilmektedir.

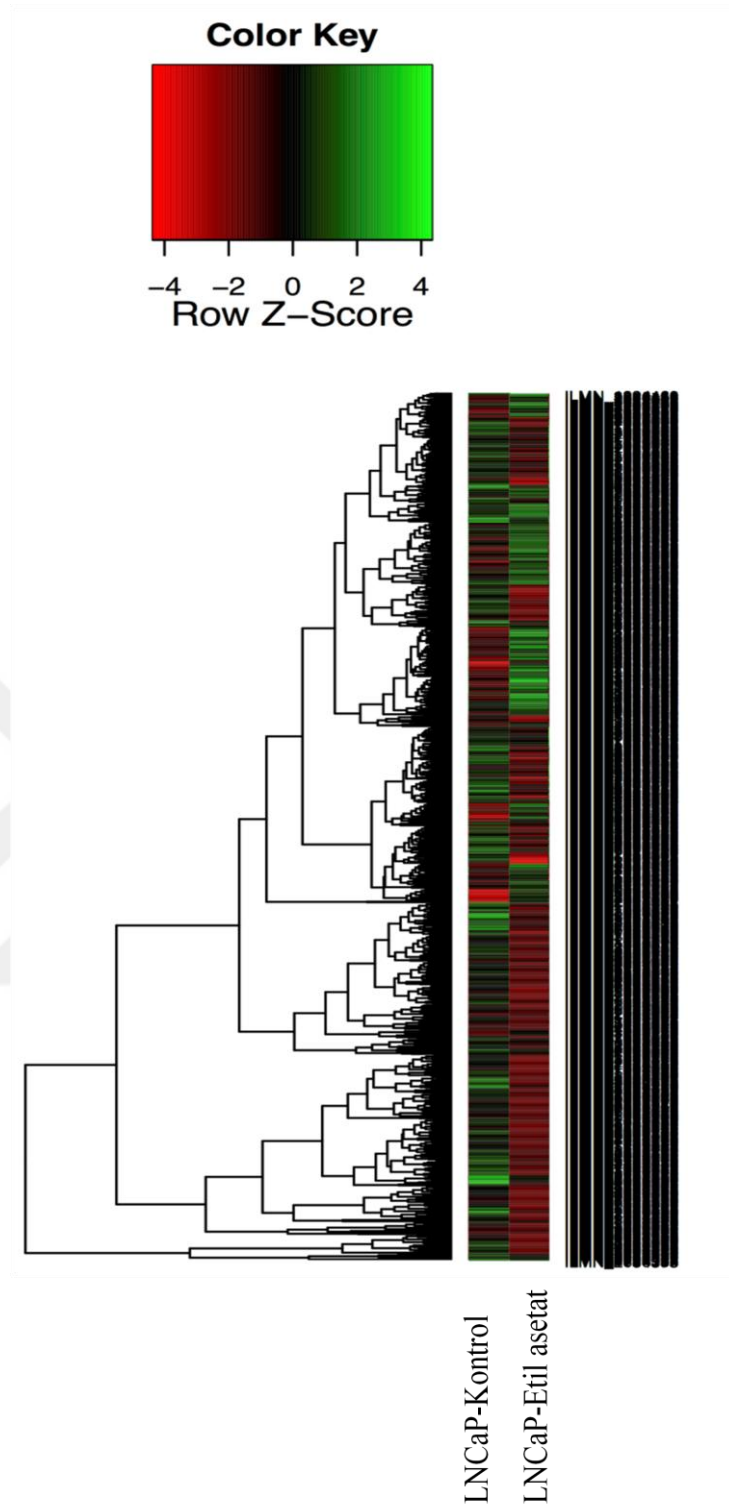
Tablo 3. 7: Özütlerin kontrole göre kat değişim limitleri ve bu limitin üzerinde değişim gösteren problemlerin sayısı.

Test örneği	FC filtresi	Tespit edilen prob sayısı
Hekzan özütü	2	1051
Etil asetat özütü	2	1320

Her ikili karşılaştırmada anlamlı değişim tespit edilen yukarıdaki tabloda sayıları verilen problemler ve ekspresyon seviyeleri kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme genlerin ve örneklerin ekspresyon paternlerine göre gruplandırılması yapıldı ve 'heatmap' oluşturuldu (Şekil 46-47).



Şekil 3. 46: Tüm genom transkriptom analizleri sonucunda LNCaP hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heatmap analizi.



Şekil 3. 47: Tüm genom transkriptom analizleri sonucunda LNCaP hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heatmap analizi.

Yapılan ileri analizler ile LNCaP hücre hattında örneklerin ekspresyon seviyelerine göre filtre uygulandı. Normalize edilen toplam 47.222 adet probdan, sinyal yoğunluk değeri %20'nin altındaki problemler filtrelendi. Geriye kalan 41.917 prob ile çalışmaya devam edildi. Kontrol grubu, diğer gruplarla karşılaştırıldı. Fold Change (FC) değerleri analiz Grubu/kontrol Grubu olarak hesaplandı. FC filtresi tüm gruplarda 2 olarak alındı. İlgili yollar gösterildi. Gen ontolojisi (GO) analizlerinde p değeri 0.05'den düşük olan problemler anlamlı olarak kabul edildi.

Kontrol grubuyla hekzan grubunun filtrelenmiş örneklerinin FC analizi sonucunda 1 prob anlamlı olarak bulunmuştur (Tablo 3.7). Çıkan anlamlı prob ile yapılan yolk analizi sonucu anlamlı bir yolk değişimi bulunmamıştır. p değeri 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 3. 8: Kontrol ve hekzan özütü uygulamasının filtrelenmiş örneklerinin FC analizi.

Prob ID	FC	Log FC	FC (abs)	Regülasyon	Sembol	Chr
3890577	-2,082863	-1,058568	2,082863	down	LOC100132761	chr13

Son olarakta kontrol grubuyla etil asetat grubunun filtrelenmiş örneklerinin FC analizi sonucunda 24 prob anlamlı olarak bulunmuştur (Tablo 3.8). Çıkan anlamlı problemler ile yapılan yolk analizi sonucunda Tablo 3.9'da verilen yollar anlamlı olarak bulunmuştur. p değeri 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 3. 9: Kontrol ve etil asetat özütü uygulamasının filtrelenmiş örneklerinin FC analizi.

Prob ID	FC	Log FC	FC (abs)	Regülasyon	Sembol	Chr
5860152	-2,4225132	-1,2765045	2,4225132	down	CD44	chr11
5130674	-3,0736058	-1,6199322	3,0736058	down	CSE1L	chr20
7000634	-3,1028214	-1,6335807	3,1028214	down	CSE1L	chr20
1690553	-2,182154	-1,1257529	2,182154	down	EPCAM	chr2
6100324	-2,0868146	-1,0613024	2,0868146	down	TMEM126B	chr11
1980309	-2,3514218	-1,2335334	2,3514218	down	IL8	chr4
4070575	-2,3241534	-1,2167053	2,3241534	down	TACSTD1	chr2
2000193	-2,1209886	-1,0847368	2,1209886	down	CUL2	chr10

650326	-2,0048397	-1,0034869	2,0048397	down	TFAM	chr10
7550484	-2,464165	-1,3010988	2,464165	down	SRGN	chr10
360500	-2,4380383	-1,2857208	2,4380383	down	SRGN	chr10
3370577	-2,4278893	-1,2797027	2,4278893	down	APP	chr21
4670059	-2,1520655	-1,105722	2,1520655	down	ZAK	chr2
1070215	-2,260914	-1,1769061	2,260914	down	CAV1	chr7
3460324	-2,1459394	-1,1016092	2,1459394	down	PSMA3	chr14
830661	-3,0822906	-1,6240029	3,0822906	down	DCBLD2	chr3
60132	-3,6406457	-1,8641944	3,6406457	down	DCBLD3	chr3
6620487	-2,2529895	-1,1718407	2,2529895	down	CXCL6	chr4
3120743	-2,1036522	-1,0728962	2,1036522	down	LAMP2	chrX
3170594	-2,6593332	-1,4110646	2,6593332	down	MAL2	chr8
1440343	-2,1553855	-1,1079459	2,1553855	down	TMEM209	chr7
2710730	-2,175075	-1,1210651	2,175075	down	PLS3	chrX
6520215	-2,783397	-1,4768467	2,783397	down	ANXA1	chr9
610437	-2,515921	-1,3310866	2,515921	down	CD24	chrY

Tablo 3. 10: Kontrol ve etil asetat özütü uygulamasının filtrelenmiş örneklerinin FC analizinden elde edilen anlamlı problemlerle yapılan yolak analizi.

