

***EPILOBIUM HIRSUTUM* L. EKSTRESİNİN
PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ**

Buse VATANSEVER



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***EPILOBIUM HIRSUTUM* L. EKSTRESİNİN PROSTAT KANSERİ
HÜCRE HATLARINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Buse VATANSEVER
0000-0002-2873-3885

Prof. Dr. Hulusi MALYER
(Danışman)

Prof. Dr. Hale ŞAMLI
(İkinci Danışman)
(Bursa Uludağ Üniversitesi)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2020
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Buse VATANSEVER tarafından hazırlanan “*Epilobium hirsutum* L. Ekstresinin Prostat Kanseri Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Hulusi MALYER

İkinci Danışman : Prof. Dr. Hale ŞAMLI, Bursa Uludağ Üniversitesi

Başkan : Prof. Dr. Hulusi MALYER
0000-0002-6283-4540
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
0000-0002-5292-9482
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
0000-0002-4177-3478
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Neşe KIRIMER
0000-0003-3207-7275
Anadolu Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi,
Farmakognozi Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ
0000-0003-3038-6904
Balıkesir Üniversitesi,
Eğitim Fakültesi,
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

20/10/2020

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20/10/2020



Buse VATANSEVER

ÖZET

Doktora Tezi

EPILOBIUM HIRSUTUM L. EKSTRESİNİN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Buse VATANSEVER

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hulusi MALYER

İkinci Danışman: Prof. Dr. Hale ŞAMLI (Bursa Uludağ Üniversitesi)

Bu çalışmada; halk tıbbında birçok prostat hastalığının tedavisinde kullanılan ve ülkemizde doğal olarak yetişen *Epilobium hirsutum* L. (tüylü yakı otu) bitkisinin, DU 145 ve PC-3 insan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ham ekstrelerin ve kaba fraksiyonların hazırlanmasında 'biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama' yaklaşımı temel alınmıştır. Bitkinin toprak üstü kısımlarından, maserasyon yöntemiyle A (*n*-hekzan), B (diklorometan), C (%100 metanol), D (%80 metanol) ve E (su); Soxhlet ekstraksiyonuyla F (*n*-hekzan); Soxhlet ekstraksiyonu sonrası maserasyon ve geri soğutucu yöntemleriyle G (%80 metanol) ve H (%80 metanol); infüzyon yöntemiyle K (su) kodlu ekstreler elde edilmiştir. Aktif ekstrelerden ise kaba fraksiyonlama yapılmıştır. Ekstrelerin ve fraksiyonların sitotoksik aktiviteleri, SRB ve XTT hücre canlılık testleriyle taranmıştır. Sitotoksik ekstre/fraksiyon dozlarının neden olduğu ölüm şekli, M30 ELISA ve ikili boyama (Hoechst 33342/propidyum iyodür) yöntemleriyle analiz edilmiştir. Hücre ölüm yollarında görevli gen ve protein ekspresyonları ise, kantitatif gerçek zamanlı PZR ve western blot analizleri ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; en güçlü sitotoksik etkiyi E kodlu ekstrenin gösterdiği ve bu ekstrelerden hazırlanan E1 (kloroform), E2 (etil asetat), E3 (*n*-butanol) ve E4 (su) kodlu fraksiyonların ekstre kadar etkili olmadıkları tespit edilmiştir. Bu sonuç, ekstredeki etken maddelerin birlikte bulunmaları durumunda sinerjik etki göstermeleriyle açıklanmıştır. Sitotoksik (>IC₅₀) ve sitotoksik olmayan (<IC₅₀) ekstre (E) ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyonlarda sitotoksik aktivitelerin baskılandığı görülmüştür. Ekstrenin (E), otofaji ile apoptozu birlikte aktive ederek hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Bu veriler ışığında, aktif *E. hirsutum* ekstresinin fitokimyasal içeriklerinin analiz edilmesi ve *in vivo* etkilerinin değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Epilobium hirsutum* L., prostat kanseri, sitotoksisite.

2020, xv + 206 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF
EPILOBIUM HIRSUTUM L. EXTRACT ON PROSTATE
CANCER CELL LINES AT THE MOLECULAR LEVEL

Buse VATANSEVER

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hulusi MALYER

Second Supervisor: Prof. Dr. Hale ŞAMLI (Bursa Uludağ University)

In this study; it is aimed to investigate cytotoxic effect of *Epilobium hirsutum* L. (hairy willow-herb) plant, which is used in treatment of many prostate diseases in folk medicine and grows naturally in our country, on DU145 and PC-3 human androgen-independent prostate cancer cell lines at molecular level. In this context, 'biological activity guided fractionation' approach was taken as basis in preparation of raw extracts and fractions. From the above-ground parts of plant, A(*n*-hexane), B(dichloromethane), C(100% methanol), D(80% methanol) and E(water) by maceration; F(*n*-hexane) by Soxhlet extraction; G(80% methanol) and H(80% methanol) by maceration and back-cooler after Soxhlet extraction; K(water) extracts were obtained by infusion. Fractionation was made from active extract. Cytotoxicity of extracts and fractions were screened by SRB and XTT cell viability tests. The mode of death caused by cytotoxic extract/fraction doses was analyzed by M30 ELISA and double-staining(Hoechst 33342/propidium iodide). Gene and protein expressions involved in cell death pathways were determined by quantitative real-time PCR and western blot analysis. According to findings; E1(chloroform), E2(ethylacetate), E3(*n*-butanol) and E4(water) fractions prepared from this extract were found to have strongest cytotoxic effect. This result was explained by their synergistic effect when active ingredients in extract were present together. In combination with cytotoxic(>IC₅₀) and non-cytotoxic(<IC₅₀) extract(E) and paclitaxel, cytotoxic activities were suppressed. It has been determined that extract(E) causes cell death by co-activating autophagy and apoptosis. In light of these data, it was concluded that phytochemical content of active *E. hirsutum* extract should be analyzed and its *in vivo* effects should be evaluated.

Key words: *Epilobium hirsutum* L., prostate cancer, cytotoxicity.

2020, xv + 206 pages.

TEŞEKKÜR

Tezim konusunda bana ışık tutan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren, her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve önerileriyle beni daima yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hulusi MALYER'e,

Doktora eğitimim süresince hiçbir yardımı esirgemeyerek deneyim kazanmamı sağlayan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak geleceğime yön veren, her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm, iyi bir akademisyen olma yolunda örnek aldığım değerli ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hale ŞAMLI'ya,

Tez çalışmamda yer alan bitkinin ekstraksiyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi için laboratuvarlarının kapılarını bana açan, karşılıksız yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgi birikimlerini tüm içtenlikleri ile paylaşan, laboratuvarında zaman ve emek harcayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Neşe KIRIMER'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hale Gamze AĞALAR'a,

Doktora eğitimim boyunca değerli fikir ve tecrübelerinden faydalandığım, yakın ilgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a, Prof. Dr. Sevcan ÇELENK'e, Prof. Dr. Faruk BALCI'ya ve Doç. Dr. Özden ÇOBANOĞLU'na,

Deneysel çalışmalarım sırasında laboratuvarlarında bulunan her türlü imkândan, değerli görüş ve deneyimlerinden faydalanabilmeme olanak tanıyan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na, Prof. Dr. Abdullah YALÇIN'a, Prof. Dr. Ferda ARI'ya, Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ'a, Doç. Dr. Murat CENGİZ'e ve Araş. Gör. Dr. Mehmet SARIMAHMUT'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yön gösteren, koşulsuz yardım ve destekleri ile her konuda yanımda olan değerli ağabeyim Sayın Doç. Dr. Sena ARDIÇLI'ya ve değerli ablam Sayın Araş. Gör. Dr. Deniz DİNÇEL'e,

Çalışmalarım sırasında moral ve desteğini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan, birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili Eda SEKİZ'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayıp her zaman yanımda olan ve aldığım her kararda beni destekleyen, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi annem Nurdan VATANSEVER'e, babam Mesut VATANSEVER'e ve kardeşim Ayşe Sude VATANSEVER'e,

Tez çalışmamı, DDP(F)-2017/4 numaralı Doktora Destek Projesi ile destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na,

sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Buse VATANSEVER
20/10/2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Fitoterapi.....	3
2.2. Bitki Sekonder Metabolitleri.....	4
2.3. Biyolojik Aktivite Rehberli Fraksiyonlama Yaklaşımı.....	7
2.4. Onagraceae Familyası.....	8
2.5. <i>Epilobium</i> L. Cinsi.....	8
2.6. <i>Epilobium hirsutum</i> L.	9
2.6.1. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları.....	11
2.6.2. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin fitokimyasal bileşimi.....	12
2.6.3. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin geleneksel halk tıbbında kullanımı.....	16
2.6.4. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin biyolojik aktiviteleri.....	17
2.6.5. Unotein B’nin biyolojik aktiviteleri.....	20
2.6.6. <i>Epilobium hirsutum</i> L. ekstralarının toksisitesi ve güvenliği.....	21
2.7. Kanser.....	22
2.8. Prostat Kanseri.....	24
2.9. Hücre Ölüm Yolakları.....	27
2.9.1. Apoptoz.....	27
2.9.2. Programlı nekroz (Nekroptoz).....	30
2.9.3. Otofaji.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Bitki materyali.....	37
3.1.2. Hücre hatları.....	37
3.1.3. Kimyasal maddeler ve ticari kitler.....	38
3.1.4. Primerler ve problemler.....	40
3.1.5. Antikorlar.....	40
3.1.6. Sarf malzemeler.....	41
3.1.7. Cihazlar ve ekipmanlar.....	42
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin toplanması, tanımlanması ve kurutulması.....	43
3.2.2. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin ekstraksiyon çalışmaları.....	45
3.2.3. Ekstrelerin yoğunlaştırılması.....	52
3.2.4. Kaba fraksiyonların hazırlanması.....	54
3.2.5. Hücre kültürü.....	58
3.2.6. Tripan mavisi boyası ile canlı hücrelerin sayılması.....	60
3.2.7. Sitotoksik etkiyi belirlemek üzere hücrelerin ekimi.....	61
3.2.8. Test bileşiklerinin hazırlanması ve hücrelere uygulanması.....	62
3.2.9. Sitotoksik etkinin belirlenmesi.....	63
3.2.10. Kombinasyon analizi.....	66

3.2.11. Hücre morfolojisinin değerlendirilmesi	67
3.2.12. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerinin ölçülmesi	68
3.2.13. Floresan mikroskopunda hücre ölüm modunun belirlenmesi	70
3.2.14. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	72
3.2.15. Western blot analizi.....	78
3.2.16. İstatistiksel analiz	83
4. BULGULAR	84
4.1. Botanik Çalışmalara İlişkin Bulgular	84
4.1.1. Tayin anahtarları	84
4.1.2. Ekstraksiyon ve fraksiyonlama çalışmaları.....	87
4.2. <i>In Vitro</i> ve Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular	90
4.2.1. Ham ekstratların sitotoksik etkilerine ilişkin bulgular	90
4.2.2. Kaba fraksiyonların sitotoksik etkilerine ilişkin bulgular	100
4.2.3. Unotein B'nin sitotoksik etkisine ilişkin bulgular	109
4.2.4. Paklitaksel'in sitotoksik etkisine ilişkin bulgular	115
4.2.5. Kombinasyon analizine ilişkin bulgular	121
4.2.6. Hücre morfolojilerindeki değişikliklere ilişkin bulgular	136
4.2.7. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerine ilişkin bulgular	155
4.2.8. Floresan mikroskopunda ikili boyama yöntemine ilişkin bulgular.....	157
4.2.9. Gen ekspresyon analizine ilişkin bulgular	162
4.2.10. Western blot analizine ilişkin bulgular	165
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	169
KAYNAKLAR	183
EK.....	205
ÖZGEÇMİŞ	206

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
β	Beta
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram/Mililitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
a/h	Ağırlık/Hacim
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
g	Gram
kDa	Kilodalton
m	Metre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mg	Miligram
mg/g	Miligram/Gram
mg/kg	Miligram/Kilogram
mg/ml	Miligram/Mililitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
pH	Potansiyel Hidrojen
U/L	Ünite/Litre
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklama
ACTB	β -Actin
ADT	Androjen Deprivasyon Tedavisi (Androgen Deprivation Therapy)
AIF	Apoptoz İndüklenme Faktörü (Apoptosis-Inducing Factor)
AKT	Protein Kinaz B (Protein Kinase B, PKB)
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1)
AR	Androjen Reseptör (Androgen Receptor)

ATG	Otofaji ile İlişkili Genler (Autophagy-Related Genes)
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BECN1	Beclin 1
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
BULU	Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbariumu
CAD	Kaspazla Aktive Edilmiş Deoksiribonükleaz (Caspase-Activated Deoxyribonuclease)
CASP3	Caspase 3
CASP8	Caspase 8
CASP9	Caspase 9
CASP10	Caspase 10
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CK18	Sitokeratin 18 (Cytokeratin 18)
CO ₂	Karbondioksit
CYCS	Cytochrome C
dATP	Deoksi Adenozin Tri Fosfat
DD	Ölüm Domaini (Death Domain)
DISC	Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi (Death-Inducing Signalling Complex)
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DR	Ölüm Reseptörleri (Death Receptor)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmüno Sorbent Testi
EndoG	Endonükleaz G
FADD	Fas İlişkili Ölüm Domaini (Fas-Associating Death Domain)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FasL	Fas Ligand
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FE	Fosfotidiletanolamin
FIP200	Fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein, 200 kDa
FITC	Floresin İzotiyosiyanat (Fluorescein Isothiocyanate)
FRET	Floresan Rezorans Enerji Transferi
GLUD1	Glutamat Dehidrogenaz 1
GLUL	Glutamat-Amonyak Ligaz
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
HCl	Hidroklorik Asit

HPLC-DAD-MS/MS	Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Array Dedektörü-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi (High-Performance Liquid Chromatography-Diode-Array Detector-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)
HPLC/MS	Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
HRP	Horseradish Peroksidaz (Horseradish Peroxidase)
IAP	Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörleri (Inhibitors of Apoptosis Proteins)
ICAD	Kaspazla Aktive Edilmiş Deoksiribonükleaz İnhibitörü (Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease)
IC ₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu (Half Maximal Inhibitory Concentration)
L.	Linnaeus
LC/MS	Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
mTORC1	Rapamisin Kompleksi 1'in Memeli Hedefi (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1)
N ₂	Azot
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute)
NEMO	NF-κB Esansiyel Modülatörü
PAR	Poli(ADP)-Riboz (Poly(ADP)-Ribose)
PARP	Poli(ADP-Riboz) Polimeraz (Poly(ADP-Ribose) Polymerase)
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz (Phosphoinositide 3-Kinase)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PSA	Prostat-Spesifik Antijen
PYGL	Glikojen Fosforilaz
RIP	Reseptör ile Etkileşen Protein (Receptor Interacting Protein)
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SRB	Sülforodamin B

TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TCA	Trikloroasetik Asit
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF α	Tümör Nekroz Faktör α (Tumor Necrosis Factor α)
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (Tumour Necrosis Factor Receptor)
TRADD	TNFR İlişkili Ölüm Domaini (TNFR-Associating Death Domain)
TRAF	TNF Reseptör İlişkili Faktör (TNF Receptor Associated Factor)
TRAIL	TNF İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)
TRAIL-R1	TRAIL reseptör 1
TRAIL-R2	TRAIL reseptör 2
UV	Ultraviyole
XTT	2,3-Bis(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-5-[(Fenilamino)Karbonil]- 2H-Tetrazolyum Hidroksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Bitki sekonder metabolitlerinin biyosentez yollarını gösteren şema	6
Şekil 2.2. Doğal yayılış alanındaki <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin genel görünümü ile çiçekli ve yapraklı dalların yakından görünüşü	10
Şekil 2.3. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin illere (üstte) ve kareleme sistemine (altta) göre yayılış alanları	12
Şekil 2.4. Unotein B'nin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.5. Kanser hücrelerinin özellikleri	23
Şekil 2.6. Apoptoz sinyal yolları	30
Şekil 2.7. Nekroptoz (programlı nekroz) sinyal yolları	32
Şekil 2.8. Apoptoz ve nekroptoz	33
Şekil 2.9. Otofaji sinyal yolları	36
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatları, DU 145 ve PC-3	38
Şekil 3.2. Doğal yayılış alanındaki <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisi	44
Şekil 3.3. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinin kurutulması	45
Şekil 3.4. Kaba toz haline getirilmiş drog	46
Şekil 3.5. Maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon	47
Şekil 3.6. Soxhlet ekstraksiyonu	49
Şekil 3.7. Geri çeviren soğutucu düzeneğinde ekstraksiyon	51
Şekil 3.8. Ekstrelerin rotary evaporatörde yoğunlaştırılması	53
Şekil 3.9. Büyük ölçekli maserasyon	55
Şekil 3.10. Kaba fraksiyonların hazırlanması	56
Şekil 3.11. Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı ile gerçekleştirilen çalışma planı	57
Şekil 3.12. SDS-PAGE	80
Şekil 3.13. Transfer materyallerinin hazırlanması ve ıslak transferin gerçekleştirilmesi	82
Şekil 4.1. Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi ile ekstrelerin ve fraksiyonların elde edilmesi	89
Şekil 4.2. DU 145 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	91
Şekil 4.3. PC-3 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	93
Şekil 4.4. DU 145 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	96
Şekil 4.5. PC-3 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	98
Şekil 4.6. DU 145 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	101

Şekil 4.7. PC-3 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	103
Şekil 4.8. DU 145 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	106
Şekil 4.9. PC-3 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	107
Şekil 4.10. DU 145 ve PC-3 hücrelerine unotein B uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	111
Şekil 4.11. DU 145 ve PC-3 hücrelerine unotein B uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	114
Şekil 4.12. DU 145 ve PC-3 hücrelerine paklitaksel uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	117
Şekil 4.13. DU 145 ve PC-3 hücrelerine paklitaksel uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi	120
Şekil 4.14. DU 145 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	122
Şekil 4.15. DU 145 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	123
Şekil 4.16. DU 145 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	124
Şekil 4.17. PC-3 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	125
Şekil 4.18. PC-3 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	126
Şekil 4.19. PC-3 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	127
Şekil 4.20. DU 145 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	129
Şekil 4.21. DU 145 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	130
Şekil 4.22. DU 145 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	131

Şekil 4.23. PC-3 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	132
Şekil 4.24. PC-3 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	133
Şekil 4.25. PC-3 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi	134
Şekil 4.26. Ham ekstrelerin farklı konsantrasyonları (100 ve 200 µg/ml) ile 24 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)	137
Şekil 4.27. Ham ekstrelerin farklı konsantrasyonları (100 ve 200 µg/ml) ile 48 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)	139
Şekil 4.28. Ham ekstrelerin farklı konsantrasyonları (100 ve 200 µg/ml) ile 72 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)	141
Şekil 4.29. Kaba fraksiyonlar (100 µg/ml) ile 24 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10).....	143
Şekil 4.30. Kaba fraksiyonlar (100 µg/ml) ile 48 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10).....	144
Şekil 4.31. Kaba fraksiyonlar (100 µg/ml) ile 72 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10).....	146
Şekil 4.32. Unotein B maddesinin farklı konsantrasyonları (80 ve 160 µg/ml) ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)	148
Şekil 4.33. Paklitakselin farklı konsantrasyonları (0,005 ve 0,01 µg/ml) ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10).....	150
Şekil 4.34. Ekstre ve paklitaksel kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra DU 145 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10).....	152
Şekil 4.35. Ekstre ve paklitaksel kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)	154
Şekil 4.36. 24, 48 ve 72 saat boyunca ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B uygulanan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeyleri	156
Şekil 4.37. Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B uygulanan DU 145 hücrelerinin floresan mikroskopundaki ikili boyama görüntüleri	159
Şekil 4.38. Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B uygulanan PC-3 hücrelerinin floresan mikroskopundaki ikili boyama görüntüleri	161
Şekil 4.39. DU 145 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri.....	163

Şekil 4.40. PC-3 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri.....	164
Şekil 4.41. DU 145 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili proteinlerin ekspresyon profilleri	166
Şekil 4.42. PC-3 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili proteinlerin ekspresyon profilleri	168

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitler.....	13
Çizelge 2.1. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitler (devam).....	14
Çizelge 2.1. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitler (devam).....	15
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler.....	38
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler (devam).....	39
Çizelge 3.2. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primerler ve problar.....	40
Çizelge 3.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan antikorlar	40
Çizelge 3.4. Deneysel çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler.....	41
Çizelge 3.5. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve ekipmanlar	42
Çizelge 3.5. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve ekipmanlar (devam).....	43
Çizelge 3.6. Ekstrelerin hazırlanmasında kullanılan çözücülerin fizikokimyasal özellikleri.....	51
Çizelge 3.7. Fraksiyonların hazırlanmasında kullanılan çözücülerin fizikokimyasal özellikleri.....	55
Çizelge 3.8. Kombinasyon analizi için oluşturulan tedavi grupları	67
Çizelge 3.9. DU 145 ve PC-3 hücre hatları için elde edilen ortalama IC ₅₀ dozları	69
Çizelge 3.10. İkili boyama yöntemiyle hücre ölüm modunun tespit edilmesi.....	71
Çizelge 3.11. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı	75
Çizelge 3.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genler ve primer dizileri.....	76
Çizelge 3.13. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı.....	77
Çizelge 3.14. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi için cihaz protokolü.....	77
Çizelge 3.15. Western blot analizinde kullanılan primer antikorlara ilişkin bilgiler	83
Çizelge 4.1. <i>Epilobium hirsutum</i> L. bitkisinden elde edilen ham ekstratlar ve kaba fraksiyonlar	88
Çizelge 4.2. <i>Epilobium hirsutum</i> L. ham ekstratlarının SRB testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları	94
Çizelge 4.3. <i>Epilobium hirsutum</i> L. ham ekstratlarının XTT testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları	99
Çizelge 4.4. <i>Epilobium hirsutum</i> L. kaba fraksiyonlarının SRB testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları	104
Çizelge 4.5. <i>Epilobium hirsutum</i> L. kaba fraksiyonlarının XTT testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları	108
Çizelge 4.6. Unotein B'nin SRB testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları.....	112
Çizelge 4.7. Unotein B'nin XTT testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları.....	115
Çizelge 4.8. Paklitakselin SRB testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları	118
Çizelge 4.9. Paklitakselin XTT testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları	121
Çizelge 4.10. Kombinasyon tedavisinin SRB testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları.....	128
Çizelge 4.11. Kombinasyon tedavisinin XTT testiyle hesaplanan IC ₅₀ dozları.....	135

Çizelge 4.12. RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları	162
Çizelge 4.13. Protein örneklerinin konsantrasyonları	165

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde insanlığın karşılaştığı en önemli sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yayınladığı güncel verilerde; 2018 yılında, dünya çapında 18 078 957 kişiye kanser tanısı konulduğu, 9 555 027 kişinin kanser sebebiyle hayatını kaybettiği açıklanmıştır. Sözü edilen verilere göre; 2018 yılında, prostat kanseri teşhis edilen kişi sayısının 1 276 106, prostat kanserine bağlı olarak hayatını kaybeden kişi sayısının 358 989 olduğu tespit edilmiştir. Prostat kanseri, akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür (Anonim 2019a). DSÖ, kanser insidansının ve mortalitesinin mevcut eğilimde devam etmesi durumunda, gelecek 20 yıl içinde kanser vakalarında %60 oranında bir artış olacağını tahmin etmektedir (Anonim 2020a). DSÖ'nün, Türkiye'ye ilişkin yayınladığı verilere göre; 2018 yılında, 210 537 yeni kanser vakası görülürken kanser nedeniyle ölenlerin sayısı 116 710 olarak belirlenmiştir. Dünya geneliyle benzer olarak, ülkemizde de en yaygın görülen ikinci kanser türü prostat kanseridir (Anonim 2019b). Günümüzde, prostat kanserinde sağ kalımı artırmak ve istenilen tedavi başarısını elde edebilmek amacıyla farklı tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Ancak, prostat kanserinin tedavisi sürecinde başarıyı sınırlandıran birçok engel ile karşılaşabilmektedir. Bundan dolayı, prostat kanseri tedavisinde uygulanabilir yeni stratejilerin geliştirilmesi adına pek çok çalışma yürütülmektedir.

Kanser hastalığının görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm oranlarında yaşanan artış ile beraber tedavi maliyetinin yüksek olması, daha iyi ilaç geliştirmek için yapılan araştırmalara hız kazandırmıştır. Son yıllarda, bitkisel doğal bileşiklerin kemopreventif ve/veya kemoterapötik ajanlar olarak kullanılmasına yönelik ilgi giderek artmaktadır (Nobili ve ark. 2009). Özellikle, tıbbi bitkiler sahip oldukları zengin ve aktif sekonder metabolitleri ile daha etkili kanser tedavisi için her zaman ümit vericidir. Nitekim tıbbi bitkilerin olası antikanser aktivitelerini aydınlatmak amacıyla gerçekleştirilen tarama çalışmaları sayesinde günümüzde klinik kullanımı olan birçok kemoterapötik ajan keşfedilmiştir. *Catharanthus roseus* G. Don. (Madagaskar menekşesi, Apocynaceae) bitkisinden izole edilen vinblastin ve vinkristin (vinka alkaloidleri) (Gueritte ve Fahy 2005), *Podophyllum* (Podophyllaceae) türlerinden izole edilen epipodofilotoksinin yarı-sentetik türevleri etoposid ve teniposid (Lee ve Xiao 2005), *Taxus brevifolia* Nutt.

(Pasifik porsuk ağacı, Taxaceae) kabuğundan izole edilen paklitaksel ve paklitakselin yarı-sentetik türevi dosetaksel (Kingston 2005), *Camptotheca acuminata* Decne (Çin süs ağacı, Nyssaceae)'dan izole edilen kamptotesin bileşiğinin yarı-sentetik türevleri topotekan ve irinotekan (Rahier ve ark. 2005), *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* Sieb and Zucc. (Japon erik porsuğu, Cephalotaxaceae) bitkisinden izole edilen harringtonin ve homoharringtonin (Itokawa ve ark. 2005), Apocynaceae familyasına ait birkaç türden izole edilen elliptinium (Cragg ve Newman 2005) klinikte kullanılan bitkisel kökenli antikanser ajanlardır. Bitkiler ve etken maddeleri, hedefe yönelik tedaviler ve yeni ilaçlar için halen mükemmel bir kaynak sunmaktadır ve bilim insanları tarafından araştırılmayı beklemektedir.

Onagraceae familyasına ait *Epilobium hirsutum* L. (tüylü yakı otu) bitkisi, Anadolu'da ve diğer toplumlarda prostat kanseri başta olmak üzere birçok hastalığının tedavisinde kullanılan etnofarmakolojik öneme sahip bir bitkidir (Hiermann 1983, Hiermann ve ark. 1986, Pogrel ve ark. 1993, Hostettmann 1995, Gruenwald 1998, Gruenwald ve ark. 2000, Tita ve ark. 2001, Everest ve Öztürk 2005). Halk tıbbında, bu bitki ile ilgili geleneksel olarak oluşmuş tecrübeye dayalı bir bilgi ve güven birikimi bulunmakla birlikte, literatürde bu bitkinin prostat kanserindeki aktivitesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, *E. hirsutum* bitkisinin etnobotanik veriler ışığında bilimsel olarak değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda; mevcut tez çalışmasında, *E. hirsutum* bitkisinden 'biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı' esas alınarak hazırlanan ekstre ve fraksiyonların, insan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatları (DU 145 ve PC-3) üzerindeki olası sitotoksik/apoptotik etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, bitkinin temel bileşiği olan ve aktiviteden sorumlu olduğu ifade edilen unotein B (oenothein B)'nin, çalışma kapsamında kullanılması ve sitotoksik/apoptotik etki yönünden analiz edilmesi planlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fitoterapi

İlk kez Fransız hekim Henri Lenclerc tarafından ifade edilen fitoterapi terimi, bitkilerle tedavi anlamına gelmektedir (Şarışen ve Çalışken 2005). İnsanoğlunun hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde bitkilerden faydalanması çok eski çağlara, başka bir ifadeyle insan yaşamı tarihine dayanmaktadır (Halberstein 2005, Jamshidi-Kia ve ark. 2018). Bitkilerin, çok eski zamanlardan beri ilaç olarak kullanılmak üzere yetiştirildiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır (Solecki 1975). İlk yazılı belge, yaklaşık 5 000 yıl önce yazılmış olan Sümer tabletleridir (Qiu 2007, Kelly 2009). Ayrıca; Mısır, Çin, Hint, Antik Yunan ve Orta Asya tıbbında, şifa bulmak adına bitkilerin kullanıldığına dair kayıtlar mevcuttur (Ang-Lee ve ark. 2001). İslam Uygarlığında ise İbn el-Baytar, İbn-i Sina, Ebu Reyhan ve Al Gafini'nin bitkilerle tedavi konusunda önemli eserleri bulunmaktadır (Ullmann 1978). Bunlara ilave olarak, yazılı olmayan ve sadece bir yöreye özgü etnomedikal ve/veya etnobotanik bilgilerin sözlü olarak kuşaktan kuşaktan aktarıldığı da bilinmektedir (Sharma ve ark. 2012, Bhatia ve ark. 2014). İnsanlar, bu bilgileri içgüdüsel olarak ve deneme yanılma yoluyla keşfetmişlerdir, tecrübelerini kullanarak tıbbi reçetelerini geliştirip günümüze kadar ulaştırmışlardır (İli 2003, Sharma ve ark. 2012, Faydalıoğlu ve Sürücüoğlu 2013, Bhatia ve ark. 2014, Aslan ve Karakuş 2019, Gökteş ve Gıdık 2019).

Tıbbi bitki terimi; sağlığın korunmasında, hastalıkların önlenmesinde ve tedavilerin desteklenmesinde kullanılan, tıbbi tesire sahip etken madde taşıyan bitkileri tanımlayan bir terimdir (Demirci ve ark. 2010a, Jamshidi-Kia ve ark. 2018). DSÖ'nün tahminlerine göre; gelişmekte olan ülkelerde, nüfusun %65-80'inin tedavi amacıyla tıbbi bitkilerden faydalanmaktadır (Joy ve ark. 2001, Anonim 2011) ve yaklaşık 21 000 bitki türü ilaç olma potansiyeline sahiptir. Buna karşılık; Schippmann ve ark. (2006), sağlığı geri kazanmak ve korumak için dünya çapında kullanılan tıbbi bitki türü sayısının 72 000 olduğunu ifade etmiştir. Tıbbi öneme sahip bitkilerin bazıları yerel olarak kullanıldığından sayı tam olarak belirlenmemektedir. Günümüzde hastalıkları önlemek veya tedavi etmek maksadıyla kullanılan modern ilaçların yaklaşık %25'inin, çoğunlukla bitkileri içeren doğal ürünlerden elde edildiği bildirilmiştir (Brower 2008,

Newman ve Cragg 2012). Birleşmiş Milletlerin Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization, FAO)'ne göre ise, dünya genelinde satılan ilaçların %30'u bitkisel etken madde taşımaktadır (Anonim 2005). Türkiye; coğrafi konumu, jeolojik özellikleri ve iklimi nedeniyle toplam 11 707 tür ve tür altı taksonu (yabancı kökenli bitkiler ile kültür bitkileri dâhil olmak üzere) bünyesinde barındıran zengin ve eşsiz floristik hazineye sahiptir (Güner ve ark. 2012). Türkiye'de, yaklaşık 650 kadar bitkinin tıbbi özellikte olduğu bildirilmiştir (Baytop 1984). Geçmiş dönemlerde çok sayıda medeniyete ev sahipliği yapan ülkemiz, tarihsel süreçten günümüze dek ulaşan değerli bir etnobotanik bilgi birikimine de sahiptir (Baytop 1999, Kendir ve Güvenç 2010). Tıbbi bitkiler, ülkemizin dış ticaretinde önemli bir yere sahip olup ülke ekonomisine ciddi katkılar sağlamaktadır. Bu sebeple, hem Türkiye'de hem dünyada tıbbi bitkilerin tarımı ve üretimi yapılmaktadır (Temel ve ark. 2018). Buna karşılık, iyi kalitede ürüne duyulan ihtiyaç nedeniyle tıbbi bitkiler doğadan bilinçsizce toplanmaktadır. Bu durum, bitkilerin yayılış alanlarının tahrip olmasına yol açmakta ve türlerin neslini tehlikeye sokmaktadır. Bu olumsuzluğun önüne geçmek için atılacak en doğru adım, tıbbi bitkilerin kültüre alınarak geniş ölçekli tarımın yapılması ve sürdürülebilirliğin sağlanmasıdır (Kösa ve Güral 2019).