Yolak	p-değeri
Yaşlılık ve Otofaji	1,99E-05
GPCR Ligand Bağlama	3,78E-05
GPCR Downstream Sinyali	5,36E+02
PKC ve MAP K üzerinden Gastrin-CREB Sinyali	0,002537892
İleri Glikosilasyon son ürün Reseptör Sinyali	0,006334171
TAK1 ile aktive edilen NFkB ile IKKs Kompleksinin Fosforilasyonu ve Aktivasyonu	0,006860276
Nitrik Oksit Metabolizması	0,008962025
Mitokondriyal Gen Ekspresyonu	0,010011298
Hipoksi-indüklenebilir Faktör (HIF)' ün Oksijen ile Regülasyonu	0,010535534
ATF4 ile Genlerin Aktivasyonu	0,01315272
Prostaglandin Sentezi ve Regülasyonu	0,016284572
Glikozaminoglikan Metabolizması	0,016805619

Nükleotid bağlanma bölgesi olan, lösine zengin tekrarlar içeren reseptör (NLR) Sinyali	0,018887157
Yağ Sindirimi, Mobilizasyonu ve Taşınımı	0,019406881
Enerji Metabolizması	0,024072511
TSLP Sinyal Yolağı	0,024589598
IL-3 Sinyal Yolağı	0,02562298
Apoptoz Regülasyonu	0,027686596
IFN-alfa-beta yolaklarının RIG-I-MDA5 aracılığıyla uyarımı	0,028716829
Yıkım Kompleksi tarafından Betakateninin Yıkımı	0,029231552
Ekstraselüler Matriks Organizasyonu	0,030260213
Patojen ilişkili DNA Sitozolik Sensörleri	0,031801242
Proteozom Yıkımı	0,031801242
DNA Replikasyonun Regülasyonu	0,035387844
RNA Polimeraz I, RNA Polimeraz III ve Mitokondriyal Transkripsiyon	0,039471198
M-G1 Fazına Geçiş	0,03998045
Hücre Döngüsü Proteinlerinin APC-C ilişkili Yıkımı	0,040489443
Au zengin elementler bağlı proteinlerce mRNA Stabilitesinin Regülasyonu	0,042014863
Sınıf I MHC ilişkili Antijen Prosesi ve Sunumu	0,043030515
SIDS Duyarlılık Yolağı	0,044045135
Androjen Reseptörü Sinyal Yolağı	0,045565132
Vasküler Duvarda Hücre Yüzey Etkileşimleri	0,045565132
DNA Sentezi	0,04758818
WNT Sinyal Yolağı	0,048598163

4. TARTIŞMA

Prostat kanseri tüm dünya ülkelerinde erkeklerde en sık görülen kanser türü olup, kanserin yol açtığı ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Prostatın tümörleşmesinde, normal homeostatik kontrol mekanizmalarının kaybı rol oynamaktadır. Diyet, infeksiyon ve kronik inflamasyon, değişen hormon seviyeleri ve toksik kimyasallar gibi dış etkenler, büyüme ve farklılaşmada görev alan sinyal yollarında değişimlere ve prostat hücrelerinin tümörleşme yönünde büyümesine neden olmaktadır. Bunlara ek olarak normal bir prostat hücresinin neoplastik transformasyonunda etkili olan mekanizmalardan biri de, tümör baskılayıcı genlerin işlev kayıplarıdır. Bu hasar, proliferatif sinyal yollarında aktivasyon ve/veya apoptotik sinyal yollarındaki baskılanma ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, ileri evre kanserlerde de, hücrenin migrasyon ve invazyon yeteneğinin artmasıyla sonuçlanan bazı moleküler sinyal değişimleri de, yine tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon eksikliğinden kaynaklanabilmekte ve metastatik kanser oluşumunu tetiklemektedir.

Son yıllarda modern tıp uygulamalarındaki ciddi gelişmeler ile birlikte modern tıp uygulayıcılarının alternatif tedavi yöntemlerine bakış açısı bilimsel çerçevede sorgulama ve hastaya katkı sağlayabilecek kanıtlanmış uygulamaları klinik pratiklerine dahil etmeye başlamak yönünde ilerlemiştir. Bilimsel ve etik uygulamalar dahilinde kanser gibi tedavi ve takip süreci son derece güç olan bir hastalıkta hastanın tedavi başarısına ve yaşam kalitesine katkı sağlayan yöntemlerin aranması ve denenmesi kaçınılmaz olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde alternatif tedavi yöntemleri için Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute)'ne bağlı kanser tamamlayıcı ve alternatif tıp ofisi (OCCAM) ve Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health)'ne bağlı ulusal tamamlayıcı ve alternatif tıp merkezi (NCCAM) kurulmuş ve bu kurumlar ile de bilimsel alandaki birçok yöntem sorgulanmaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemleri konusunda bir kavram karmaşası yaşanmaktadır. Bu nedenle de bu kavramlar birbirinden ayrı kullanılmalı ve açıkça tanımlanmalıdır.

Bunun sonucunda, günümüzde çoğunluğu bitkisel preparatlar olan alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artmakta, hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. ABD’de zaman içinde artan ve son yıllarda topluma 40 milyar dolar maliyeti aşan alternatif tedavi yöntemleri ulusal stratejilerin gelişmesine ve bu yöntemlerin bilimsel çerçevede sorgulanmasına neden olmuştur. Bu duruma verilebilecek en iyi örnek NCI tarafından 1971 yılında ABD’de yetişen *Taxus brevifolia*’nın kabuğundan izole edilen taxol bileşiğidir ve bu bileşik FDA tarafından 1992 yılında ovaryum ve 1994 yılında da meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, ülkemizde alternatif ve tamamlayıcı tedavide yaygın bir şekilde kullanılan ancak fitokimyasal bileşenleri bilinmeyen *Urtica urens* (küçük ısırgan otu) bitkisinin antikarsinojenik etki mekanizmalarına ışık tutmak hedeflenmiştir. Literatürde *Urtica urens* ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup olası antikarsinojenik etkisinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması dışında antienflamatuar, antinosiseptiv etkili olduğu yönündedir (Marrassini ve diğ. 2010). Yapılan diğer bir çalışmada *Urtica urens*’in karsinojen/prokarsinojen ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 izozimleri ile bazı Faz II enzimlerinin enzim aktiviteleri ile protein ve mRNA seviyelerini etkilediğini göstermiştir (Özkarslı ve diğ. 2008, Agus ve diğ. 2009). Önemli bir kimyasal karsinojen olan 3-metilkolantren uygulanması ile indüklenen CYP1A1/1A2’in ısırgan tohumlarından hazırlanan ekstre verilmesiyle baskılandığı bu çalışmalar ile belirlenmiştir (Özkarslı ve diğ. 2008). Ayrıca, benzen, piridin, nitrozaminler gibi birçok düşük moleküler ağırlıklı prokarsinojenik maddelerin metabolizmasında rol oynayan CYP2E1 izozimi ekstre uygulanması sonucunda önemli derecede inhibe olmuştur (Agus ve diğ. 2009). Fakat bu izozimlerin ısırgan tohumu ekstresi sonucunda inhibisyonun moleküler mekanizması hakkında bir bilgi yoktur. Bu anlamda *Urtica urens* bitkisinin seçiminde öncelikle halk arasında özellikle kanser hastalarında çok fazla kullanılması sonrasında ise literatürde antikarsinojenik ve antioksidant etki mekanizmaları hakkında veri bulunmaması önemli olmuştur.

Urtica urens yapraklarından hekzan, kloroform ve etil asetat çözücülerini kullanılarak elde edilen ekstrelerin GC-MS ve LC-MS teknikleri kullanılarak içerik

analizleri yapılmıştır. GC-MS ile hekzan özütünün analizinde majör bileşen olarak %93,01 oranında genellikle yağ asidi ve basit alken ağırlıklı 13 adet bileşik tespit edilmiştir (Tablo 3.1). İnflamatuvar eikozanoidler, sitokinler ve reaktif oksijen türlerinin üretimindeki azalma ile birlikte tümör hücrelerindeki inhibitör etkisinden dolayı birçok yağ asidi antikanser ilaçlara ek olarak kullanılır (Hunt ve Dean 1989, Calder 2006, Deckelbaum ve diğ. 2006). Örneğin, doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarının fonksiyonu ve yapısı üzerindeki geniş etkileri (Szachowicz-Petelska ve diğ. 2007) dışında birde pankreatik adenokarsinoma hücrelerine (Pettersson ve diğ. 2002), neoplastik hücrelere (Germain ve diğ. 1998) ve lenfositlere (Kageyma ve diğ. 1989) karşı sitotoksik etkisi de belirtilmiştir. Yağ asidi profilinde tespit edilen çoklu doymamış yağ asitleri, %28,11 gama-linoleik asit (GLA), %8,34 linoleik asit (LA) ve %5,91 oranında daha doymamış yağ asidi olan araşidik asittir. Yapılan bir araştırmada GLA, Tamoxifen adlı meme kanserinde kullanılan ilaçla birlikte kullanılmış ve hastaların ilaca yanıt verme oranında artış tespit edilmiştir (Kenny ve diğ. 2001). Başka bir çalışmada ise GLA'nın kronik lösemi K562 hücre hattında lipid peroksidasyonunu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu indüklediği saptanmıştır (Ge ve diğ. 2009). Farklı tümör hücreleri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada da *Euphorbia kansui* bitkisinden ekstrakte edilen LA'nın membran bütünlüğünün bozulması ve tümör hücresinde apoptozun indüklenmesi ile antitümör etkisi gösterdiği bulunmuştur (Farong ve diğ. 2008). *Urtica urens* bitkisinden elde edilen hekzan özütünün de içeriğindeki doymamış yağ asitlerinden ve eser miktarda bulunan diğer bileşiklerden dolayı antikanser etkisi gösterebileceği düşünülmektedir. Bunların dışında LC-MS ile kloroform ve etil asetat özütlerinin içerik analizinde kloroform özütüne kıyasla etil asetat özütünde daha çok fenolik bileşik tespit edilmiştir (Tablo 3.2). Bitkilerde bulunan birçok doğal fenolik bileşiklerin (özellikle flavonoidler) kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan birçok genin, protein ve gen ekspresyon seviyelerini değiştirdikleri, bu sayede antikarsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli bitkilerden elde edilen bu bileşiklerin pankreas, akciğer, deri, tiroid ve göğüs kanseri hücre hatlarında mitokondrial yolak aktivasyonu ile Bax/Bcl-2 oranını artırarak (Kang ve diğ. 2010, Shin ve diğ. 2010, Wang ve diğ. 2010, Zhang ve diğ. 2009) antikanser etki gösterdiği saptanmıştır.

Çalışma kapsamında yapılan içerik analizleri sonucunda *Urtica urens* bitkisine ait hekzan ve etil asetat özütlerinin antikanser etki mekanizmalarını aydınlatabilmek amacıyla androjen bağımlı prostat kanseri olan LNCaP hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri ve farklı yollara ait 31 genin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakılmıştır. Yapılan sitotoksikite deneyi sonucunda hekzan özütünde ED(50) değeri 42,77 µg/ml olarak saptanırken bu değer etil asetat özütü için daha düşük olup 33,96 µg/ml olarak saptanmıştır. Ayrıca mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlere bakılırken her iki özüt için etkin doz değerleri 8, 25 ve 50 olarak uygulanmış ve düşük dozlardaki etkininde gözlenmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar hekzan ve etil asetat özütlerinin LNCaP hücre hattı üzerinde göreceli yüksek sitotoksik ve antikarsinojen aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.

Tez kapsamında belirlenen hücrede birçok metabolik yollarla ilişkili 31 adet genin mRNA ekspresyon düzeylerinde hekzan ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda meydana gelen değişimlerin istatistiksel analizleri yapılarak yorumlanan sonuçlara ait değerler Tablo 4.1’de verilmektedir.

Tablo 4. 1: Hekzan ve etil asetat uygulaması sonucunda 31 adet genin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler. ■; mRNA seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artma, ■; mRNA seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı azalma.

		Hekzan Özütü			Etil Asetat Özütü		
		H-ED(8)	H-ED(25)	H-ED(50)	EA-ED(8)	EA-ED(25)	EA-ED(50)
Apoptoz Yoluyla İlişkili Genler	APAF-1	-1,20	-1,63	2,33	1,83	1,79	5,50
	BAX	-1,11	-1,09	2,22	1,21	1,29	1,72
	BCL-2	-1,40	-1,53	-1,47	-1,96	-1,40	2,04
	CASP3	1,31	1,94	2,31	1,61	1,85	1,51
	CASP8	-1,40	1,15	1,82	2,13	2,75	6,50
	CASP9	-1,21	-1,66	-1,53	-1,21	1,31	1,20
	FAS	-1,40	1,07	1,13	1,05	1,72	2,14
	PARP	-1,19	1,16	1,30	-1,11	1,15	1,06
	TNF	-1,31	-1,29	-1,17	1,18	1,01	-1,51
	TRAF2	-1,03	1,79	2,27	1,13	1,79	1,85

Hücre Döngüsünü Düzenleyici Genler	CDK2	-1,29	-1,16	-1,13	1,06	-1,81	2,38
	CDK4	-1,44	4,34	3,44	2,00	2,85	3,44
	CDKN1A	-1,53	-1,19	-1,17	1,04	1,27	4,03
	CyclinD1	-1,51	-1,72	-1,88	1,09	2,93	2,97
	CyclinD2	-1,61	-1,78	2,12	-1,11	-1,17	1,33
İlaç Regülasyonu ile İlişkili Genler	CAR	-1,26	-1,12	2,23	1,89	2,48	5,50
	NRF2	-1,21	-1,92	1,09	-1,02	1,05	1,71
	PXR	-1,56	-1,66	1,89	2,25	2,55	13,27
	RXR	-1,92	-1,58	-1,36	-1,42	-1,04	1,05
Proliferatif Hücre İçi Sinyal Yolaklarıyla İlişkili Genler	ERK2	-1,19	1,09	1,73	1,87	2,01	2,07
	JNK1	1,36	2,91	3,23	1,59	7,31	15,35
	P38	1,18	1,51	1,45	2,08	1,37	2,14
	AKT	-1,38	-1,17	-1,19	-1,61	2,04	2,43
Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Genler	c-MYC	-1,38	-1,66	-1,78	-1,56	-1,69	2,38
	HRAS	-1,51	-1,28	1,21	-1,35	-1,03	-1,88
	KRAS	-1,21	-1,35	1,11	-1,17	1,04	-1,47
	ABL1	-1,09	-1,25	1,95	-1,20	1,09	3,58
	E2F4	-1,75	-1,63	-1,14	-1,21	-1,25	-1,69
	PTEN	-1,13	-1,23	-1,42	1,21	1,19	3,18
	P53	-1,36	-1,20	1,59	1,52	2,38	7,36
	RB	-1,11	-1,29	4,08	2,79	5,21	16,91

Programlı hücre ölümü olan apoptozun gerçekleşmesi, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla kaspaz aktivasyonu ya da DNA hasarı neticesinde Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından mitokondriyal membran bütünlüğünün bozularak sitokrom c salınımlarıyla sitokrom c, kaspaz-9 ve Apaf-1'den oluşan apoptozom kompleksinin oluşumu temeline dayanmaktadır. Antikarsinojenik çalışmalarda en çok apoptoz yolağında etki görülmektedir. Çalışmamız kapsamında apoptoz yolağıyla ilişkili Apaf-1, Bax, Bcl-2, Casp-3, Casp-9, Fas, Parp, Tnf ve Traf-2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde *Urtica urens* hekzan özütü uygulaması sonucunda ED(8)

ve ED(25) sonuçlarında herhangi bir gende anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ancak hekzan özütü ED(50) uygulaması sonucunda sırasıyla Apaf-1, Bax, Casp-3 ve Traf2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde 2,33, 2,22, 2,31 ve 2,27 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. Etil asetat özütü için elde edilen değerler daha farklı olup ED(50) uygulaması sonucunda Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde 2.04 kat anlamlı bir azalışın yanında sırasıyla Apaf-1 ve Fas genleri için 5,50 ve 2,14 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. Ayrıca etil asetat özütünün Casp-8 geninin mRNA ekspresyon düzeyindeki etkisine bakıldığında sırasıyla ED(8), (25) ve (50) uygulaması sonucunda 2,13, 2,75 ve 6,50 kat anlamlı bir artış gözlenmiştir. *Urtica urens* etil asetat özütünün mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlerden yola çıkarak anlamlı bir değişim gösteren Apaf-1, Bcl-2, Casp8 ve Fas genlerinin protein düzeyindeki etkisini saptamak için ED(8) ve (50) uygulanan hücrelerden western blot analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Apaf-1, Casp-8 ve Fas protein seviyelerinde ED(50) uygulaması sonucunda sırasıyla 2,77, 2,20 ve 1,94 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçlar LNCaP hücre hattında etil asetat özütü için belirlenen ED(50)'nin antikanser etki mekanizmasını hücrede apoptozu Fas ligandı ile dış yolak üzerinden indükleyerek sergilediğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışma kapsamında yapılan tüm genom transkriptom analizleri sonucunda etil asetat için anlamlı bulunan yollar arasında apoptoz regülasyonu yolağının bulunması da elde edilen verileri desteklemektedir.