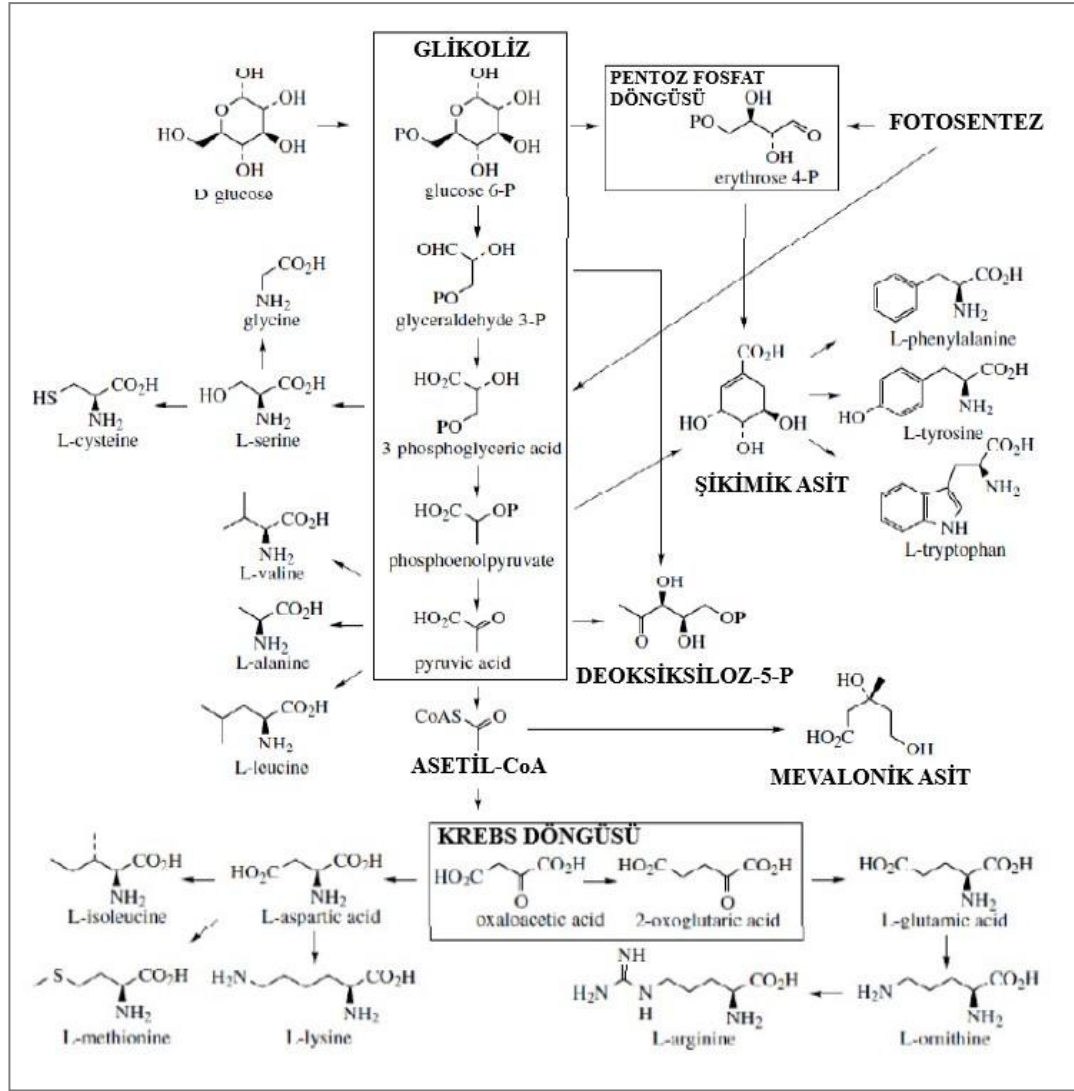
Fitoterapide, tıbbi bitkilerin drog olarak adlandırılan ve aktif bileşen içeren kısımları kullanılarak ilaçlar hazırlanmaktadır. Bir bitkinin; yaprak, çiçek, gövde, kabuk, meyve, tohum, ot, odun, kök, soğan, yumru, rizom, dal/sap, dal uçları ve tomurcukları gibi kısımları hatta bitkinin tamamı, kuru ya da taze halde, drog olarak kullanılabilir (Demirci ve ark. 2010a, Jamshidi-Kia ve ark. 2018). Ayrıca, bitkilerden özel işlemlerin uygulanmasıyla elde edilen ekstre, çay, nişasta, mazi, zamk, reçine, balsam, katran, yağ (sabit, uçucu), mum, usare, tentür, yakı ve salgı ürünleri (lateks) gibi preparatlardan da bitkisel drog olarak yararlanılmaktadır (Demirci ve ark. 2010a, Demirci ve ark. 2010b).

2.2. Bitki Sekonder Metabolitleri

Günümüzde, birçok hastalığın tedavisinde çoğunlukla sentetik kökenli ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlarla tedavi, önemli klinik başarıların elde edilmesini sağlamakla birlikte, vücutta bir takım zararlara ve yan etkilere de neden olmaktadır. Bu yüzden, hiçbir yan etkisi bulunmayan veya daha az yan etkiye sahip olan tıbbi bitkilerin

ve etken maddelerinin önemi giderek daha fazla anlaşılmaktadır (Zargari 1992, Jamshidi-Kia ve ark. 2018). Son yıllarda; ilaç keşfi ve geliştirme alanındaki çalışmalar, bitkilerde bulunan tıbbi potansiyele sahip etken maddelere yoğunlaşmaktadır. Bitki sekonder metabolitlerinin izole edilmesi, tanımlanması ve test edilmesi ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır (Wink 1999, Wink 2003, Wink 2008 ve Okada ve ark. 2010).

Bitkiler, primer ve sekonder metabolitler olarak gruplandırılan bir dizi organik bileşik sentezlemektedir (Crozier ve ark. 2006). Bir bitki hücresinde gerçekleşen biyosentez sürecinde, primer ve sekonder metabolizma yolları birbiriyle bağlantılı olup biyosentetik yollarla primer metabolitlerden sekonder metabolitler üretilebilmektedir (Kabera ve ark. 2014, Eid ve ark. 2015) (Şekil 2.1). Primer metabolitler; fotosentez, solunum, büyüme, gelişme gibi bitkisel canlılık faaliyetleri için gerekli olan nükleik asitler, aminoasitler, basit şekerler, organik asitler, lipidler ve fitosterollerdir (Crozier ve ark. 2006, Demirci ve ark. 2010a). 'Fitokimyasallar' olarak bilinen sekonder metabolitler, bitkilerde genellikle özel ihtiyaçlar için sentezlenen ve sekonder metabolizma sonucu üretilen maddelerdir (Crozier ve ark. 2006, Demirci ve ark. 2010a, Kabera ve ark. 2014). Sekonder metabolitlerin, bitkilerdeki fonksiyonu kesin olarak bilinmemekle birlikte (Kabera ve ark. 2014); büyüme, gelişme ve üreme gibi yaşamsal olaylarla doğrudan bir ilgisinin bulunmadığı ifade edilmiştir (Fraenkel 1959). Sekonder metabolitlerin hücre içindeki faaliyetleri, uzun süre boyunca ihmal edilmiş olmasına rağmen (Crozier ve ark. 2006), bitkilerin savunma sistemlerinde anahtar rol oynadıkları keşfedilmiştir (Kabera ve ark. 2014). Sekonder metabolitler; herbivorlara, mikrobiyal enfeksiyonlara, UV ışınlarına ve habitattaki muhtemel zararlara karşı korumada, ayrıca allelopatik ajan olarak diğer türler arası korumada ve sinyal molekülü olarak baklagillerdeki azot tespit edici kök nodüllerin oluşumunda görev almaktadır (Croteau ve ark. 2000, Dewick 2002, Stamp 2003, Crozier ve ark. 2006, Samuni-Blank ve ark. 2012, Efferth ve ark. 2017). Üstelik, polen taşıyıcı ve tohum dağıtıcı hayvanlar için cezbetici olarak görev yaparak ekolojik açıdan da öneme sahiptirler (Crozier ve ark. 2006).



Şekil 2.1. Bitki sekonder metabolitlerinin biyosentez yollarını gösteren şema (Kabera ve ark. 2014’den değiştirilerek alınmıştır)

Yapısal olarak çeşitlilik gösteren sekonder metabolitler, bitkiler aleminde belirli bir familya, cins, tür için spesifik olabilmektedir. Bundan dolayı, kemotaksonomik çalışmalarda teşhis edici özellik olarak sekonder metabolitlerden yararlanılabilmektedir (Thrane 2001, Crozier ve ark. 2006).

Bitki sekonder metabolitleri, biyosentezik kökenlerine göre 3 grupta sınıflandırılmaktadır: Fenolik bileşikler, terpenoitler ve alkaloitler. Ayrıca; glikozitler, tanenler, saponinler ve uçucu yağlar sözü edilen bileşiklerin diğer bir bölümünü oluşturmaktadır (Crozier ve ark. 2006, Kabera ve ark. 2014, Eid ve ark. 2015).

Zengin fitokimyasal kaynağı olan bitkiler, tıbbi değere sahip farmakolojik aktiviteler (kardiyovasküler, antikanser, antibiyotik, analjezik, antihipertansif, gastrointestinal, immünsüpresif gibi) sergilemektedirler (Monaghan ve Tkacz 1990, Ahmad ve ark. 1998, Datta ve ark. 1998, Abo ve ark. 2000, Lovkova ve ark. 2001, Lampronti ve ark. 2006, Efferth ve ark. 2017). Ancak, bitkiler birçok fitokimyasal maddeyi kompleks bir karışım olarak bulundurmakta ve bu maddeler birbirleriyle etkileşim içinde bulunabilmektedirler (Kabera ve ark. 2014, Jamshidi-Kia ve ark. 2018). Bu etkileşim, zararlı etkilerin elimine edilmesiyle güçlü aktivite sağlayabildiği gibi, bileşiklerin potansiyel etkilerini baskılayarak zayıf etkiye de neden olabilir. Bu sebeple, hem tıbbi bitkilerin hem de bunlardan izole edilen etken maddelerin yapılarını tayin etmek ve aktivitelerini analiz etmek, bu alanda yürütülen çalışmalarda dikkate alınması gereken bir konu olmalıdır (Efferth ve ark. 2002, Li ve ark. 2008, Jamshidi-Kia ve ark. 2018).

2.3. Biyolojik Aktivite Rehberli Fraksiyonlama Yaklaşımı

Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı, terapötik etkilerin (çoğunlukla *in vitro* olarak) değerlendirilmesiyle doğal kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin izole edilmesini ve tanımlanmasını temel alan modern bir yöntemdir (Sarker ve ark. 2006, Zhang 2011). Bu yöntemde, ilk olarak potansiyel etkiye sahip olduğu düşünülen bitki materyalinden ekstratlar hazırlanarak aktiviteleri test edilmektedir. Daha sonra, beklenen etkiyi sergileyen aktif ekstratlar fraksiyonlanarak, biyoaktiviteden sorumlu maddeler izole edilmektedir. Fraksiyonlama işleminin her aşaması, *in vitro* testler kullanılarak biyolojik aktiviteye göre yönlendirilmektedir. Bu süreç boyunca, her bileşiğin etkisi taranmaktadır ve böylece, etkin bileşiklerin saf bir şekilde elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bu yaklaşımda, yüksek-performanslı sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, HPLC/MS), sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS), vb. gibi günümüzün gelişmiş teknikleri kullanılarak ham ekstratların ve fraksiyonların ön analizleri yapılabilmektedir (Sarker ve ark. 2006, Jamshidi-Kia ve ark. 2018).

2.4. Onagraceae Familyası

Onagraceae familyası üyeleri, otsu bitkilerdir (Türkiye’de). Yapraklar; basit, karşılıklı, alternat, spiral şekilde düzenlenmiş ya da alternattır, genellikle stipülsüzdür. Çiçekler tek veya yaprak aksillerinde ya da rasemlerde çifttir. Çiçekler hermafrodit, aktinomorfik veya zayıf zigomorfik simetridir. Hipantiyal tüp sıklıkla bulunur. Sepaller 2, 4 veya 5 tane ve valvattır. Petaller 0, 2, 4 veya 5 tane, serbest, bükülmüş veya imbrikat şekilde, tomurcukta buruşuk olmayan yapıdadır. Stamenler, tek bir sarmalda 2-4 veya iki sarmalda 8-10 tanedir. Ovaryum alt durumlu; 1, 2, 4 veya 5 lokuluslu; her lokulusta 1 veya çok sayıda anatrop ovüller bulunur. Stilüs tektir. Meyve kapsül, kuru ve kapalı yapıdadır. Tohumlar endosperma içermez (Davis 1972).

Onagraceae familyası Türkiye Florası’nda 4 cins (*Circaea*, *Ludwigia*, *Epilobium*, *Oenothera*) ve toplam 33 takson ile temsil edilmektedir (Güner ve ark. 2012).

2.5. *Epilobium* L. Cinsi

Epilobium L. cinsine ait taksonlar dik, otsu ve çok yıllık bitkilerdir. Yapraklar en azından tabanın yakınında karşılıklı, yukarıda spiral şekilde düzenlenmiş veya tümü spiral şekilde düzenlenmiş, nadiren daireseldir. Çiçekler tek ve aksillerdir veya basit ya da bileşik brakteli rasemlerde bulunur. Çiçekler aktinomorfik veya zigomorfik simetridir, 4 parçalıdır. Hipantiyal tüp kısadır veya yoktur. Sepaller serbesttir; petaller beyazımsı, pembe veya mor, genellikle emerginat (derin girintili)’dir. Stamenler 8 tanedir. Stigma; çomaksı (clavat)-derin 4 loblu yapıdadır, ovaryum 4 lokulusludur. Meyve, 4 kapağa açılan dar silindirik bir kapsüldür. Tohumlar 1-2 mm büyüklükte, papilloz (tüberkülat) veya pürüzsüzdür; her biri kalaza tüyleri içerir (komoz, püsküllü). Yetersiz tanımlanmış birkaç türe sahip zor bir cinstir; belirli tanımlama için genellikle iyi çiçeklenme ve meyve materyali gereklidir (Haussknecht 1884, Raven 1962, Davis 1972).

Epilobium L., Onagraceae familyasında en çok takson içeren cinstir (Ford ve Gottlieb 2007). Türkiye’de *Epilobium* L. cinsinde alttürler ile birlikte toplam 26 taksonun bulunduğu bildirilmiştir (Güner ve ark. 2012, Anonim 2020b).

2.6. *Epilobium hirsutum* L.

Sp. PL 347 (1753). Syn: *E. tomentosum* Vent., Hort. Cels. 90., t. 90 (1800); *E. nassirelmulii* Stapf in Denkschr. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Kl. 51:325 (1886). Ic: Syme, Engl. Bot. 4: t. 497 (1865); Ross-Craig, Draw. Brit. Pl. 11: t 18(1958).

E. hirsutum bitkisinin sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir (Cronquist 1968):

Regnum: Plantae

Subregnum: Tracheobionta

Divisio: Magnoliophyta

Classis: Magnoliopsida

Subclassis: Rosidae

Ordo: Myrtales

Familia: Onagraceae

Genus: *Epilobium*

Sect.: *Epilobium*

Species: *Epilobium hirsutum* L. Sp. Pl.1: 347 (1753)

E. hirsutum bitkisi, kalın bir rizoma sahip çok dallanmış, dik yapılı çok yıllık bir bitkidir. Gövde 30-210 cm uzunluğunda, yoğun villoz tüylüdür. Yapraklar lanseolat-oblong şekilde, 2-12 x 0-8-2-5 cm büyüklüğünde, yoğun villoz, serrat, sapsız, gövdeyi saran yapıdadır. Çiçek durumu, salgılı ve salgısız tüyler içerir. Çiçekler pembemsi-mor renktedir. Petaller 8-20 mm arasında değişen uzunluktadır; stigma derin 4-lobludur. Kapsül 4-10 cm'dir; tohumlar obovat şekilde olup 1-15 mm büyüklükte ve papillozdur. Çiçeklenme dönemi, Temmuz-Eylül arasındadır. Bitki; bataklıklar, dere kenarları ve deniz seviyesinden 2300 m yüksekliğe kadar ulaşan alanlarda yayılış göstermektedir (Davis 1972) (Şekil 2.2).

E. hirsutum bitkisi, Anadolu'da çoğunlukla tüylü yakı otu olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra; büyük yakı otu, merakülü, çayırgülü, sazaketu, Hasan Hüseyin çiçeği gibi yöresel isimlerle de anılmaktadır (Güner ve ark. 2012).



Şekil 2.2. Doğal yayılış alanındaki *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin genel görünümü ile çiçekli ve yapraklı dalların yakından görünüşü

2.6.1. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanları

Bitkinin, Orta ve Güney Anadolu'da nadir olmakla birlikte Türkiye genelinde geniş yayılışı vardır (Şekil 2.3). Dünyada ise Avrupa ve Asya'da, Kuzeydoğu ve Güney Afrika'da ve Kuzey Amerika'da yayılış göstermektedir (Davis 1972). *E. hirsutum* bitkisinin ülkemizdeki yayılış alanları aşağıda verilmiştir (Davis 1972).

A1(E) Tekirdağ: Saray, *A. Baytop* 13154!

A2(E) İstanbul: Küçük Çekmece'den Bakırköy'e, 6 ix 1938, *B. Post!*

A2(A) İstanbul: Hankier-iskelessi, Beykoz, 29 vi 1895, *Azn.l*

A3 Bolu: Abant G., 9 vii 1940, *B. Post!*

A4 Kastamonu: Küre'den İnebolu'ya, 900 m, *D. 38738!*

A6 Samsun: Samsun, *T. Baytop* 14213!

A7 Trabzon: Trabzon, *Görz* 905!

A8 Gümüşhane: Kovans (Kale)'dan Bayburt'a, 1650 m, *D. 31944!*

A9 Kars: Kars, *Tong* 377!

B1 İzmir: İzmir, *Tanay!*

B2 Kütahya: Simav'dan Dağardı'ya, 860 m, *E. Anglia Exped. D11!*

B3 Afyon: Sultandağı, 2 ix 1958, *Yalt.!*

B4 Ankara: Kübrüş, gorge, nr. Kayaş, *D. 13139!*

B7 Tunceli: Pülümür'ün üstü, 1900 m, *D. 30975!*

B8 Erzurum: Palandöken Dağı, Çat ile Erzurum arası 32 km, 2150 m, *D. 47366!*

B9 Bitlis: Tatvan ile Gevaş arası 15 km, 1760 m, *Tong* 243!