Tüm genom transkriptom analizi sonucunda çıkan apoptoz regülasyonu yolağını detaylı olarak incelediğimiz de yolakta görev alan proteozom altbirim alfa - 3 (PSMA3) proteinin down regüle olduğu saptanmıştır. PSMA3, ATP bağımlı proteolitik aktivite gösteren bir sitozol proteindir. Bu proteozomun CDKN1A proteinin C ucuna bağlanarak onun bozulmasına aracılık ettiği (Touitou ve diğ. 2001) belirtilmiştir. Etil asetat özütü uygulamasıyla PSMA3 proteozomunun down regülasyonu CDKN1A proteinin parçalanmasında azalmaya dolayısıyla da hücre döngüsünde siklin bağımlı kinazların inhibisyonuna neden olabilir. Böylece hücre döngüsünde duraksama meydana gelerek tümör hücresinin bölünmesinin engellendiği düşünülebilir.

Hücre döngüsü, siklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından özgün

olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CKI'lerin düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde döngünün ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulunduklarında inaktiftirler. Ancak, sikline bağlandıklarında aktifleşir ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Çalışmamızda hücre döngüsünü düzenleyici CDK2, CDK4, CDKN1A, CyclinD1 ve CyclinD2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakıldığında *Urtica urens* hekzan özütü uygulaması sonucunda sadece CDK4 ve CyclinD2 genlerinde anlamlı bir değişim saptanmıştır. Bu değerler CDK4 geni için sırasıyla ED(25) ve ED(50)'de 4,34 ve 3,44; CyclinD2 geni içinse ED(50)'de 2,12 kat anlamlı bir azalış elde edilmiştir. Etil asetat özütü için siklin bağımlı kinazlardan CDK2 ve CDK4 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde ED(50)'de sırasıyla 2,38 ve 3,44 kat anlamlı bir azalış saptanmıştır. CDK4 geni için diğer ED(8) ve ED(25) değerlerinde de anlamlı bir azalış elde edilmiştir. Ayrıca siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden olan CDKN1A geninin mRNA ekspresyon seviyesinde de ED(50)'de 4,03 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir. Bunlara ek olarak CyclinD1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde etil asetat özütü uygulaması sonucunda sırasıyla ED(25) ve ED(50)'de 2,93 ve 2,97 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. *Urtica urens* etil asetat özütünün mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlerden yola çıkarak anlamlı bir değişim gösteren CDK2, CDK4, CDKN1A ve CyclinD1 genlerinin protein düzeyindeki etkisini saptamak için ED(8) ve (50) uygulanan hücrelerde western blot analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda ED(50) için CyclinD1, CDK2 ve CDKN1A protein seviyelerine sırasıyla 1,58, 1,51 ve 1,70 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir. CDK4 protein seviyesinde ise 1,53 kat anlamlı bir azalış saptanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak LNCaP hücre hattında hekzan özütüne nazaran etil asetat özütünde CDK4 için mRNA ve protein düzeyinde azalma gözlenirken CDKN1A da artış gözlenmesi hücrenin G1 fazında durakladığına işaret edebilir. Resveratrol gibi birçok fenolik bileşiğin hücre döngüsünün G1, S, S/G2 ve G2 gibi farklı aşamalarında çeşitli hücrelerde inhibisyon etkisi gösterdiği hem *in vitro* hem de hayvanlarda kanser modeli ile *in vivo* olarak gösterilmiştir (Duthie 2007, Fresco ve diğ. 2006, Aggarwal ve Shishodia 2006, Meeran ve Katiyar 2008, Gusman ve diğ. 2001). Ayrıca tüm genom transkriptom analizleri sonucunda etil asetat için anlamlı bulunan yollar arasında hücre döngüsü proteinlerinin APC-C ilişkili yıkımı yolağının bulunması elde edilen verileri desteklemektedir. Anafaz ilerletici kompleks (Anaphase Promoting Complex or Cyclosome, APC-C) mitotik

siklinlerin yıkımını ve mitozdan çıkışı kontrol etmektedir. G1 fazının uygun uzunluğunu koruyan bu kompleks interfazda aktiftir (Peters 2002).

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptoza yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler. Çalışma kapsamında tümör baskılayıcı PTEN, P53, E2F4 ve RB genlerinin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakıldığında *Urtica urens* hekzan özütü uygulaması sonucunda sadece RB geninde ED(50) uygulaması sonucunda 4,08 kat anlamlı bir artış gözlenmiştir. Buna karşılık etil asetat özütü uygulamasında RB geni için sırasıyla her bir uygulamada 2,79, 5,21 ve 16,91 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir. Diğer bir önemli tümör baskılayıcı P53 geninin mRNA ekspresyon düzeyine bakıldığında ise ED(25) ve ED(50)'de 2,38 ve 7,36 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir. Ayrıca PTEN geni içinde ED(50)'de 3,18 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. Ayrıca çalışmaların devamında yapılan western blot yöntemiyle P53 ve PTEN genlerin protein düzeyinde analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda etil asetat özütü ED(50) uygulamasında P53 ve PTEN protein seviyelerinde 3,77 ve 1,33 kat anlamlı bir artış tespit edilmektedir. PTEN ekspresyonundaki artış, azalan Akt/PKB aktivitesi, hücre yaşamı, mitozu ve anjiyogenezi baskılar, apoptozu indükler (Abate-Shen ve Shen 2000, Nelson ve diğ. 2003, Dong 2006). Elde ettiğimiz veriler neticesinde *Urtica urens* etil asetat özütünün tümör baskılayıcı P53, PTEN ve RB için gen ve protein düzeylerindeki anlamlı artışın hücre döngüsünü baskılayıcı, apoptozu indükleyici etki göstererek antikanser etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca birçok kanser türünde aktive olan bir transkripsiyon faktörü c-Myc hücre döngüsünün ilerlemesi ile DNA replikasyonunu uyarır (Dong 2006). c-Myc için yapılan qRT-RZR sonucunda mRNA seviyesinde 2,38 kat anlamlı bir azalış gözlenirken, western blot analizi sonucunda protein seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Proliferatif hücre içi sinyal yolları olan mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), fosfotidil inozitol-3 kinaz (PI3K) ve nükleer faktör-kappaB (NFkB) tümör hücresinin çoğalmasında merkezi öneme sahiptirler. Bu yollar, büyüme

faktörlerinin reseptörlerine bağlanmasını takiben aktive olurlar ve DNA'ya direkt bağlanarak transkripsiyonu arttıran mediyatörlerin sentezine aracılık ederler. Hücre içi sinyal yollarında görev alan AKT1, ERK2, JNK1 ve P38 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimleri sonucunda hekzan özütü için sadece JNK1 geninde ED(25) ve ED(50) uygulamasında 2,91 ve 3,23 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. Buna karşılık etil asetat özütü için elde edilen sonuçlar farklı olup Akt1 geninde ED(50) uygulamasında 2,43 kat anlamlı bir azalış gözlemlenirken, P38 geninde ise 2,14 kat anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca ERK2 ve JNK1 genleri içinde sırasıyla ED(25) ve ED(50) değerleri 2,01, 2,07, 7,31 ve 15,35 kat anlamlı bir artış olarak bulunmuştur. Tüm bunlara ek olarak yapılan western blot analizinde etil asetat özütü ED(25) ve ED(50) uygulaması sonucunda JNK1 protein seviyesinde 1,85 ve 2,53 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir. Akt (serin/treonin kinaz) ve P13K aktivasyonu meme, ovaryum, özefagus gibi birçok kanser türünde gösterilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS), PTEN'in inhibisyonu aracılığıyla Akt'ı aktive etmektedir. Aktifleşmiş Akt, siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27'nin ekspresyonunu azaltarak ve c-Myc ve siklinD1 ekspresyonunu arttırarak hücre proliferasyonunu uyarır. Akt, MDM2 etkileşimi yoluyla da P53'ün proteozomal degradasyonunu arttırarak ve caspase-9 gibi proapoptotik molekülleri inaktive ederek apoptozu inhibe eder (Chesire ve Isaacs 2003, Reuter ve diğ. 2010).

Tüm genom transkriptom analizi ile etil asetat özütü uygulamasından sonra anlamlı problemlerle yapılan ileri analizler sonucunda elde edilen yolak listesinden WNT sinyal yolağı ve Plutipotent detaylı olarak incelendiğinde CD44 geninin down regüle olduğu tespit edilmiştir. Ektraselüler makriks reseptör-3 adıyla da bilinen CD44, hiyaluronik asit (HA) reseptörüdür. Onun bu HA ve diğer osteopontin, kollajen ve matriks metalloproteinazlar (MMPs) gibi ligandlara ilgisi hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerini kontrol eder. CD44 ile HA adezyonu hücre göçünde, tümör gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynar (Vikesaa ve diğ. 2006). Birçok kanser tipinde tümör yayılımı ile ilişkili olarak, CD44 üretimi ve yapısında farklılıklar gösterilmiştir (Naor ve diğ. 1997, Ponta ve diğ. 2003). Ayrıca, CD44'ün hedeflenmiş delesyonu ile bazı tümör yayılımı önlemiştir (Weber ve diğ. 2002). CD44'ün hücre bağlanması, göç ve metastazla ilişkili bilinen tüm etkileri, özellikle CD44'ün hücrenin HA'ya bağlanmasını kolaylaştırma kapasitesi ile ilişkilidir (Naor ve diğ. 1997). Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarda CD44 genindeki down

regülasyonu LNCaP hücre hattında tümörün gelişimi ve yayılımında etil asetat özütünün geriletici etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Tüm bunlara ek olarak, çalışma kapsamında *Urtica urens* hekzan ve etil asetat özütlerinin DNA topoizomera I ve II enzimi üzerine inhibisyon etkileri relaksasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Relaksasyon yöntemiyle alınan deney sonuçlarına göre hekzan ve etil asetat özütlerinin düşük konsantrasyonlarda bile (2,5 µg/ml) DNA topoizomera I enzimi üzerine inhibitör etkili olduğu saptanmıştır. Hekzan ve etil asetat özütlerinin bu inhibisyon etkisi kıyaslandığında hekzan özütündeki inhibisyon etkisinin daha fazla olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan DNA topoizomera II enzimi ile yapılan dekatasyon testinden elde edilen sonuçlara göre hekzan özütünde yüksek bir inhibisyon etkisi gözlenirken, etil asetat özütünde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen veriler neticesinde DNA topoizomera I ve II enzimleri ile yapılan DNA relaksasyon, dekatasyon analizlerine göre hekzan özütü içeriğindeki bileşik ve/veya bileşiklerin antikanser etkisinde bu enzimleri hedefleyebileceği düşünülebilir. Ancak etil asetat özütü içeriğindeki bileşik ve/veya bileşiklerin DNA topoizomera II enzimini hedeflemediği, antikanser etkisinin bu enzimden bağımsız olarak farklı yollar üzerinden gerçekleştiği sonucuna varılabilir.

İnsanlarda NR113 geni ile kodlanan konstitütif androstan reseptörü (CAR) nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir (Baes ve diğ. 1994). CAR, PXR ile birlikte ksenobiyotik ve endobiyotik maddelere bir sensör olarak fonksiyon göstererek bu maddelerin metabolizma ve atılımından sorumlu proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Wada ve diğ. 2009). Dolayısıyla CAR (ve PXR) ilaçlar gibi yabancı maddelerin detoksifikasyonunda önemlidir. Çalışma kapsamında CAR geni için mRNA ekspresyon düzeyinde sırasıyla hekzan özütü ED(50), etil asetat özütü ED(25) ve ED(50) uygulaması sonucunda 2,23, 2,48 ve 5,50 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. PXR geni için elde edilen sonuçlarda ise hekzan özütünde anlamlı bir değişim saptanmazken, etil asetat özütünde sırasıyla ED(8), (25) ve (50) uygulamasında 2,25, 2,55 ve 13,27 kat anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bunlara ek olarak RXR geninin mRNA ekspresyonundaki değişimlere de bakılmış ancak anlamlı bir değişim elde edilmemiştir. Şu çok iyi bilinmektedir ki CAR, PXR ve RXR, ilaçları metabolize eden enzimlerden olan CYP2B, CYP2C ve CYP3A gibi

izozimlerin transkripsiyonel olarak regülasyonundan sorumlu nükleer reseptörlerdir. Bu reseptörlerin miktarının değişiklilerin sitokrom P450'lerin ekspresyonlarının değişmesine yol açması muhtemeldir. Tüm bunlar elde ettiğimiz sonuçlarla ilişkilendirildiğinde *Urtica urens* etil asetat özütü uygulaması sonrasında CAR ve PXR genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde ki artıştan dolayı ilaç biyotransformasyonunda değişimler gözlenebilir. Bu yüzden doz ayarlaması yapılarak ilaç biyotransformasyonundaki negatif etkinin giderilmesi gerekmektedir.

Özetle tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, *Urtica urens* özütünden elde edilen hekzan özütüne kıyasla etil asetat özütünün LNCaP hücre hattı üzerindeki antikanser etki mekanizmasının daha kapsamlı ve etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm genom transkriptom analizinden elde edilen 34 farklı yolaktaki anlamlı değişimler bu düşüncüyü desteklemektedir. *Urtica urens* etil asetat özütünün içeriğinde ki fenolik bileşiklerin prostat kanseri üzerindeki etkileri hücre döngüsü kontrol genleri, apoptoz yolağı genleri, tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve proliferatif hücre içi sinyal yollarında görev alan genler aracılığıyla kapsamlı olarak incelenmiş olup ileride ısırgan otu ile yapılacak olan diğer farmakolojik ve toksikolojik çalışmalara ipuçları sağlayacaktır.

5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan çalışmada küçük ısırgan otundan (*Urtica urens*) elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin insan prostat kanseri hücre hattı (LNCaP)'nda ki apoptoz yolağında indüklenmeyi sağlayıcı, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ise durdurucu yönde etkili olmasının yanında proliferatif hücre içi sinyal yolaklarında, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bunların yanı sıra ilaç regülasyonunda önemli CAR ve PXR genlerinin mRNA düzeyindeki artışa bağlı olarak ilaç biyotransformasyonun da ki önemi belirtilmiştir. Tüm genom transkriptom analizinin sonuçlarından elde edilen yolaklar çalışmamızı destekler niteliktedir. Diğer yandan DNA topoizomera z enzimleri ile yapılan relaksasyon ve de katenasyon deneylerinde ise hekzan özütünün topoizomera zlar üzerinde daha etkili olduğu saptanmış ve bu özütte topoizomera z inhibisyonu ile kanser tedavisinde kullanılabilcek aktif bileşikler olabileceği sonucuna varılmıştır. Elde edilen tüm bu verilerin ışığında literatürde yer almayan ülkemizde yaygın olarak kullanılan *Urtica urens* bitkisine ait antikanser etki mekanizmaları aydınlatılarak çalışmaların daha da detaylandırılmasıyla Farmakoliji ve toksikoloji açısından ileri çalışmaların önü açılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Abate-Shen, C. ve Shen, M. M., “Molecular genetics of prostate cancer”, *Genes Dev.*, 14 (19), 2410-34, (2000).

Abate-Shen, C., Shen, M.M. ve Gelmann, E., “Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis”, *Differentiation*, 76 (6), 717-27, (2008).

Adamski, R. ve Bieganska, J., “Studies of chemical substances present in *Urtica dioica* leaves. Part I Trace element”, *Herba Pol.*, 26 (3), 177–180, (1980).

Agus, H.H., Tekin P., Bayav M., Semiz A. ve Sen A., “Drug interaction potential of the seed extract of *Urtica urens* L. (Dwarf Nettle)”. *Phytotherapy research*, DOI: 10.1002/ptr.2848. (2009).

Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seram, N.P., Shishodia, S. ve Takada, Y., “Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies”, *Anticancer Research*, 24, 3-60, (2004).

Ahn, J., Albanes, D., Peters, U., Schatzkin, A., Lim, U., Freedman, M., Chatterjee, N., Andriole, G. L., Leitzmann, M. F., Hayes, R. B. “Dairy products, calcium intake, and risk of prostate cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial”, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 16, 2623-2630, (2007).

Aksu, M.İ., Kaya, M., “Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry fermented sausage”, *Food Control*, 15, 591-595, (2004).

Alberts, B., Alexander, J., Jelina L., Martin R., Keith R. and Peter W. “The Cell”, Garland Serunce Pub., New York, 34, 7, (2001).