C2 Antalya: Elmalı, *Bourgeau* 162!

C3 Antalya: Finike, s.l., *Schultz* 156!

C4 Konya: Karaca Da., *Andrasovszky* 529.

C5 Niğde: Bereketli Maden, 1550 m, *Ellenberg* 28.

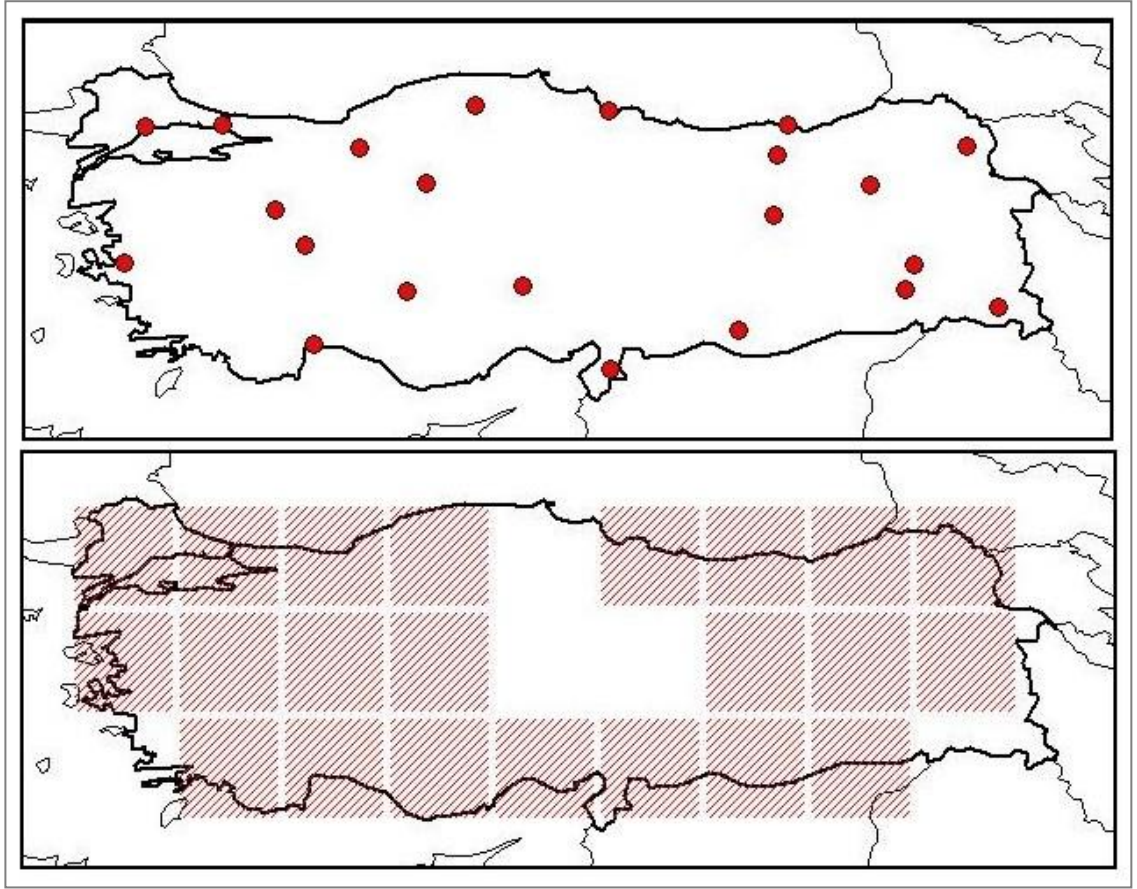
C6 Hatay: Kusliji Da., 1500-2000 m, *Haradj.* 2669!

C7 Urfa: Titriş, Siverek, *Sint.* 1888:1475!

C8 Siirt: Siirt'den Cizre'ye, *Hand.-Mazz.*, obs.

C9 Hakkari: Koçanis, 2300 m, *D. 24306!*

C10 Hakkari: Yüksekova'dan 12 km, 1950 m, *Duncan & Tait* 153!



Şekil 2.3. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin illere (üstte) ve kareleme sistemine (altta) göre yayılış alanları (Anonim 2020b)

2.6.2. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin fitokimyasal bileşimi

E. hirsutum bitkisi dâhil olmak üzere *Epilobium* genusuna ait tüm bitkiler zengin bir fitokimyasal bileşimine sahiptir (Granica ve ark. 2014). *E. hirsutum* bitkisinde bulunan sekonder metabolitler Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitler

Sekonder Metabolitler	Bitki Kısım	Kaynak
Flavonoitler		
Kemferol-3- <i>O</i> -arabinozit	Tüm bitki	Ducrey ve ark. 1995, Barakat ve ark. 1997
Kemferol-3- <i>O</i> -glukuronit	Tüm bitki	Hiermann 1995, Barakat ve ark. 1997 Hiermann 1983, Ducrey ve ark. 1995,
Kemferol-3- <i>O</i> -ramnozit	Tüm bitki ve kök	Hiermann 1995, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
Kersetin	Tüm bitki, yaprak ve çiçek	Hiermann 1983, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Hevesi Toth ve ark. 2006
Kersetin-3- <i>O</i> -arabinozit	Tüm bitki, yaprak, çiçek ve kök	Averett ve ark. 1978, Hiermann 1983, Ducrey ve ark. 1995, Hiermann 1995, Barakat ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
Kersetin-3- <i>O</i> -galaktozit	Tüm bitki, yaprak ve çiçek	Hiermann 1983, Ducrey ve ark. 1995, Hiermann 1995, Barakat ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
Kersetin-3- <i>O</i> -glukozit	Tüm bitki, yaprak ve çiçek	Averett ve ark. 1978, Hiermann 1983, Stolarczyk ve ark. 2013a
Kersetin-3- <i>O</i> -glukuronit	Tüm bitki, yaprak ve çiçek	Hiermann 1983, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Kersetin-3- <i>O</i> -(6"-galloil)-galaktozit	Tüm bitki	Stolarczyk ve ark. 2013a
Kersetin-3- <i>O</i> -ramnozit	Tüm bitki, yaprak, çiçek ve kök	Averett ve ark. 1978, Hiermann 1983, Slacanin ve ark. 1991, Ducrey ve ark. 1995, Hiermann 1995, Nawwar ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
Mirisetin	Tüm bitki, yaprak ve çiçek	Hiermann 1983, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Mirisetin-3- <i>O</i> -arabinozit	Tüm bitki ve yaprak	Averett ve ark. 1978, Barakat ve ark. 1997, Ducrey ve ark. 1995, Hiermann 1995, Stolarczyk ve ark. 2013a
Mirisetin-3- <i>O</i> -galaktozit	Tüm bitki	Hiermann 1995, Barakat ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
Mirisetin-3- <i>O</i> -glukozit	Tüm bitki ve yaprak	Averett ve ark. 1978, Ducrey ve ark. 1995, Hiermann 1995, Slacanin ve ark. 1991
Mirisetin-3- <i>O</i> -glukuronit	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997

Çizelge 2.1. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitler (devam)

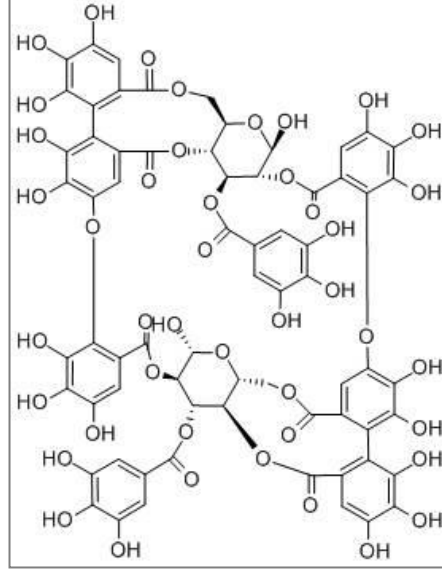
Sekonder Metabolitler	Bitki Kısım	Kaynak
Mirisetin-3- <i>O</i> -ramnozid	Tüm bitki, yaprak ve çiçek	Averett ve ark. 1978, Hiermann 1983, Slacanin ve ark. 1991, Ducrey ve ark. 1995, Hiermann 1995, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Hevesi Toth ve ark. 2006, Stolarczyk ve ark. 2013a
Fenolik asitler ve türevleri		
1'-monodekarboksi- valoneik asit dilakton	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997
2- <i>O</i> -galloil-3- <i>O</i> -valeneoil dilakton-(α/β)- ⁴ C ₁ - glukopiranoz	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997
Ellajik asit	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Hevesi Toth ve ark. 2006, Stolarczyk ve ark. 2013a
Gallik asit	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
İzovaloneik asit	Tüm bitki	Rakhmadieva ve ark. 1979
Metil gallat	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
<i>p</i> -Kumarik asit	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
<i>p</i> -Metoksigallik asit	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Protokateşik asit	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Valoneik asit dilakton	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Valoneik asit dilakton dioksin	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997
Valoneik asitamid dilakton (epilobamid A)	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Tanenler ve ilişkili bileşikler		
1,6-di- <i>O</i> -galloilglukoz	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
1,2,6-tri- <i>O</i> -galloilglukoz	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a
1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> - galloilglukoz	Tüm bitki	Stolarczyk ve ark. 2013a
2,3-di- <i>O</i> -galloilglukoz	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997

Çizelge 2.1. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitler (devam)

Sekonder Metabolitler	Bitki Kısım	Kaynak
6- <i>O</i> -galloilglukoz	Tüm bitki	Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997
Unotein B	Tüm bitki	Lesuisse ve ark. 1996, Ducrey ve ark. 1997, Hevesi Toth ve ark. 2009, Schepetkin ve ark. 2009, Granica ve ark. 2012
Diğer bileşikler		
α -Linolenik asit	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
α -Tokoferol	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
γ -Tokoferol	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
δ -Tokoferol	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
Linoleik asit	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
Oleik asit	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
Palmitik asit	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
Serin	Tüm bitki	Bejenaru ve ark. 2009
Stearik asit	Tohum	Velasco ve Goffman 1999
Treonin	Tüm bitki	Bejenaru ve ark. 2009

Flavonoitler, Onagraceae familyasındaki tüm türler için kemotaksonomik öneme sahiptir (Howard ve Mabry 1972, Averett ve ark. 1978, Averett ve ark. 1979, Averett ve Raven 1984, Hevesi Toth ve ark. 2006, Hevesi Toth ve ark. 2009). Bir flavonoit bileşiği olan kemferol-3-*O*-glukuronit bileşiğinin *Epilobium* genusunda yalnızca *E. hirsutum* ve *Epilobium angustifolium* L. türlerinde bulunduğu bildirilmiştir (Hiermann 1995). Flavonoitler dışında, fenolik asitler de *E. hirsutum*'da ve diğer türlerde en çok bulunan bileşiklerdir (Granica ve ark. 2014). Ellajik asit, *E. hirsutum* ile birlikte toplam 5 *Epilobium* türünde var olan önemli bir fenolik bileşiktir (Slacanin ve ark. 1991, Ducrey ve ark. 1995, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Kiss ve ark. 2004, Hevesi Toth ve ark. 2006, Shikov ve ark. 2006, Stolarczyk ve ark. 2013a). *Epilobium* genusu için ayırt edici bir bileşik olan epilobamid A ise yalnızca *E. hirsutum* bitkisinde tespit edilmiştir (Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997). *E. hirsutum* bitkisinde ve diğer *Epilobium* türlerinde en yaygın olarak bulunan ellajitanen bileşiği, unotein B'dir (Lesuisse ve ark. 1996, Ducrey ve ark. 1997, Hevesi Toth ve ark. 2009, Schepetkin ve ark. 2009, Granica ve ark. 2012) (Şekil 2.4). Ayrıca, unotein B bileşiği Onagraceae familyasındaki diğer cinsler için de karakteristik bir önem taşımaktadır (Granica ve ark. 2012). Bitki ekstrelerindeki unotein B oranı %2-14'tür (Ducrey ve ark. 1997, Granica ve ark. 2012). Bu bileşiğin *Epilobium* türlerinin biyolojik aktivitesine katkı sağladığı

ifade edilmiştir (Lesuisse ve ark. 1996, Kiss ve ark. 2006a, Schepetkin ve ark. 2009, Kiss ve ark. 2011, Ramstead ve ark. 2012). *E. hirsutum* bitkisi, ellajitanenlerin yanı sıra 8 farklı galloil bileşiği ile zengin bir gallotanen kaynağıdır (Haddock ve ark. 1982, Barakat ve ark. 1997, Nawwar ve ark. 1997, Stolarczyk ve ark. 2013a).



Şekil 2.4. Unotein B'nin kimyasal yapısı (Okuyama ve ark. 2013)

2.6.3. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin geleneksel halk tıbbında kullanımı

E. hirsutum bitkisi, önemli biyolojik etkileri sebebiyle halk tıbbında uzun süredir kullanılan etnobotanik öneme sahip bir bitkidir. Bitkinin, Mısır ve Avrupa halk tıbbında enflamasyon, prostat adenomları ve prostat tümörleri tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Hiermann 1983, Hostettmann 1995). Ayrıca, Amerika yerlileri rektal kanamaları önlemek için, Çin halkı ise menstrüel düzensizlikleri tedavi etmek için *E. hirsutum* bitkisinden yararlanmışlardır (Gruenwald 1998). Bitkinin yaprakları ve köklerinden hazırlanan ilaç, Anadolu halkı tarafından ateş düşürmede, ayrıca kabızlığa ve prostat hastalıklarına karşı kullanılmıştır (Tita ve ark. 2001, Everest ve Öztürk 2005). Geçmişte, bitkiden hazırlanan infüzyonlar, dâhili olarak, iyi huylu prostat büyümesi (Benign Prostat Hiperplazisi, BPH) ve BPH kaynaklı miktürisyon sorunlarında, ayrıca prostat iltihabı (prostatit) ve üretra enflamasyonu gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmış ve günümüzde de kullanılmaya devam etmektedir. Üstelik; bitkinin, ağız mukozasında görülen lezyonların ve gastrointestinal bozuklukların giderilmesinde ve

antienflamatuvar ve ödem önleyici olarak dâhili kullanımı olduğundan da bahsedilmiştir (Hiermann ve ark. 1986, Gruenwald ve ark. 2000). Dâhili kullanımlarına ilave olarak, bitkiden elde edilen su ekstresinin, harici olarak yara iyileştirici özelliğinin bulunduğu belirtilmiştir (Pogrel ve ark. 1993, Gruenward 2000).

2.6.4. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin biyolojik aktiviteleri

E. hirsutum ekstreleri, dikkat çekici farmakolojik etkilere sahiptir ve literatürde biyolojik aktivitelerini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda *E. hirsutum* bitki ekstresinin; antikanser (Voynova ve ark. 1991, Stolarczyk ve ark. 2013a, Stolarczyk ve ark. 2013b), antioksidan (Kiss ve ark. 2011, Jamous ve ark. 2015, Karakurt ve ark. 2016, Sheikh ve ark. 2017), analjezik, antinosiseptif (Pourmorad ve ark. 2007), antienflamatuvar (Kiss ve ark. 2011), antimikrobiyal (Battinelli ve ark. 2001, Kunduhoglu ve ark. 2011, Pirvu ve ark. 2015, Pirvu ve ark. 2016), antifungal (Battinelli ve ark. 2001), antiviral (İvancheva ve ark. 1992), antikandidal, antihelmintik (Jamous ve ark. 2017) ve antidiyaretik (Vitali ve ark. 2006) etkileri bildirilmiştir.

E. hirsutum bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan alkol ekstresinin fare modelleri üzerindeki antitümör etkinliğinin test edildiği bir çalışmada, lökozis tümörü P-388 için 1 mg/kg'da, Ehrlich assitik tümörü için 3 mg/kg'da maksimum inhibitör etki elde edilmiştir. *E. hirsutum* ekstresinin bu dozlarında, fare yaşam süresinin, sırasıyla, %156 ve %158 oranda uzadığı belirlenmiştir (Voynova ve ark. 1991).