Andersen, S. and Wold J. K. “Water-soluble glycoprotein from *Urtica dioica* leaves”, *Phytochemistry*, 17, 1875–1877, (1978).

Anikina, E. V. “Physicochemical characteristics of extracts from some medicinal plant species as food additives”, *Rastitel’nye Resurs*, 32, 4, 30–36, (1996).

Aydin, M., Ozaydin I., Ilce Z., Sahin I., Sencan I., Silan C., Yasar M., Aslaner A., Ertas E., “Effect of *Urtica dioica* on bacterial translocation in mechanic icter model”, *Saudi Med J.*, 27, 5, 748-749, (2006).

Baeuerle, P.A., ve Henkel, T., *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179, (1994).

Baes, M., Gulick, T., Choi, H.S., Martinoli, M.G., Simha, D., Moore, D.D., "A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements", *Mol. Cell. Biol.*, 14 (3), 1544–52, PMC 358513. PMID 8114692. (1994).

Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W. J. ve Clercq, E. D., "The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)_n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytohemalovirus replication, in vitro." *Antiviral Research* 18, 191–207, (1992).

Barlow, R. ve Dixon, R. O. D., "Cholin Acetyltransferase in the Nettle *Urtica dioica* L.", *Biochem. J.*, 132, 15–18, (1973).

Bartek, J., Lukas, J., ve Bartkova, J., "Perspective: defects in cell cycle control and cancer", *J Pathol.*, 187 (1), 95-9, (1999).

Baytop, T., "Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi", İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitabevleri Yayını, 231– 232, (1999).

Bjornsti, M. A. ve Osheroff, N., "Introduction to DNA topoisomerases, DNA topoisomerases and cancer", Springer, New York, 94, 1-8, (1999).

Bnouham, M., Merhfour, F.M., Ziyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M. ve Legssyer, A., "Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*", (2003).

Booth, V. H. ve Bradford, M. P. "Tocopherol contents of vegetables and fruits", *Br. J. Nutr.* 17, 575–581, (1963).

Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J. ve Timms, B., "Human prostate cancer risk factors", *Cancer*, 101 (10 Suppl), 2371-490, (2004).

Cabadak, H., "Hücre Siklusu ve Kansere Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık", *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51 –6, (2008).

Calder, P.C., "n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases", *Am J Clin Nutr.*, 83 (6 Suppl), 1505S-1519S, (2006).

Capranico, G., Baranello L., Bertozzi, D. ve Marinello, J., "Transcriptional stress by camptothecin: mechanisms and implications for the drug antitumor activity, DNA topoisomerases and cancer", Pommier, Y., Springer, New York, 309-32, (2012).

Chaurasia, N., “Phytochemische Untersuchungen Flora *Urtica dioica* L.” Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwurde des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn, (1987).

Chesire, D. R. ve Isaacs, W. B., “Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective”, *Endocr Relat Cancer*, 10 (4), 537-60, (2003).

Chrubasik, J.E., Roufogalis, B.D., Wagner, H. ve Chrubasik, S., “A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles”, Part II: *urticae radix*. *Phytomedicine*, 14 (7-8), 568-79, (2007).

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R., “The BCL-2 family reunion”, *Mol Cell.*, 12, 37 (3), 299-310, (2010).

Çalışkaner, Z., Karaayvaz, M., Ozturk, S., “Misuse of a herb: stinging nettle (*Urtica urens*) induced severe tongue oedema”, *Complementary Therapies in Medicine*, 12, 57-58, (2004).

Davis, P. H., “Flora of Turkey and The East Aegean Islands”, 7, 633, The University Press, Edinburg. (1982).

Deckelbaum, R.J., Worgall, T.S., “Seo T.n-3 fatty acids and gene expression”, *Am J Clin Nutr.*, 83 (6 Suppl), 1520S-1525S, (2006).

Del Poeto, G., Bruno, A., Del Principe, M.I., Vendittii, A., Maurillo, L., Buccisano, F., Stasi, R., Neri, B., Luciano, F., Siniscalchi, A., de Fabritiis, P., Amadori, S., “Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia”, *Curr Cancer Drug Targets*, 8 (3), 207-22, (2008).

Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. “Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher”, *Arch Biochem Biophys*, 274, 532-538, (1989).

Dong, J. T., “Prevalent mutations in prostate cancer”, *J Cell Biochem*, 97 (3), 433-47. (2006).

Ekmekçi, A., Konaç, E., Önen, H.İ., “Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık”, *Marmara Medical Journal*, 21 (3), 282-295, (2006).

Elmore, S., “Apoptosis: a review of programmed cell death”, *Toxicol Pathol.*, 35 (4), 495-516, (2007).

Emmelin, N. ve Feldberg, W., “The mechanism of the common nettle (*Urtica urens*)”, *J. Physiol.*, 106, 440–455. (1947).

Farzami, B., Ahmadvand, D., Vardasbi, S., Majin, F.J., Khaghani, S., “Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 47-53, (2003).

Feldman, B. J. ve Feldman, D., “The development of androgen-independent prostate cancer”, *Nat Rev Cancer*, 1 (1), 34-45, (2001).

Galelli, A., Delcourt, M., Wagner, M.C., Peumans, W. ve Truffa-Bachi, P., “Selective expansion followed by profound deletion of mature V beta 8.3_T cells in vivo after exposure to the superantigenic lectin *Urtica dioica* agglutinin”, *J. Immunol.*, 15, 154 (6), 2600–2611, (1995).

Garcia-saez, A.J., Fuertes G., Suckale, J., Salgado, J., “Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins”, *Adv Exp Med Biol.*, (2010).

Ge, H., Kong. X., Shi, L., Hou, L., Liu, Z., Li, P., “Gamma-linolenic acid induces apoptosis and lipid peroxidation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells”, *Cell Biol Int.* 2009 Mar;33 (3) 402-10. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.01.014. Epub Feb 7. (2009).

Germain, E., Chajès, V., Cognault, S., Lhuillery, C., Bougnoux, P., “Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation”, *Int J Cancer.*, 75 (4), 578-83, (1998).

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., Adjei, A.A. “Targeting apoptosis pathways in cancer therapy”, *CA Cancer J Clin* 55, 178-194, (2005).

Glover, F.E., Jr, Coffey, D.S., Douglas, L.L., “The epidemiology of prostate cancer in Jamaica”, *J Urol.*, 159, 1984-1987, (1998).

Gözüm, S., Tezel, A., Koç, M., “Complementary alternative treatments used by patients with cancer in eastern Turkey”, *Cancer Nurs.*, 26, 230–236, (2003).

Gözüm, S., Arıkan, D., Büyükcavcı, M., “Complementary and alternative medicine use in pediatric oncology patients in eastern Turkey”, *Cancer Nurs.*, 30, 38-44, (2007).

Gravel, I. V., Yakovlev, G. P., Petrow, N. V., Stulovski, S. S. ve Listov, S. A., “Content of heavy metals in some species of medicinal plants in the Altaiskii Krai”, *Rastitel'nye Resursy*, 30 (1–2), 101–108, (1994).

Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., “BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis”, *Genes Dev.*, 13, 1899–1911, (1999).

Gustafsson, A.B. ve **Gottlieb**, R.A. “Domain structure of Bcl-2 family proteins.”, *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C45, (2007).

Gülçin, G., Ezer, N., “Halk Arasında Hemeroid Tedavisinde Kullanılan Bitkiler”, - I. Hacettepe Üniv. Ecz. Fak. Dergisi, 24, 37-55, (2004).

Gülçin, İ., Kürevioğlu, İ., Oktay, M., “Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity”, *J Enzyme Inh Med Chem*, 20, 297-302, (2005).

Hagberg, H., Mallard, C., Rousset, C.I., Xiaoyang, W., “Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria”, *J Child Neurol.*, 24 (9), 1141-6, Epub (2009).

Hanahan, D. ve **Weinberg**, R.A., “Hallmarks of Cancer: The Next Generation.”, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell>, (2011).

Haris, C.C., “Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies” *J. Nat. Can. Inst.*, 88, 1442-1455. (1996),

Harput, Ş., Saraçoğlu, İ., Ogihara, Y., “Stimulation of Lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract”, *Phytptherapy Research*, 19, 346-48, (2005).

Hengartner, M. O., “The biochemistry of apoptosis”, *Nature*, 407, 770-776, (2000).

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S. J. “Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death”, *Nature*, 348, 334-336, (1990).

Huang, X., Traganos, F. ve **Darzynkiewicz**, Z., “DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis”, *Cell Cycle*, 2 (6), 614-9, (2003).

Hughes, R. E., Ellery, T., Harry, V., Jankins ve Jones, E., “The dietary potential of the common nettle”, *J. Sci. Food Agric*, 31, 1279–1285, (1980).

Hunt, J.V., Dean, R.T., “Free radical-mediated degradation of proteins: the protective and deleterious effects of membranes”, *Biochem Biophys Res Commun.*, 15;162 (3),1076-84, (1989).

Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K., “A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet”, *Biol Pharm Bull* 19, 1518-1520, (1996).

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M. J., “Cancer statistics”, *CA Cancer J Clin.*, 58, 71-96, (2008).

Ji, T.F., Lu, C.H., Wang, J.B., Su, Y.L., Yuan, L., Feng, X.Z., “Studies on the constituents of *Urtica dioica* L. Grown in the Tibet Autonomous Region”, *Zhong Yao Cai*, 30, 662-64, (2007).

Jorge, A., Garcia ve David, Danielpour, “mTOR inhibition as a Therapeutic Strategy in the Management of Urologic Malignancies”, *Mol Cancer Ther*, 7 (6), 1347–1354, (2008).

Kageyama, K., Onoyama, Y., Nakanishi, M., Matsui-Yuasa, I., Otani, S., Morisawa, S., “Synergistic inhibition of DNA synthesis in Ehrlich ascites tumour cells by a combination of unsaturated fatty acids and hyperthermia”, 9 (1), 1-4, (1989).

Kav, S., Hanoglu, Z., Algier, L., “Türkiyede Kanserli Hastalarda Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Yöntemlerinin Kullanımı: Literatür Taraması”, *International Journal of Hematology and Oncology*, 1 (18), 32-38, (2008).

Kavalali, G. ve Randall, C., “*Urtica*: Therapeutic and Nutritional Aspects of Stinging Nettles”, Taylor and Francis, 13, (2003).

Kaygusuz, G., Tulunay, O., Baltaci, S. ve Gogus, O. “Microvessel density and regulators of angiogenesis in malignant and nonmalignant prostate tissue”, *International urology and nephrology*, 39, 841-850, (2007).

Kerr, J. F., Winterford, C. M. ve Harmon, B. V., “Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy”, *Cancer*, 73, 2013-2026, (1994).

Kenny, F.S., Gee, J.M., Nicholson, R.I., Ellis, I.O., Morris, T.M., Watson, S.A., Bryce, R.P, Robertson, J.F., “Effect of dietary GLA+/-tamoxifen on the growth, ER expression and fatty acid profile of ER positive human breast cancer xenografts”, *Int J Cancer.*, 1, 92 (3), 342-7, (2001).

Klassen, A.C. ve Platz, E.A., “What can geography tell us about prostate cancer?”, *Am J Prev Med.*, 30, 7-15, (2006).

Koç, H., “Bitkilerle Sağlıklı Yaşama”, G.O.P. Üniversitesi. Tokat. Ümit Ofset Basımevi Ankara, 388, (2002).

Konrad, L., Müller, H.H., Lenz, C., Laubinger, H., Aumüller, G., Lichius, J.J., “Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract”, *Planta Medica*, 66, 44–47, (2000).

Kraus, R. ve Spiteller, G., “Terpene diols and Terpene diol glucosides from roots of *Urtica dioica*”, *Phytochemistry*, 30 (4), 1203–1205, (1991).

Lamkamfil, M., Festjens, N., Declerc, W., Bergh, T., Vandenabeele, P., “Caspases in cell survival, proliferation and differentiation”, *Cell Death and Differentiation*, 14, 44-55, (2007).

Lavrik, N., Golks, A., Krammer P., “Caspases: Pharmacological manipulations of cell death”, *The J Clin Invest.*, 115, 2665-2672, (2005).

Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai Y. C., Ban, Y. and Liu, L. F., “Topoisomerase II beta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane”, *Cancer Research*, 67 (18), 8839-8846, (2007).

Machoda-silva, A., Perrier, S., Bourdon, J.C., “Family members in cancer diagnosis and treatment”, *Semin Cancer Biol.*, 20 (1), 57-62, (2010).

Makarov, D. V., Carter, H. B., “The discovery of prostate specific antigen as a biomarker for the early detection of adenocarcinoma of the prostate”, *J Urol.*, 176, 2383-2385, (2006).

Mattson, P.M., Chan, L.S., “Calcium orchestrates apoptosis”, *Nature Cell Biology*, 5, 1041 – 1043, (2003).

Mayer, C., Grummt, I., “Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases”, *Oncogene*, 25, 6384–6391, (2006).

Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yildirim, A., Coşkun, M., “Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae)”, *Biol Pharm Bull.*, 27 (5), 702-5, (2004).

Meeran, S.M., Katiyar, S.K., “Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents”, *Front Biosci.*, 13, 2191–2202, (2008).

McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A., Neve, R. L., “DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3”, *J Neurosci*, 23, 6914-6927, (2003).

Naor, D., Sionov, R.V., Ish-Shalom, D., “CD44: Structure, function, and association with the malignant process”, *Adv Cancer Res.*, 71, 241-319, (1997).

Nagata, S., “Apoptosis by death factor”, *Cell*, 88, 355-365, (1997).

Nelson, W. G., De Marzo, A. M. ve Isaacs, W. B., “Prostate cancer”, *N Engl J Med*, 349 (4), 366-81, (2003).

Newall, C. A., Anderson, L. A., ve Phillipson, J. D., “Herbal Medicines: A Guide for Health-care Professionals”, *The Pharmaceutical Press, London*, (1996).

Nitiss, J. L., “Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*”, 1400 (3), 63-81, (1998).

Obertreis, B., Giller, K., Teucher, T., Behnke, B. ve Schmitz, H., “Antiphylogistische Effekte von Extractum Urtica dioica foliorum im vergleich zu Kaffeoylapfel saure”, *Arzneimittel Forschung Drug Res.* 46 (1), 52–56, (1996).

Osheroff, N., “DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy”, *IGP*, Autumn, (2003),

Özkarlı, M., Sevim, H., Şen, A., “In vivo effects of *Urtica urens* (dwarf nettle) on the expression of CYP1A in control and 3-methylcholanthrene-exposed rats”, *Xenobiotica* 38, 48–61, (2008).

Peters, J.M., “The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 9 (5) 931-43, (2002).

Pettersson, F., Dalgleish, A.G., Bissonnette, R.P., Colston, K.W., “Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax.”, 27, 87 (5), 555-61, (2002).

Pindur, U., ve Lemster, T., “Antitumour drug design: DNA binding ligands, which inhibit the topoisomerase I”, Review, *Pharmazie*, 53 (2), 79-86, (1998).

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. and Marchand, C., “DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs”, *Chemistry & biology*, 17 (5), 421-433, (2010).

Pop, C., Salvesen, G.S., “Human caspases: activation, specificity, and regulation”, *J. Biol Chem.*, 14, 284 (33), 21777-81, (2009).

Porkka, K. P. and Visakorpi, T., “Molecular mechanisms of prostate cancer”, *Eur Urol*, 45 (6), 683-91, (2004).

Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., “CD44: from adhesion molecules to signaling regulators”, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4:33-45, (2003).

Potmesil, M., Kohn, K.W.(Eds), “DNA topoisomerase in cancer”, Oxford University Press. New York, 121-132, (1991).

Pradelli, L.A., Bénétteau, M., Ricci, J.E., “Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death”, *Cell Mol Life Sci.*, 67 (10), 1589-97, (2010).

Ralph, R.K., Judd, W., Pommier, Y., Kolin, K.W., Neidle, S., Waring, M.J.(eds), “DNA topoisomerases in molecular aspects and anticancer drug-DNA interaction”, Vol.2, Macmillan, London, Pp. 1. (1994).

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. ve Aggarwal, B.B., “Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?”, *Free Radic Biol Med*, 49 (11), 1603-16, (2010).

Riehemann, K., Behnke, B. ve Schulze-Osthoff, K. “Plant extract from stinging nettle (*Urtica dioica*) and antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-KB”, *FEBS letters*, 442 (1), 89–94, (1999).

Rogojina, A. T. ve Nitiss, J. L., “Isolation and characterization of mamsa-hypersensitive mutants: cytotoxicity of top2 covalent complexes containing DNA single strand breaks”, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (43), 29239-29250, (2008).

Rzemykowska, Z. ve Ostrowska, B., “The method of quantitative determination of magnesium in the juice from the fresh nettle (*Urtica dioica*)”, *Herba Polonica*, 40 (3), 95–98, (1994).