Literatürde, *E. hirsutum* bitkisinin antikanser etkilerini araştıran çok az sayıda çalışma vardır. Stolarczyk ve ark. (2013a) tarafından yürütülen bir çalışmada; çiçeklenme döneminde doğal yayılış toplanan *E. hirsutum* bitkisinin ve ayrıca, *E. angustifolium* ve *E. parviflorum* Schreb. bitkilerinin toprak üstü kısımlarından 40 °C'de ve 1 saat boyunca ultrasonik su banyosu kullanılarak su ekstreleri (1:10) hazırlanmıştır. Daha sonra, elde edilen ekstralar unotein B için standardize edilmiştir ve unotein B konsantrasyonları; *E. hirsutum* ekstresi için %23,5± 0,3 (235 mg/g), *E. angustifolium* ekstresi için %15,7± 0,1 (157 mg/g), *E. parviflorum* ekstresi için %22,7± 0,4 (227 mg/g) olarak hesaplanmıştır. Tüm ekstraların bileşimi, yüksek-performanslı sıvı kromatografisi-diyot array dedektörü-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (high-

performance liquid chromatography-diode-array detector-mass spectrometry/mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS) yöntemiyle belirlenmiştir. Ekstrelerin farklı dozlarının (20, 50 ve 70 µg/ml), 72 saat sonunda LNCaP hormon bağımlı prostat kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri, Hoechst solüsyonu kullanılarak deoksiribonükleik asit (DNA) miktarının ölçülmesi prensibine dayanan hücre proliferasyon testiyle belirlenmiştir. Ayrıca, propidyum iyodür ve Anneksin V- floresein izotiyosiyanat (fluorescein isothiocyanate, FITC) boyama yapılarak flow sitometri yöntemi aracılığıyla LNCaP hücrelerindeki apoptoz incelenmiştir. Bunlara ilave olarak, ticari kitler kullanılarak hücrelerdeki mitokondriyel potansiyel ve kaspaz-3 (caspase-3) aktivitesi analiz edilmiştir. Bu çalışmada, tüm ekstrelerin hidrolize tanenler, fenolik asitler ve flavonollar bakımından zengin olduğu, dominant bileşiğin unotein B olduğu saptanmıştır. Hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre, *E. hirsutum* ekstresinin LNCaP hücrelerindeki IC₅₀ (yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu, half maximal inhibitory concentration) değeri 37,3 µg/ml olarak belirlenmiştir. Öte yandan, *E. angustifolium* ve *E. parviflorum* ekstrelerinin IC₅₀ değerleri ise, sırasıyla 44,6 µg/ml ve 32,2 µg/ml olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, *E. hirsutum* ekstresinin, diğer iki bitki ekstresine kıyasla, LNCaP hücrelerinde daha fazla geç apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan tüm ekstreler arasında, mitokondriyel membran potansiyelini değiştirme yeteneği ve kaspaz-3 aktivitesi en yüksek olan ekstrenin *E. hirsutum* ekstresi olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmayla, *E. hirsutum* ekstresinin ve diğer bitki ekstrelerinin antikanser aktivitelerinden unotein B'nin sorumlu olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Stolarczyk ve ark. (2013b), aynı yıl yaptıkları başka bir çalışmada; *E. hirsutum*, *E. angustifolium* ve *E. parviflorum* ekstrelerinin ve bu ekstrelerin temel bileşenlerinin, LNCaP hormon bağımlı prostat kanseri hücre proliferasyonları, PSA (prostat-spesifik antijen) sekresyonu ve arjinaz aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu amaçla; çiçeklenme döneminde doğal yayılış ortamlarından toplanan *E. hirsutum*, *E. angustifolium* ve *E. parviflorum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından 40 °C'de ve 1 saat boyunca ultrasonik su banyosu kullanılarak su ekstreleri (1:10) hazırlanmıştır. Su ekstrelerinin bir kısmı ise etil asetat (1:1) ile ekstre edilmiştir; ayrıca, unotein B adlı bileşik de izole edilmiştir. Su ekstrelerindeki toplam polifenol içeriği, Folin-Ciocalteu

reaktifi kullanılarak; toplam flavonoit içeriği alüminyum klorür reaktifi kullanılarak; unotein B içeriği ise HPLC-DAD-MS yöntemiyle tespit edilmiştir. Ekstrelerin farklı dozlarının (20, 50 ve 70 µg/ml), 72 saat sonunda LNCaP hormon bağımlı prostat kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri, Hoechst solüsyonu kullanılarak DNA miktarının ölçülmesi prensibine dayanan hücre proliferasyon testiyle belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu çalışmada PSA sekresyonu ve arjinaz aktivitesi belirlemenin yanında ellajitanen metabolitlerinin (ürolitin A, B ve C) oluşumunu değerlendirmiştir. Üstelik; izole edilen unotein B, mirisetin-3-O-ramnozid, kersetin-3-O-glukuronit bileşikleri ve ürolitin A, B, C metabolitleri ile pozitif kontrol olarak kullanılan flutamit ilacının antiproliferatif etkileri de incelenmiştir. Fitokimyasal sonuçlar, su ekstrelerindeki dominant bileşiğin unotein B olduğunu, ancak etil asetat ekstrelerinin unotein B bileşiğinden yoksun olduğunu göstermiştir. En yüksek unotein B içeriği, %23,5± 0,3 ile *E. hirsutum* su ekstresinde belirlenmiştir. İlaveten; su ekstrelerinin polifenol içeriklerinin yüksek ancak flavonoit içeriklerinin zayıf olduğu saptanmıştır. Antikanser etkisi taranan tüm ekstreler arasında, su ekstrelerinin etil asetat ekstrelerinden daha güçlü aktivite sergilediği görülmüştür. Su ekstrelerinin LNCaP hücrelerindeki IC₅₀ değerleri; *E. hirsutum* ekstresi için 37,3 µg/ml, *E. angustifolium* ekstresi için 44,6 µg/ml ve *E. parviflorum* ekstresi için 32,2 µg/ml olarak elde edilmiştir. Test edilen bileşikler (unotein B, mirisetin-3-O-ramnozid, kersetin-3-O-glukuronid, ürolitin A, B, C ve flutamit) arasında en güçlü sitotoksik etkiyi unotein B bileşiği (IC₅₀ dozu: 7,8 µg/ml) göstermiştir. Çalışmada, Ürolitinler arasından, sadece Ürolitin C için IC₅₀ dozu (35,2 µM) belirlenirken, flutamit'in IC₅₀ dozu 52,9 µM olarak tespit edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak; ellajitanen bakımından zengin *Epilobium* ekstrelerinin insan bağırsak mikrobiyotasında metabolize edilmesi sonucu Ürolitin (A, B ve C) metabolitlerinin oluşumu, en yüksek unotein B içeriğine sahip *E. hirsutum* su ekstresinde saptanmıştır. PSA sekresyonunda en güçlü azalmaya neden test bileşiğinin unotein B olduğu, unotein B'den sonra en iyi etkiyi Ürolitin C'nin gösterdiği gözlenmiştir. PSA sekresyonu için elde edilen bu sonucun, arjinaz aktivitesinde de geçerli olduğu görülmüştür. Daha önceki çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da *E. hirsutum* ekstresinin antikanser aktivitesine unotein B bileşiğinin katkı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.

Yukarıda özetlenen *in vivo/in vitro* çalışmalarda görüldüğü üzere, *E. hirsutum* ve *Epilobium* cinsine ait diğer türlerde, polar ekstrelerin en temel bileşiği unotein B'dir (Granica ve ark. 2014). Ekstrelerin sitotoksik etkileri ile unotein B bileşiğinin konsantrasyonu arasında güçlü bir bağlantı olduğu açıkça belirtilebilir (Vitalone ve ark. 2003a, Schepetkin ve ark. 2009, Kiss ve ark. 2011, Stolarczyk ve ark. 2013a). Bu bağlamda, unotein B bileşiğinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili literatürde var olan araştırma bulgularının sunulmasına ihtiyaç duyulmuştur.

2.6.5. Unotein B'nin biyolojik aktiviteleri

Ellajitanen yapıda bir bileşik olan unotein B'nin, geleneksel Çin tıbbında antipiretik ve antienflamatuvar ilaç olarak yaygın kullanımının bulunduğu rapor edilmiştir (Okuyama ve ark. 2013). Literatürde, unotein B'nin antikanser olarak önemli aktivite göstermesine ilişkin çalışmalar bildirilmiştir. Bu bileşiğin; insan oral epidermoid (KB), servikal (HeLa), prostat karsinoma (DU 145), hepatoselüler karsinoma (Hep-3B) ve promiyelositik lökemiya (HL-60) hücrelerini kapsayan bir dizi hücre hattında büyüme baskılayıcı etkiler gösterdiği, buna karşın malign olmayan WISH hücrelerinde daha zayıf sitotoksik etki sergilediği belirlenmiştir (Wang ve ark. 1999). Vitalone ve ark. (2003a) tarafından yürütülen farklı bir çalışmada, unotein B'nin DNA sentezini baskılayarak önemli bir sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Unotein B'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; 2, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarda, unotein B'nin PZ-HPV-7 transforme epitelyal prostat hücrelerinin ve LNCaP androjen bağımlı prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Piwowarski ve ark. 2017). Son yapılan bir çalışmada ise, ticari unotein B'nin A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattına karşı sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. 15, 30 ve 45 μM dozlarındaki unotein B ile 12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saatlik tedaviyi takiben, A549 hücre canlılıklarının doza ve zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiş olup IC_{50} değeri $25,49 \pm 2,11 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, aneksin-V-FITC/Propidyum iyodür boyama kullanılarak flow sitometri yöntemiyle apoptotik etki değerlendirilmiştir ve unotein B'nin doz artışına bağlı olarak apoptotik hücre sayısında bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Sözü edilen çalışmada, ek olarak, antiapoptotik Bcl-2 proteinin ekspresyonunda unotein B tedavisi sonrası önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir (Pei

ve ark. 2019). Unotein B ile ilgili yürütülen *in vivo* çalışmalarda; unotein B'nin, farenin peritonel kavitesine enjekte edilmesinden sonra, yaşam süresinde artış gözlemlendiği ve bileşiğin makrofajları aktive ederek antitümör aktivite sergilediği bulunmuştur (Miyamoto ve ark. 1987, Miyamoto ve ark. 1992, Miyamoto ve ark. 1993a, Miyamoto ve ark. 1993b, Wang ve ark. 1999, Schpetkin ve ark. 2009). Unotein B'nin antitümör etkinliği altında yatan mekanizmanın; poli-(ADP-riboz) glikohidrolaz (Aoki ve ark. 1995, Maruta ve ark. 2007), 5- α -redüktaz ve aromatazın baskılanması (Ducrey ve ark. 1997) ve prostat kanseri hücrelerinde nötral endopeptidazın indüklenmesi (Kiss ve ark. 2006b) olduğu ileri sürülmektedir. Antikanser aktivitesinin yanı sıra, unotein B'nin antioksidan, antienflamatuvar, antifungal ve antiviral etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Granica ve ark. 2014).

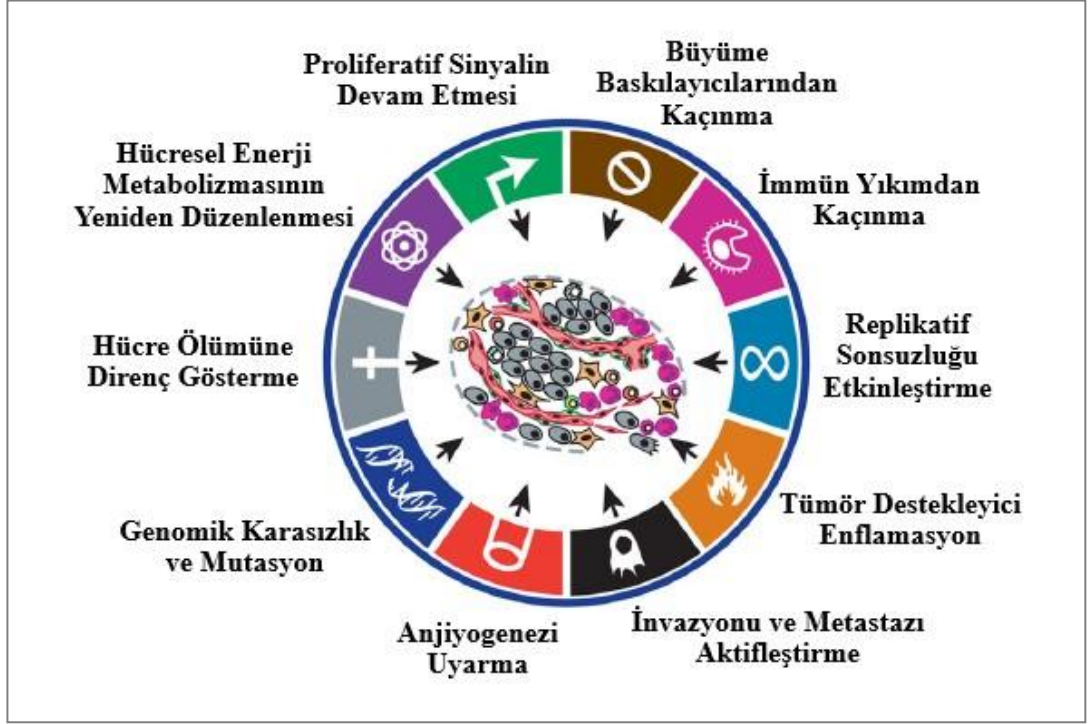
2.6.6. *Epilobium hirsutum* L. ekstrelerinin toksisitesi ve güvenliği

E. hirsutum bitkisi dâhil olmak üzere, *Epilobium* cinsine ait türlerin ekstrelerinin toksisitesi ile ilgili gerçekleştirilmiş önemli klinik öncesi çalışmaları bulunmaktadır ve bu çalışma bulguları doğrultusunda, *Epilobium* türlerinin yan etkilerinin bulunmadığı ve toksik olmadıkları ifade edilebilir (Granica ve ark. 2014, Vitalone ve Allkanjari 2018). Pourmorad ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; *E. hirsutum* ekstresinin, 1 hafta boyunca fare yaşamı üzerindeki etkisi incelenmiştir, çalışma sonunda, intraperitoneal uygulama sonunda LC₅₀ değerinin 1,5 mg/kg olduğu hesaplanmış ve ekstrenin farelerde herhangi bir toksisiteye neden olmadığı belirlenmiştir. 2010 yılında yürütülen bir çalışmada, *E. hirsutum* ve diğer bitkilerin (*E. angustifolium* ve *E. parviflorum*) hidroalkolik ekstreleri, 1,5 ml hacimde 10 gün süreyle Wistar ratlarına oral olarak uygulanmış ve daha sonra vital organlardaki sitotoksikite incelenmiştir. Ratların beyin, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen, karaciğer, böbrekler, dalak organlarında ve timüs düzeylerinde hiçbir ekstrenin sitotoksik olmadığı saptanmıştır. Ayrıca, yalnızca *E. hirsutum* ve *E. angustifolium* ekstrelerinin ratların karaciğerindeki ve böbreklerindeki oksiredüksiyon enzimlerinde orta ölçüde bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Roman ve ark. 2010). Başka bir *in vivo* araştırmada, 9 gün boyunca intraperitoneal olarak *E. hirsutum* su ekstresi (37,5 mg/kg) ve ellajik asit (20 mg/kg) uygulanan erkek Wistar ratlarında ilaç metabolize eden cytochrome P450 enzimlerinin (hepatik CYP2B, CYP2C, CYP2D ve CYP3A) ekspresyon seviyeleri analiz edilmiş, uygulama sonucu bu

enzimlerin ekspresyonlarının azaldığı, ilaç temizleme aktivitesinin baskılandığı ve nihai olarak ilaç toksisitesinin gerçekleştiği bulunmuştur (Celik ve ark. 2016). Bu çalışmaya benzer olarak, Karakurt ve ark. (2013)'nin aynı deneysel çalışmaları yürüterek yaptığı bir çalışmada, CYP2E1 ve CYP1A1 ekspresyonlarında azalış tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda, *E. hirsutum* ekstrelerinin her ne kadar güvenli olduğu gösterilse de klinik bulgular elde edilinceye kadar *E. hirsutum* bitkisinin tüketilmesi sonucu oluşacak muhtemel ilaç etkileşimlerine karşı dikkatli olmak gerekmektedir.

2.7. Kanser

Basit olarak; kanser, hücrelerin kontrolsüz ve anormal derecede büyüme özelliği kazanması ile gelişen bir hastalıktır (Clark 1991). Kanser gelişimi, bazı hücrelerin mutasyona uğraması ile herhangi bir organda veya vücut yapısında başlamaktadır. Hücrede aşamalı olarak meydana gelen mutasyonlar, onkogen ve tümör baskılayıcı gen ekspresyonlarında önemli değişimlere neden olmaktadır. Bu değişimler, yüzlerce genin ekspresyonunu etkileyerek bir dizi genetik hasarın birikmesine yol açmaktadır (McCormick 1999, Roy ve Saikia 2016). Gen düzeyindeki değişimlerin yanında, çevresel faktörler de kanser gelişimi sürecinde etkili olmaktadır. Sağlıklı hücrelerin genetik, epigenetik ve hücresel düzeyde değişimlere uğradıkları ve kademeli ilerleyen mekanizma sonunda bir doku kitlesi (tümör) oluşturdukları süreç, karsinogenez (onkogenez, tümörigenez) olarak adlandırılmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000). Buna karşılık, her tümör kanser özelliği taşımamaktadır. Geliştiği bölgede veya organda sınırlı, lokalize kalan ve vücudun diğer kısımlarına yayılma özelliği sergilemeyen tümörler, benign (iyi huylu) tümörlerdir. Aksine, sağlıklı komşu dokuları istila etme (invazyon) ve kan/lenf yoluyla vücudun farklı bölgesindeki organlara yayılma (metastaz) özellikleri gösteren tümörler malign tümörler olup kanser olarak tanımlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000). Hanahan ve Weinberg adlı iki araştırmacı, karsinogenez sürecinde kanser hücrelerinin belirli yetenekler kazandıklarını ifade etmişlerdir (Hanahan ve Weinberg 2011). Süreç boyunca, kanser hücrelerinin çoğunluğunun sahip olduğu bu karakteristik özellikler, Şekil 2.5'de özetlenmiştir.