Salamon, I., Hecl, J. ve Haban, M., “Heavy metal determination of several medicinal plant in the central Zemplin. World Conference on Medicinal and Aromatic plants”, Hungary, Abs. no. 187, (2001).

Szachowicz-Petelska, B., Sulkowski, S., Figaszewski, Z.A., “Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue”, *Mol Cell Biochem.*, 294(1-2):237-42, (2007).

Semczuk, A., Cybulski, M., Tomaszewski, J., Rechberger, T., Jakowicki, J.A., “Clinicoprognostic significance of pRb1 pathway alterations in uterine endometrial adenocarcinoma”, *Cancer Genet Cytogenet*, 15, 154 (2), 186-9, (2004).

Senderowicz, A.M., “Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies”, *Curr Opin Cell Biol*, 16, 670-678, (2004).

Schomaker, V. J., Bollbach, F. D. ve Hagels, H., “Brennesselkraut”, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 135 (7), 40–45, (1995).

Schulz, W. A., Burchardt, M. & Cronauer, M. V. “Molecular biology of prostate cancer”, *Mol Hum Reprod*, 9 (8), 437-48, (2003).

Shiseki, M., Nagashima, M., Pedoux, R.M., Shiseki, M.K., Miura, K., Okamura, S., Onogi, H., Higashimoto, Appella, E., Yokota, J., Harris, C.C., “p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity”, *Cancer Research*, 63, 2373-2378, (2003).

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. “Measurement of protein using bicinchoninic acid”, *Anal Biochem*, 150, 76-85, (1985).

Song, L., Morris M., Bagui T., Lee F. Y., Jove R. and Haura E. B. Dasatinib “Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor Signaling for Survival”, *Cancer Res.*, (BMS-354825), 66 (11), 5542-5, (2006).

Stratton, M., Campbell, P., Futreal, A. “The cancer genome”, *Nature*, 458, 719–724, (2009).

Şimşek, I., Aytekin, F., Yeşilada, E., Yıldırım, S., “An ethnobotanical study of the Beypazarı, Ayas, and Gudul district towns of Ankara province (Turkey)”, *Economic Botany*, 58, 705-720, (2004).

Tahri, A., Yamani, S., Leggsyer, A., Aziz, M., Mekhfi, H., Bnouham, M. ve Ziyat, A., “Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat”, *J. Ethnopharmacology*, 732, 95–100, (2000).

Testai, L., Chericoni, S., Calderone, V., Nencioni, G., Nieri, P., Morelli, I. and Martinotti, E. “Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies”, *J. Ethnopharmacology*, 81, 105–109, (2002).

Touitou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J., Allday, M.J."A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome.", *EMBO J.* 20:2367-2375, (2001).

Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M. R. H., "Instant Notes in Molecular Biology Paperback", (2003).

Tuzlacı, E., Aymaz P.E., "Turkish Folk Medicinal Plants", Part IV, Gönen, *Fitoterapia*, 72 (4), 323-43, (2001).

Uzun, E., Sarıyar, G., Adsersen, A., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoglu, E., Pirildar, S., "Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species", *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 287-296, (2004).

Vikesaa, J., Hansen T.V., Joenson L., Borup R., Wewer U.M., Christiansen J., Nielsen F.C."RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation.", *Europe PMC,EMBO J.* 25:1456-1468, (2006).

Wang, C., Youle, R.J., "The role of mitochondria in apoptosis", *Annu Rev Genet.*, 43, 95-118, (2009).

Wang, J.C., "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (6), 430-440, (2002).

Wahle, K.W., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S.D., "Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer", *Adv Exp Med Biol.*, 698, 36-51, (2010).

Wada, T., Gao, J., Xie, W., "PXR and CAR in energy metabolism". *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (6): 273–9. doi:10.1016/j.tem.2009.03.003. PMID 19595610. (2009).

Weber, G.F., Bronson, R.T., Ilagan, J., "Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis", *Cancer Res.*, 62, 2281-6, (2002).

Yongna, Z., Wantana, R., Pisit, B., Zhongkun, L., Rongping, Z., "Analgesic and antipyretic activities of the aqueous extract of *Urtica macrorrhiza* in experimental animals", *Fitoterapia*, 76, 91-95, (2005).

Yu, F., Lu, S., Yu, F., Shi, J., McGuire, P.M., Wang, R., "Cytotoxic activity of an octadecenoic acid extract from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) on human tumour cell strains", 60 (2), 253-9. doi: 10.1211/jpp.60.2.0015, (2008).

Xiao, D., Zhang, L., "Upregulation of Bax and Bcl-2 following prenatal cocaine exposure induces apoptosis in fetal rat brain", *Int J Med Sci.* 5 (6), 295-302, (2008).

Zhang, X., Wang, K., Wang, Z., Xu, L., Wang, Q., Chen, F., Wei, D., Han, Z., “Nuclear localization signals of ING4 plays akey role in its binding to p53”, *Biochem. Biphysc. Res. Comm.*, 331,1032-1038 (2005).

Zhi, Y., Cheng, Xiao, L. Guo, Xiao, Y., Yang, Zhi, Y., Niu, Shi, H. Li, Su, Y., Wang, Hao Chen ve Ling Pan, “PTEN and rapamycin inhibiting the growth of K562 cells through regulating mTOR signaling pathway”, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 27, 87 doi:10.1186/1756-9966-27-87, (2008).

Zhuang, W., Sgourakis, N.G., Li, Z., Garcia, A.E., Mukamel, S., “Discriminating early stage A{beta}42 monomer structures using chirality-induced 2DIR spectroscopy in a simulation study”, *Proc Natl Acad Sci USA.*, (2010).

Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and Benjelloun, W. “Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Moroccos”, *J. Ethnopharmacology* 58, 45–54, (1997).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülsüm TERZİOĞLU
Doğum yeri ve tarihi : İstanbul, 04.05.1988
Adres : Çamlaraltı mah. Kınıklı cad. No.17/1 Merkez/DENİZLİ
Tel : 0555 8661078
e-mail : gulsumterzioglu88@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Yüksek lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
A.B.D (2011- 2014).
Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü (2007-2011) (Biyoloji Bölüm İkcinciliğı)
Lise : İhsan Mermerci Lisesi (2002-2006).

Yayınlar

Uluslararası Makale (SCI)

Alaattin Sen, Pelin Atmaca, **Gulsum Terzioglu** and Sevki Arslan. (2013)
Anticarcinogenic Effect and Carcinogenic Potential of the Dietary Phenolic Acid: o-
Coumaric Acid. Natural Product Communications, Vol.8, No.0, 1-2.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Terzioglu G., Gul A. O., Atmaca P., Ozgun O., Cetin S., Arslan S. and Sen A.
(2011). BeeVenom Induced Apoptosis in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells.
FEBS Journal 278: Suppl. 1, pp. 234.

Urhan R., **Terzioglu G.**, Gul A. O., Atmaca P., Ozgun O., Cetin S., Arslan S. and
Sen A. (2011). Anti-Cancer Effect of Bee Venom in Cervical Cancer Cells.*FEBS
Journal* 278: Suppl. 1, pp. 230.

Arslan S., Atmaca P., **Terzioğlu G.**, Gul A. O., Cetin S., Semiz A., Ozgun O. and Sen A. (2011). Caspase and MAPKs Mediated Apoptosis by Bee Venom in Caco-2 Cell Line. ICBB Congress.

Arslan S, Atmaca P., **Terzioğlu G.**, Ozgun O, Celik G and Sen A (2012) Drug interaction and carcinogen activating potential of o-coumaric acid. Meeting Proceedings and Abstracts Book, s. 99, 2012. International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX).

S.Arslan, A.Sen, O.Ozgun, G.Celik, P.Atmaca, **G.Terzioğlu**. Differential Apoptotic Responses Towards Bee Venom in Human Cancer Cell Lines. The Fifth Saudi Science Conference (2012).

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Şevki Arslan, Pelin Atmaca, **Gülsüm Terzioğlu**, Özden Özgün, Gurbet Çelik, Alaattin Şen. o-Kumarik Asit'in Prokarsinojen/Karsinojen ve İlaç Metabolizması Üzerine Etkileri. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 2012 (Ege Üniversitesi).

Gülsüm Terzioğlu, Serkan Elçin, Hasalettin Deligöz, Alaattin Şen, Şevki Arslan. Küçük Isırgan Otunun (*Urtica urens*'in) Artan Polarite Özütlelerinin Antikarsinojenik Etkisinin İncelenmesi. 26. Ulusal Kimya Kongresi 2012 (Muğla Üniversitesi).