Şekil 2.5. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011’den değiştirilerek alınmıştır)

Son yıllarda, kanser tanı ve tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Günümüzde; kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi standart yöntemlerin yanı sıra immünoterapi, hormon tedavisi, gen tedavisi, kök hücre tedavisi, kriyocerrahi, fotodinamik tedavi, kanser aşılı ve hedefe yönelik tedavi gibi güncel yöntemler de kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kanser hastalığı erken evrede saptandığı takdirde bu tedavi yöntemlerinden daha başarılı sonuçlar alınmaktadır (Baykara 2016, Roy ve Saikia 2016). Bu sebeple, daha etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

2.8. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde en yaygın görülen kanser türlerinden biridir (Kral ve ark. 2011). Prostat kanserinin görülme sıklığı, 70 yaşından sonra hızla artış göstermekle birlikte 50 yaş üzerindeki tüm erkeklerin prostat kanseri riski taşıdığı bilinmektedir. İnsidans oranındaki artışta, nüfusa bağlı yaşlanmanın ve gelişmiş teşhis ve tarama yöntemlerinin kısmi payı olduğu da ifade edilmektedir (Schulz ve ark. 2003).

Yetişkin bir erkekte, normal yapıdaki prostat, glandüler (salgı bezi) epitelyal ve fibromüsküler stroma bölümlerinden oluşan tübulo-alveolar bir bezdir (Schulz ve ark. 2003). McNeal (1981), prostat bezinde başlayan karsinogenez sürecinin yerini tanımlayabilmek için, prostat bölgesel anatomisi kavramını geliştirmiştir (McNeal 1981). Bu yaklaşıma göre, prostat bezinin %95'ini oluşturan glandüler kısmı, geniş periferik bölge ile küçük bir merkezi bölgeden oluşmaktadır. Prostat bezinin %5'lik kısmını ise, geçiş bölgesi ve peri-üretral bezler oluşturmaktadır. Prostat kanserlerinin yaklaşık olarak %60-70'i periferik bölgede, %10-20'si geçiş bölgesinde oluşmaktadır. Prostat kanserlerinin sadece %5-10'i merkezi bölgeden köken almaktadır. Prostat kanserleri, glandüler epitelyal hücrelerinden geliştikleri için adenokarsinom tümör sınıfında yer almaktadır. BPH ise, çoğunlukla peri-üretral stromadan ve geçiş bölgesindeki bezlerden gelişmektedir (McNeal 1981, Schulz ve ark. 2003). Prostat bezinin normal gelişimine, proliferasyonuna ve farklılaşmasına katkı sağlayan androjenler, prostat kanseri gelişiminde de önemli rol oynamaktadır (Abate-Shen ve Shen 2000, 2002). Androjenlerin sinyal yollarındaki kilit molekülü ise hücre içi androjen reseptörleri (androjen receptor, AR)'dir. Aktif haldeki AR'lerinin, PSA enziminin ve diğer faktörlerin aktifleştirilmesinden sorumludur (Alimirah ve ark. 2006). Prostat bezindeki epitelyal hücrelerden salgılanan PSA'nın, sağlıklı erkeklerin serumunda düşük seviyede olduğu, bunu aksine prostat kanserinde ve diğer prostat hastalıklarında serumdaki seviyesinin artış sergilediği gösterilmiştir (Wang ve ark. 1979, Papsidero ve ark. 1980, Catalona ve ark. 1994). PSA enziminin, fertilizasyonda görevli olabileceği tahmin edilmektedir (Lilja ve ark. 1987, McGee ve Herr 1988, Yencilek ve ark. 2018).

Prostat kanseri, multifaktöriyel bir hastalık olduğu için etiyojisi halen tam olarak çözülebilmüş değildir (Schulz ve ark. 2003, Kral ve ark. 2011). Hastalığın gelişimine çevresel faktörlerin etkili olduğu sanılmasına karşın, genetik yatkınlığın daha baskın olduğu ifade edilmektedir. Beyaz ve Afrika kökenli Amerikalılar arasında prostat kanserinin görülme sıklığı ve ölüm oranları bakımından ciddi farklılıklar belirlenmiştir (Kral ve ark. 2011). Benzer olarak, Batı ülkelerinde prostat kanserine eğilimin, Asya ülkelerinden en az 10 kata daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Güçlü ailesel yatkınlığın prostat kanserine yakalanma riskini artırabileceğinden bahsedilmektedir (Anonim 2013). Ancak yapılan çalışmalarda, risk faktörü olarak kalıtımın, insidans oranlarındaki farklılıklardan kısmen sorumlu olduğu gösterilmiştir. Kesin olmamakla beraber, beslenme alışkanlıklarındaki olumlu değişimlerin, prostat kanseri riskini azaltabileceği söylenmektedir. Bazı çalışmalarda; günlük ve yüksek yağlı, özellikle hayvansal yağ içeren ürünlerin, işlenmiş kırmızı et tüketiminin prostat kanseri için risk taşıyabileceği ortaya konmuştur. Bunun yerine; vitamin, mineral ve antioksidan içeren besinler tüketmenin prostat kanserine karşı koruyucu etkinlik gösterebileceği düşünülmektedir (Schulz ve ark. 2003). Selenyum mineralinin prostat kanserine karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı yakın zamandaki bir çalışmaya göre; bu mineral bakımından zengin topraklarda yetişen besinler ile beslenen yöre halkında prostat kanserine daha az rastlanırken, selenyum minerali fakir topraklarda yetişen besinleri tüketen kişilerde insidans oranı daha yüksek tespit edilmiştir (Clark ve ark. 1996). Prostat kanseri için risk teşkil eden diğer çevresel faktörler ise; alkol ve sigara tüketimi, obezite, statin ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç tedavisidir (Kral ve ark. 2011).

Prostat kanseri, bazı hastalarda hiçbir belirti göstermeden gizlice ilerlemektedir. Bazı durumlarda ise agresif bir seyir izleyerek seminal veziküllere, mesaneye ve rektuma invaze olmaktadır ve lenf bezlerine, kemiğe, akciğere, karaciğere ve diğer organlara metastaz gerçekleştirmektedir (Schulz ve ark. 2003). Prostat kanserinin teşhisinde, 1980'li yıllarda kullanılmaya başlayan PSA testi önemli bir yer tutmaktadır (Kral ve ark. 2011). Bu test sayesinde, prostat kanseri erken evrelerde saptanmaktadır ve vakit kaybetmeden tedaviye başlanabilmektedir. Ayrıca, dijital rektal inceleme ve biyopsi ile Gleason derecelendirme yöntemlerine de teşhis için sıklıkla başvurulmaktadır. Erken evrede tespit edilen ve metastaz olgusu bulunmayan lokalize prostat kanserinin tedavisi

için en iyi seçenekler, radikal prostatektomi (cerrahi) ve radyasyon tedavisi olmaktadır (Schulz ve ark. 2003). Nüks etmiş ve metastatik özellikteki ileri evre kanserlerin tedavisinde ise, hormonal tedavi yöntemi olarak androjen deprivasyon tedavisi (androjen deprivation therapy, ADT) uygulanabilmektedir. Bu tedavi modelinde, androjenik aktivitenin baskılayarak metastatik hastalığın hafifletilmesi amaçlanmaktadır. ADT’nde en yaygın kullanılan yöntemler, orşitektomi (cerrahi kastrasyon), androjen ablasyon tedavisi, GnRH feedback sinyali ve AR antagonistleridir (Schulz ve ark. 2003, Hacıbekiroğlu ve ark. 2015). Kemoterapi ise prostat kanserinin farklı aşamalarında kullanılmaktadır. Günümüzde, prostat kanseri kemoterapisinde en sık kullanılan ilaçlar; dosetaksel, kabazitaksel, mitoksantron, estramüsin ve paklitaksel’dir (Gilligan ve Kantoff 2002, Anonim 2019c).

Taksol (taxol®) veya yaygın ismiyle paklitaksel (paclitaxel), farklı kanser türlerinin tedavisinde geniş çapta kullanılan ve oldukça etkili kemoterapötik bir ajandır (Suffness 1995). Paklitaksel, Ulusal Kanser Enstitüsü’nün (National Cancer Institute, NCI) 1960-1981 yılları arasında yürüttüğü bitki tarama programı kapsamında, kanser etkinliği test edilen *Taxus brevifolia* (Pasifik porsuk ağacı) bitkisinden keşfedilmiştir. Bitkinin; kabuk, dal, iğneli yapraklar ve meyve kısımlarından hazırlanan ekstraler test edilmiş ve kabuk kısmının sitotoksik olduğu belirlenmiştir. 1967 yılına kadar, bitkinin kabuğundan aktif içeriğin izolasyonu ve tanımlanması yapılmış olup bu bileşik taksol olarak isimlendirilmiştir. 1971 yılında, yapısı açıklanmıştır ve Ulusal Kanser Enstitüsü’nün ilaç geliştirme programında klinik deneylere girmiştir (Weaver 2014). Sadece prostat kanseri tedavisinin yanında; ovaryum, meme, akciğer, mesane, özofagus ve baş-boyun kanserlerinin tedavisinde de paklitakselden faydalanılmaktadır (Rowinsky 1997). Paklitaksel, mikrotübüllere bağlanarak, mikrotübül dinamiklerinin kinetik olarak baskılanmasını (stabilizasyon) sağlar. Bu durum, hücre döngüsünün mitotik fazda durmasına yol açarak paklitaksel kaynaklı sitotoksisite gerçekleşir (Schiff ve Horwitz 1980, Jordan ve ark. 1993, Jordan ve Wilson 1998).

2.9. Hücre Ölüm Yolakları

Apoptoz, nekroptoz (veya nekroz) ve otofaji, hücre içinde programlı olarak ilerleyen ve farklı yollar ile düzenlenen hücre ölüm şekilleridir. Apoptoz ve nekroz, hücre ölümüne neden olurken; otofaji, hücrelerde pro-yaşam ya da pro-ölüm olaylarında rol oynamaktadır (Ouyang ve ark. 2012). Bu hücre ölüm tipleri, gösterdikleri morfolojik değişiklikler sayesinde birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Laubenbacher ve ark. 2009, Hanahan ve Weinberg 2011).

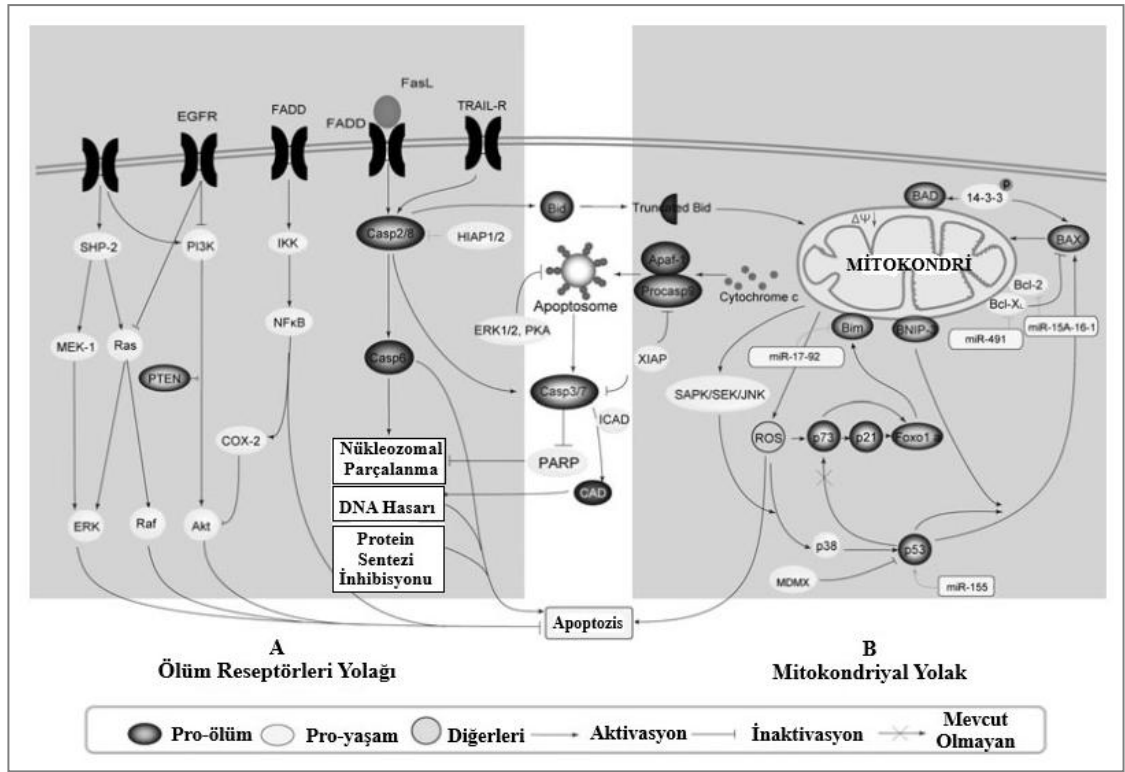
2.9.1. Apoptoz

Apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından canlı dokulardaki hücre kaybından sorumlu olan programlı bir hücre ölüm türü olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark. 1972). Apoptoz, hücrenin kendisi tarafından kontrol edilen fizyolojik bir ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz, hücre hasarı veya stresin yanı sıra normal gelişim ve morfogenez esnasında da gerçekleşmektedir (Nikoletopoulou ve ark. 2013). Vücutta, yaşlanmış ve tamir edilemez DNA hasarı bulunan yaklaşık 1 milyon hücre apoptoz ile ölürken, bu hücrelerin yerine yeni hücreler üretilir. Bu sayede, proliferasyon (mitoz) ve yıkım (apoptoz) olayları dengede tutulmaktadır. Mitoz veya apoptoz lehine bu dengenin bozulması, patogenez gelişimini işaret etmektedir. Kanser ile apoptoz arasında karmaşık bir ilişki olduğu, apoptoz oranının azalmasının kanserleşmeye neden olduğu bildirilmiştir (Ulukaya ve ark. 2011, Ouyang ve ark. 2012). Apoptoz; hücre büzülmesi, nükleer kondenzasyon ve fragmentasyon, dinamik membran blebnelmesi ve komşu hücreler ile ya da hücre dışı matriks ile bağlantı kaybı gibi hücre morfolojik değişimler ile ayırt edilmektedir (Nishida ve ark. 2008). Bunlara ek olarak, apoptoz sürecinde DNA'nın internükleozomal fragmentlere kırılması, fosfotidilserin translokasyonu ve proteoliz ile bir dizi hücre içi substratın yıkımı gibi biyokimyasal farklılıklar da gözlenmektedir (Cohen ve ark. 1994, Martin ve Green 1995). Apoptozu indükleyen iki temel yolak bulunmaktadır: Ekstrinsik (dışsal) ve intrinsik (içsel) yolak (Eum ve Lee 2011).

Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri yolağı olarak da adlandırılmaktadır (Eum ve Lee 2011). Plazma membranında bulunan, tümör nekroz faktör reseptörü (tumour necrosis factor receptor, TNFR) ailesinin üyeleri olan ve ölüm reseptörleri (death receptor, DR) olarak isimlendirilen TNFR-1, Fas (CD95, APO-1), DR3 (TRAMP), DR4 (TRAIL reseptör 1, TRAIL-R1), DR5 (TRAIL reseptör 2, TRAIL-R2), ve DR6 reseptörleri, apoptozun ekstrinsik yolağını başlatmaktadır (Sayers 2011). Bu reseptörlerde, sitoplazmik bölgelerinde apoptoz uyarısının iletimi için gerekli 80 aminoasitten oluşan ölüm domaini (death domain, DD) bulunmaktadır. Hücreye ölüm sinyali geldiğinde, ilgili ligand (tümör nekroz faktör α /tumor necrosis factor α /TNF α), FasL/Fas Ligand, DR3LG/DR3 Ligand ve TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand/TRAIL) ölüm reseptörünü tanıyarak ona bağlanır ve bir ölüm kompleksi oluşur. Aktif hale gelen reseptör-ligand kompleksine, ölüm domaini adaptör proteinleri olan Fas ilişkili ölüm domaini (Fas-associating death domain, FADD) ve TNFR ilişkili ölüm domaini (TNFR-Associating Death Domain, TRADD) ile pro-kaspaz-8 veya pro-kaspaz-10 katılarak ölümü indükleyen sinyal kompleksi (death-inducing signalling complex, DISC) oluşur. Ölüm domainleri, pro-kaspaz-8'i aktive eder, kaspaz-8 ise pro-kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadı (ilerletici kaspazlar; kaspaz-3, 6 ve 7) sürecini başlatır (Kerr ve ark. 1972).

İntrinsik yolak, mitokondriyal yolak olarak da bilinmektedir. Bu yolak, mitokondriyal pro-enzimlerin kontrolü altında apoptoza neden olmaktadır. Bcl-2 ailesi, apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Llambi ve Green 2011). Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad, Bcl-X_S, Bid, Bim ve Hrk) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) üyelerden oluşmaktadır (Engel ve Henshall 2009). Bir hücre ölüm sinyali ile uyarıldığında, pro-apoptotik proteinler defosforilasyon ve kırılma gibi post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek aktive olurlar ve mitokondriye transloke olurlar (Shamas-Din ve ark. 2011). Bu durum, mitokondriyal membranların sitokrom-c için geçirgen hale gelmesine ve sitokrom-c'nin sitozole salınmasına neden olur. Mitokondriden sitokrom-c ile birlikte, Smac (DIABLO/IAP-bağlayıcı mitokondriyal protein), Omi (HtrA2), endonükleaz G (EndoG), apoptoz indükleme faktörü (Apoptosis-inducing factor, AIF) gibi mitokondriyal proteinler de salınır. Böylece, apoptoz süreci başlamış olur.

Sitokrom-c, deoksiadenozin trifosfat (dATP) varlığında sitoplazmik bir protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)'e bağlanır, bu yapıya pro-kaspaz-9'un katılmasıyla apoptozom yapısı oluşur. Apoptozom oluşumu, mitokondriyal apoptozun tipik başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9'u aktive eder (Ouyang ve ark. 2012). Kaspaz-9 ise ekstrinsik yolda olduğu gibi, pro-kaspaz-3'ü aktive ederek ilerletici kaspazlar (kaspaz-3,6 ve 7) ile devam eden kaspaz kaskadını tetikler (Ghobrial ve ark. 2005). Aktif kaspaz-3, kaspazla aktive edilmiş deoksiribonükleaz inhibitörü (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease, ICAD), lamin, vimentin, aktin gibi ölüm substratlarının parçalanması sağlar. ICAD molekülünün, kaspaz-3 tarafından inaktive edilmesi sonucu serbest kalan kaspazla aktive edilmiş deoksiribonükleaz (caspase-activated deoxyribonuclease, CAD) kromatin kondenzasyonuna ve DNA fragmentasyonuna yol açmaktadır. Apoptoz geçiren hücrede; Smac ve Omi proteinleri, apoptoz proteinlerinin inhibitörlerine (inhibitors of apoptosis proteins, IAP) bağlanarak kaspazları aktive eder. EndoG, DNA'nın parçalanmasını sağlarken; AIF, kromozom kondenzasyonuna ve fragmentasyonuna neden olmaktadır (Riedl ve ark. 2007, Li ve Yuan 2008). Tüm bunların sonunda, apoptoz süreci tamamlanmış olur (Şekil 2.6).



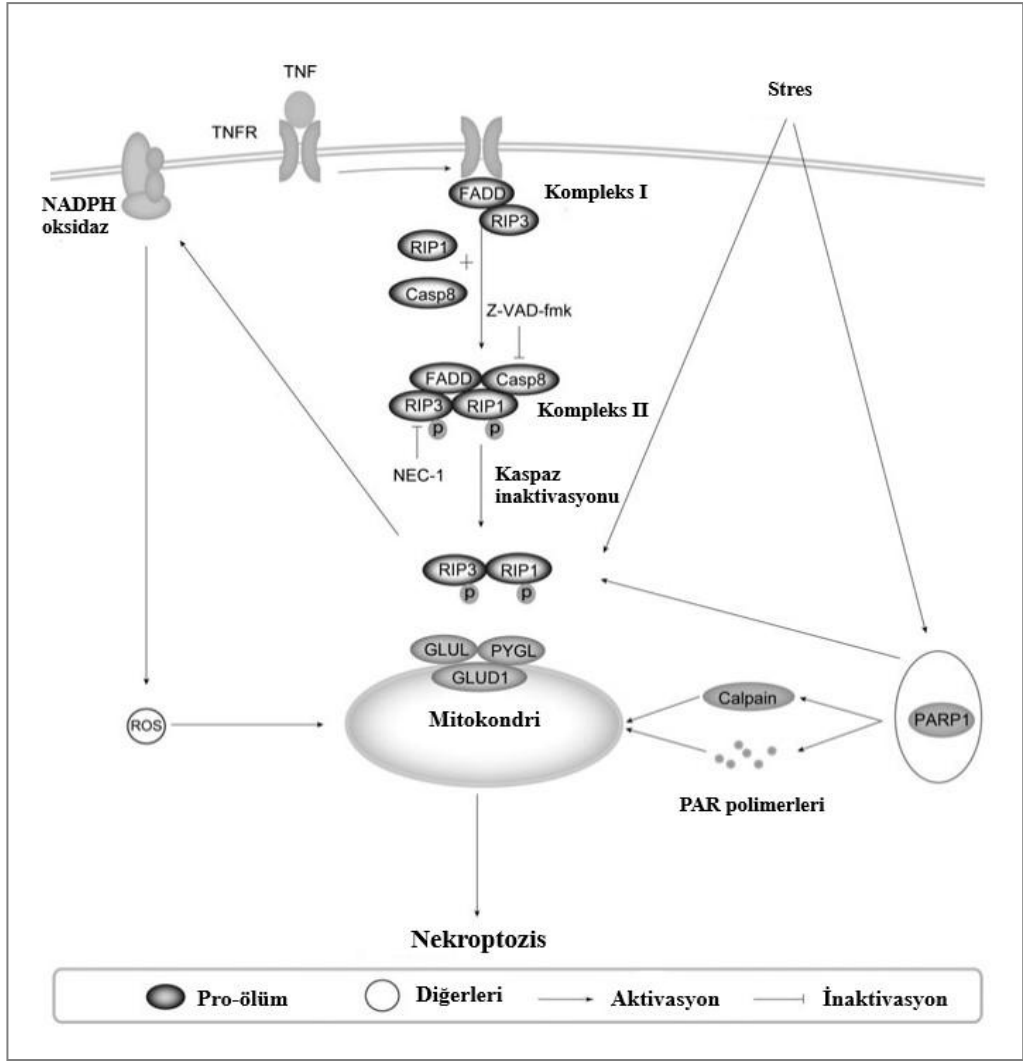
Şekil 2.6. Apoptoz sinyal yolları (Ouyang ve ark. 2012’ndan değiştirilerek alınmıştır)

2.9.2. Programlı nekroz (Nekroptoz)

Nekroz, uzunca bir süre tesadüfi ve kazara gerçekleşen kontrolsüz bir ölüm şekli olarak düşünülmüştür (Ouyang ve ark. 2012). 1980’li yılların sonunda, nekrozun apoptoz ile aynı ölüm sinyalleri aracılığıyla indüklendiği ve alternatif programlı bir hücre ölüm modu olduğu gösterilmiştir (Nikoletopoulou ve ark. 2013). Apoptozu tetikleyen TNFR1, TNFR2, Fas, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 gibi ölüm reseptörlerinin farklı hücrelerde nekroptozu da indükleyebildiği gözlenmiştir (Vercammen ve ark. 1998, Holler ve ark. 2000, Chan ve ark. 2003, Jouan-Lanhuet ve ark. 2012). Bu durum, T hücrelerinde gözlendiği gibi veya düşük adenosin trifosfat (ATP) seviyeleri altında apoptozun baskılandığı durumlarda geçerli olmaktadır (Los ve ark. 2002, Scheller ve ark. 2006, Skulachev 2006). Reseptör ile etkileşen protein (receptor interacting protein ‘RIP’ kinases) kinazlar ve poli(ADP-riboz) polimeraz (poly(ADP-ribose) polymerase, PARP) gibi nekrotik hücre ölümünün temel mediatörleri keşfedildiğinde, nekroz yerine düzenli ve programlı bir ölüm formunu ifade eden ‘nekroptoz’ terimi kullanılmaya başlanmıştır (Ouyang ve ark. 2012, Nikoletopoulou ve ark. 2013). Nekroptoz,

organellerin şişmesi, hücre hacminin artması, plazma membranının bütünlüğünün bozulması ve hücrel içeriklerin kaybı gibi morfolojik değişimler ile karakterize edilen bir hücre ölüm şeklidir (Wu ve ark. 2012).

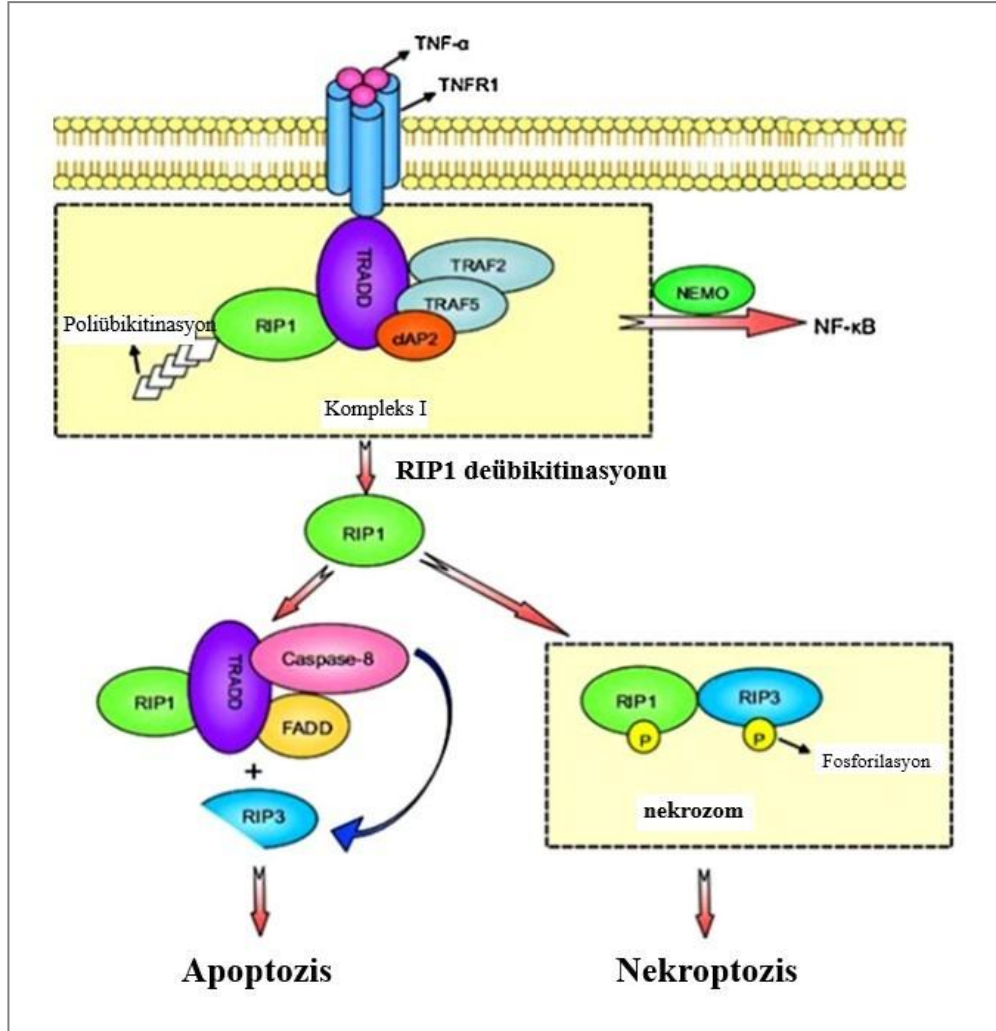
Nekroptoz'un kendine özgü bir sinyal yolağı olmasına karşın, nekroptozun moleküler mekanizmaları halen tam olarak anlaşılamamıştır (Wu ve ark. 2012). RIP kinazlar, PARP1, Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazlar ve kalpainler, nekroptoz sinyal yolağının temel bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Colstein ve Kroemer 2007, Galluzzi ve Kroemer 2008). Nekroptoz süreci, TNF α , TRAIL ve FasL gibi ölüm ligandlarının, kendilerine özgü ölüm reseptörlerine (TNFR1, TNFR2 ve Fas) bağlanmaları sonucu başlatılmaktadır (Wu ve ark. 2012). Nekroptoz başlatıcıları çok çeşitli oldukları için, bu süreç ortak bir sinyal yolunu takip etmemektedir. Reseptör-ligand etkileşimi ile başlayan nekroptoz sürecinde kaspaz-8, FADD ve RIP1 (RIPK1)'den oluşan bir kompleks meydana gelir. Normal şartlarda, aktif kaspaz-8 RIP1'i parçalayarak inaktif hale çevirir. Ancak, pankaspaz inhibitörü Z-VAK-fmk'ya veya viral enfeksiyona maruz kalma gibi sebepler sonucu kaspazların inaktif olmaları durumunda kaspaz-8, FADD, RIP1 ve RIP3'i kapsayan bir kompleks oluşur. Pro-nekrotik RIP1-RIP3 kompleksinin, glikojen fosforilaz (PYGL), glutamat-amonyak ligaz (GLUL) ve glutamat dehidrogenaz 1 (GLUD1) metabolik enzimler ile etkileşimleri, artan reaktif oksijen türlerinin (reactive oxygen species, ROS) üretiminin eşlik ettiği metabolizmaya neden olur. Bu nedenle; artan ROS üretimi, mitokondriyal membran geçirgenliğine ve bunu takiben nekroptozu yola açabilmektedir. Hücrel strese bağlı olarak PARP1'in aktif hale gelmesi, RIP kinazların ve kalpainlerin aktivasyonu ya da poli(ADP)-riboz (Poly(ADP-ribose), PAR) polimerlerinin üretimi aracılığıyla nekroptoz sürecini başlatabilmektedir (Xu ve ark. 2006, Moubarak ve ark. 2007, Hassa 2009). Bunun yanı sıra, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres, RIP1 ve RIP3 kinazların aktive olarak birbiriyle etkileşmelerini sağlayabilmektedir. Bu etkileşim, NADPH oksidazı etkileyerek ROS üretimini artırır ve nekroptozu neden olmaktadır (Kim ve ark. 2007, Cho ve ark. 2009, He ve ark. 2009). (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Nekroptoz (programlı nekroz) sinyal yolları (Ouyang ve ark. 2012'ndan değiştirilerek alınmıştır)

TNF α 'nın TNFR1'e bağlanması, TNFR1'in hücre içi kısmında değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, TNFR1'in yapısına TRADD, RIP1, FADD, TNF reseptör ilişkili faktör 2/5 (TNF receptor associated factor 2/5, TRAF2/5), apoptoz inhibitör proteinleri cIAP1 ve cIAP2 de katılmasını sağlayarak kompleks I yapısı oluşur. Bu kompleksteki RIP1 übikitinasyona uğraması, NF- κ B esansiyel modülatörü (NEMO) aktive eder ve bu durum, pro-yaşam hücre modunu indükleyen NF- κ B yolağının aktive olmasına neden olur. RIP1, deübikitinasyona uğradığında ise sitoplazmaya salınır ve TRADD, FADD, RIP3 ve kaspaz-8 ile kompleks II'yi oluşturur. Kaspaz-8 aktive olduğunda, RIP3 parçalanır ve kaspaz kaskadı harekete geçerek apoptoz gerçekleşir. Bunun tersi olarak,

kaspaz-8 baskılandığında fosforile RIP1 ve RIP3 nekrozom oluşturarak nekroptozu uyarır ve başlatır (Wu ve ark. 2012) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Apoptoz ve nekroptoz (Wu ve ark. 2012'dan değiştirilerek alınmıştır)

Apoptoz ve nekroptoz ölüm şekilleri, sinyal yollarında benzer ve ortak özellikler taşımalarına rağmen, önemli farklılıklara da sahiptirler. Apoptoz, fizyolojik ve patolojik şartlar altında gerçekleşirken, nekroptoz sadece fizyolojik şartlar altında gerçekleşmektedir. Bu iki ölüm modu, hücrelerde gözlenen morfolojik değişimlere göre de ayırt edici özellikler sergilemektedir. Apoptoz süresince, hücre yuvarlaklaşması ve küçülmesi/büzülmesi gözlenirken, nekroptozda hücreye sıvı girişi nedeniyle hücre şişmesi söz konusudur. Apoptozda, kromatin kondenzasyonu (piknozis) meydana gelir, buna karşılık nekroptozda kromatin normal hücrelerdeki görünüşüne benzer.

Ayrıca, nekroptozdan farklı olarak apoptozda nükleer fragmentasyon da gözlemlenir. Apoptotik hücrelerin membranında bleb olarak isimlendirilen şekilsiz yapılar oluşurken, nekrotik hücrelerde hücre membranı bütünlüğü bozulduğu için hücre içeriği dış ortama salınır. Apoptoz sürecinde, nükleus vb. hücre içi organelleri içeren membranla sarılı apoptotik cisimcikler incelenirken, nekroptoz sürecinde hücre lizise uğrar. Nekroptoz geçiren bir hücrede, hücre membranı yapısındaki bozulmaya bağlı olarak hücre içi materyaller hücre dışına salınır, bu durum immün hücreleri tarafından enflamatuvar cevap oluşturulmasına neden olur. Fakat apoptoz sürecinde oluşan apoptotik cisimcikler makrofajlar veya komşu hücreler tarafından fagosite edildiği için enflamatuvar yanıt oluşmaz (Majno ve Joris 1995, Montague ve Cidlowski 1996, Saraste ve Pulkki 2000, Nathan ve Ding 2011, Ulukaya ve ark. 2011).

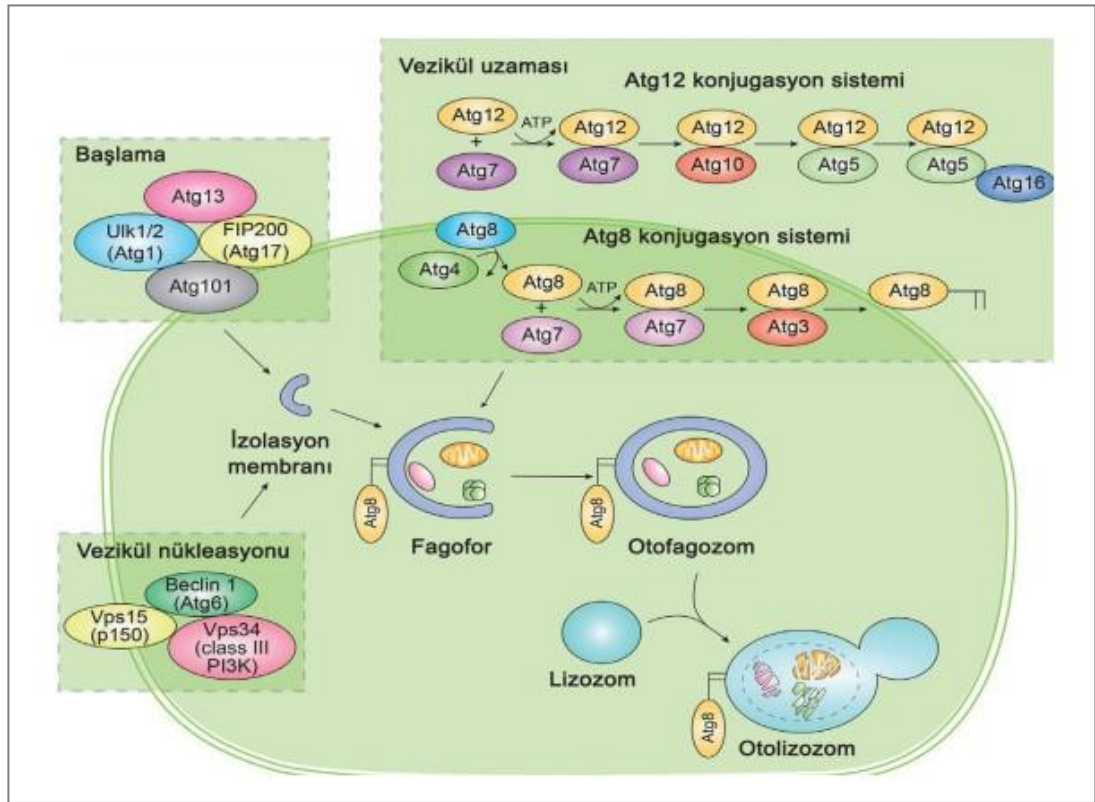
2.9.3. Otofaji

Otofaji, büyüme faktörlerinin tükenmesinden kaynaklı açlık ve stres gibi fizyolojik koşullara karşı hücrenin verdiği kendini yıkıcı (intihar) bir yanıt olarak tanımlanmaktadır. Otofajinin, besin yetersizliği durumunda hücre içi yapıları parçalayarak moleküllerin geri dönüşümünü sağlamada ve hücre homeostazında yaşamsal bir rol oynadığı gösterilmiştir. (Ohsumi 2001, Levine ve Klionsky 2004, Shintani ve Klionsky 2004, He ve Klionsky 2009). Son zamanlarda, otofajinin apoptoz ile karmaşık bir etkileşim içinde bulunduğu keşfedilmiştir (Eisenberg-Lerner ve ark. 2009). Bir çalışmada, otofajinin, apoptotik kusuru bulunan kanser hücrelerinde canlılığı sağladığı bildirilmiştir (Mathew ve ark. 2007). Bunun aksini ifade eden başka bir çalışmada; otofajinin, kanser hücrelerinde apoptozu ve kaspaz bağımsız yolağı aktive ederek ölüme yol açtığı tespit edilmiştir. Son yıllarda, nekrotik hücre ölümünü tetiklemek için otofajiye ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir (Ullman ve ark. 2008). Tüm bunlara rağmen, otofajinin bir hücrede hayatta kalma mekanizması olarak mı görev yaptığı yoksa hücre ölümünü mü tetiklediği halen tartışmalı bir konudur. Bu kapsamda, otofajinin; açlık, farklılaşma, hayatta kalma ve ölüm gibi sayısız fizyolojik sürecin kontrolünü sağladığı söylenmektedir (Liu ve ark. 2010).

Otofajik hücre ölümünde gözlemlenen en önemli morfolojik değişiklik, organellerin (mitokondri, endoplazmik retikulum gibi) ve/veya sitoplazmanın bir kısmının otofagozom/otofajik vakuol olarak adlandırılan çift ya da çok membranlı veziküller ile sarılması ve bu veziküllerin lizozomla birleşerek lizozomal enzimler tarafından parçalanmasıdır (Shintani ve Klionsky 2004). Otofajik hücre ölümü, 3 farklı şekilde gerçekleşebilmektedir. Sitoplazmada bulunan küçük yapıları parçaların, lizozom membranında oluşan girintiyle lizozom içine alınıp parçalanması mikrootofaji olarak isimlendirilmektedir. Daha büyük yapıları ve organelleri kapsayan otofagozomun lizozomla kaynaşıp sindirilmesi ise makrootofaji olup en yaygın gerçekleşen mekanizmadır. Sitoplazmada bulunan özel protein moleküllerinin şaperonlara bağımlı olarak lizozom içine alındığı ve vezikül oluşumunun gözlenmediği otofaji şekli ise şaperon aracılı otofojidir (Majeski ve Dice 2004, Shintani ve Klionsky 2004, Klionsky ve Lane 2010, Kroemer ve ark. 2010, Mehrpour ve ark. 2010).

Otofajik ölüm mekanizması, ilk kez mayalarda keşfedilen ve 30'dan fazla proteini içeren otofaji ile ilişkili gen (autophagy-related genes, ATG) ailesi ile modüle edilmektedir (Xie ve Klionsky 2007). Bu proteinlerin, otofaji sürecinde otofagozom oluşumunda ve genişlemesinde, otofagozomların lizozomlarla birleşmesinde ve lizozomal enzimler tarafından parçalanmasında rol oynadıkları bildirilmiştir. Sınıf I fosfoinositid-3 kinaz-protein kinaz B-rapamisin kompleksi 1'in memeli hedefi (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B-mammalian target of rapamycin complex 1, PI3K-AKT-mTORC1) sinyal yolağı, hücre büyümesinin ve otofajinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (White ve DiPaola 2009, Ouyang ve ark. 2012). Besin açısından zengin koşullar altında; Sınıf I PI3K'in ürünleri, AKT sinyal yolağının aktivasyonuna neden olurken, aktif AKT sinyal yolağı ise mTORC1 sinyal yolağını aktive eder. mTORC1, otofaji proteinlerinden biri olan Atg13'ü fosforile ederek otofajiyi baskılar. Hücrede açlık durumu söz konusu olduğunda, Sınıf I PI3K-AKT-mTORC1 sinyal yolağı inhibe edilir ve otofaji uyarılır. mTORC1'in inaktivasyonu, Atg13'yi defosforile ederek Atg1 (memelilerde Ulk1/2) proteininin serbest kalmasına neden olur. Atg1, Atg13 ve scaffold protein FIP200 (fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein, 200 kDa/mayalarda Atg17) proteinlerinden oluşan kompleks, izolasyon membranı/otofajik kesecik ve otofagozomların oluşumunu indükleyerek

otofajiyi başlatır (Kamada ve ark. 2000, Hara ve ark. 2008, Hosokawa ve ark. 2009). İzolasyon membranı/otofajik kesecik ve otofagozomların oluşumunu sağlayan diğer kompleks ise, sınıf III PI3P kinaz Vps34 ve Atg6 (memelilerde Beclin 1)'yi içeren komplekstir. Otofagozom membranının uzaması ise iki farklı sistem aracılığıyla gerçekleşmektedir. Atg12 konjugasyon sisteminde; Atg7 aktivasyonu Atg12'yi aktive eder ve Atg12, Atg5 ile kovalent bağla birleşir. Bu yapıya Atg16 proteininin katılmasıyla oluşan kompleks, izolasyon membranına tutunur. Atg8 konjugasyon sisteminde ise, Atg8 (memelilerde MAP-LC3 veya LC3) proteini, Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi aracılığıyla fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülü ile kovalent olarak bağ yapar. Atg8-FE kompleksi sayesinde zar uzaması sağlanır. Bu oluşum tamamlandıktan sonra Atg4 proteini, Atg8 proteinini FE yağ molekülünden ayırarak yeniden kullanılmasını sağlar. Otofagozomun lizozom veya endozom organeli ile birleşmesi sonucu, otofagozom içeriği enzimatik olarak sindirilir. Oluşan aminoasit, yağ asitleri gibi yapıtaşları yeniden kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur (Ohsumi 2001, Shintani ve Klionsky 2004, Xie ve Klionsky 2007, Kroemer ve ark. 2010, Mehrpour ve ark. 2010) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Otofaji sinyal yolları (Karadağ 2016, Mizushima ve ark. 2008)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

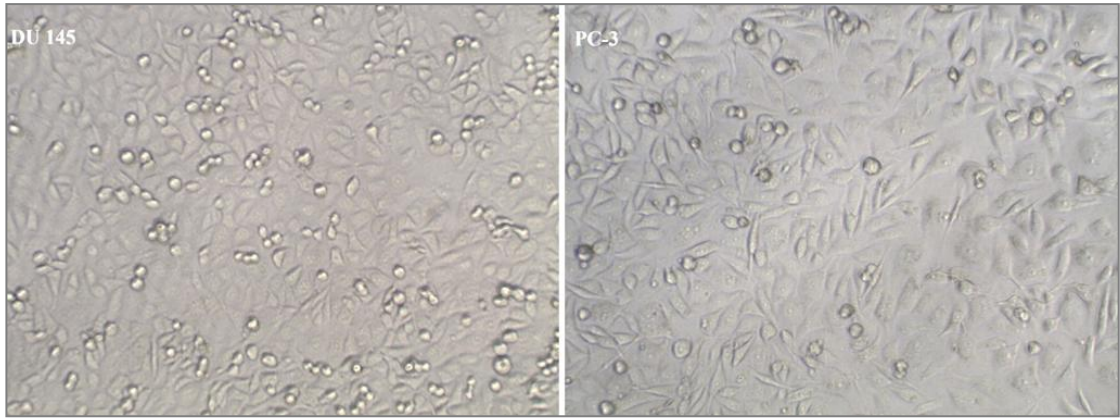
Tez kapsamında yapılması öngörülen arazi çalışmalarının yürütülmesi ve *E. hirsutum* (tüylü yakı otu) bitkisine ait örneklerin toplanması için T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünden bilimsel araştırma izni alındı. Bilimsel araştırma izninin onaylanmasına ilişkin yazı EK 1’de sunulmuştur.

3.1.2. Hücre hatları

Deneysel çalışmalarda androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatları kullanıldı.

- **DU 145 androjen bağımsız prostat kanseri hücre hattı:** DU 145 hücre hattı (ATCC, katalog numarası: HTB-81™), etnik kökeni beyaz ırk olan 69 yaşında *Homo sapiens* (insan) erkekten elde edilmiş prostat adenokarsinom hücreleridir. Hücrelerin köken aldığı metastatik bölge beyindir. Hücrelerin morfolojisi epitelyal olup büyüme özelliği adherent (yapışan)’dir (Stone ve ark. 1978) (Şekil 3.1).

- **PC-3 androjen bağımsız prostat kanseri hücre hattı:** PC-3 hücre hattı (ATCC, katalog numarası: CRL-1435™), etnik kökeni beyaz ırk olan 62 yaşında *Homo sapiens* (insan) erkekten elde edilmiş prostat adenokarsinom hücreleridir. Hücrelerin köken aldığı metastatik bölge kemiktir. Hücrelerin morfolojisi epitelyal olup büyüme özelliği adherent (yapışan)’dir (Kaighn ve ark. 1979) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatları, DU 145 ve PC-3 (x10)

3.1.3. Kimyasal maddeler ve ticari kitler

Tez çalışması boyunca deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler

Kimyasal Madde ve Ticari Kit	Üretici Firma	Katalog Numarası
2-Merkaptoetanol	Amresco	M131-100ML
Asetik asit, % 100	Sigma-Aldrich	27225
Biotinylated protein ladder detection pack	Cell Signaling Technology	7727
Cell Proliferation XTT kit	neoFroxx	1167TT000
Color prestained protein standard, broad range, 11-245 kDa	New England Biolabs	P7712
Diklorometan, \geq %99	Sigma-Aldrich	24233
Etanol absolü	Sigma-Aldrich	34870
Etil asetat, \geq %99,5	Sigma-Aldrich	27227
Fetal sığır serumu (FBS), ısı ile inaktive edilmiş)	Biological Industries	04-127-1B
Fosfat tamponlu tuz solüsyonu, 10X	Lonza	BE17-517Q
Hidroklorik asit, %37	Sigma-Aldrich	30721
Hoechst 33342, 20 mM	Thermo Scientific	62249
innuPREP RNA mini kit	Analytik Jena	845-KS-2040010
iScript™ cDNA synthesis kit	BioRad	1708890
Kloroform	Merck Millipore	102444
L-glutamin, 200 mM	Biological Industries	03-020-1B
LightCycler® 480 Probes Master	Roche	04707494001

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler (devam)

Kimyasal Madde ve Ticari Kit	Üretici Firma	Katalog Numarası
Luminata forte western HRP substrate	Millipore	WBLUF0100
Metanol, $\geq 99,7$	Sigma-Aldrich	24229
<i>n</i> -Butanol (<i>n</i> -Butanol), $>99,0$	Fluka	19430
<i>n</i> -Hekzan, ≥ 95	Sigma-Aldrich	208752
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich	74385-1L
Oenothain B analytical standard	Sigma-Aldrich	03805
Paclitaxel from <i>Taxus brevifolia</i> , ≥ 95	Sigma-Aldrich	T7402- 1MG
Penisilin (10 000 U/ml) - streptomisin (10 mg/ml)	Biological Industries	03-031-1B
Pierce TM BCA protein assay kit	Thermo Scientific	23227
Pierce TM dimetilsülfoksit (DMSO), LC-MS grade	Thermo Scientific	85190
Propidium iodide, 1 mg/ml	BioVision	1056-1
Protease/phosphatase inhibitor cocktail, 100X	Cell Signaling Technology	5872
RIPA lysis and extraction buffer Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Thermo Scientific	89901
Sample buffer, Laemmli 2X Concentrate	Sigma-Aldrich	R8758
Sığır serum albümini, proteaz-free	Sigma-Aldrich	S3401-10VL
Sodyum azid	Capricorn Scientific	BSAPF
Sulfhorodamine B sodium salt (SRB)	Sigma-Aldrich	71289
Transfer buffer, methanol-free, 10X	Sigma-Aldrich	S1402
Trikloroasetik asit	Thermo Scientific	35040
Tripsin-EDTA, %0,25	Merck Millipore	100807.0250
Tris	Biological Industries	03-052-1B
Tris buffered saline with tween 20 (TBS-T), 10X	Amresco	0826
Tris/glycine/SDS running buffer, 10X	Cell Signaling Technology	9997S
Triton X-100	BioRad	161-0772
Trypan blue solution, %0,5	Biobasic	TB0198
Yağsız kuru süt tozu (Nonfat dry milk)	Biological Industries	03-102-1B
	Cell Signaling Technology	9999S

3.1.4. Primerler ve problar

Tez çalışmasının kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizinde kullanılan primerler ve problar Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde incelenen genlere ait primerler ve problar

Gen Adı	Primerler ve Problar	Üretici Firma	Katalog Numarası
<i>β-Actin (ACTB)</i>	Universal ProbeLibrary probe #63	Roche	4688627001
<i>ATG5</i>	Universal ProbeLibrary probe #39	Roche	4687973001
<i>Beclin 1 (BECN1)</i>	Universal ProbeLibrary probe #55	Roche	4688520001
<i>Caspase 3 (CASP3)</i>	Universal ProbeLibrary probe #92	Roche	4692098001
<i>Caspase 8 (CASP8)</i>	Universal ProbeLibrary probe #40	Roche	4687990001
<i>Caspase 9 (CASP9)</i>	Universal ProbeLibrary probe #42	Roche	4688015001
<i>Caspase 10 (CASP10)</i>	Universal ProbeLibrary probe #21	Roche	4686942001
<i>Cytochrome C (CYCS)</i>	Universal ProbeLibrary probe #55	Roche	4688520001
<i>FADD</i>	Universal ProbeLibrary probe #64	Roche	4688635001
<i>PARP1</i>	Universal ProbeLibrary probe #41	Roche	4688007001
<i>RIPK1</i>	Universal ProbeLibrary probe #9	Roche	4685075001

3.1.5. Antikorlar

Tez çalışmasının western blot analizinde kullanılan antikorlar Çizelge 3.3’de verildi.

Çizelge 3.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan antikorlar

Antikorlar	Üretici Firma	Katalog Numarası
<i>β-Actin (13E5) Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology	4970T
<i>Atg5 (D5F5U) Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology	12994
<i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody</i>	Cell Signaling Technology	7074S
<i>Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology	9665T
<i>Caspase-8 (D35G2) Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology	4790T
<i>Caspase-9 Antibody (Human Specific)</i>	Cell Signaling Technology	9502T
<i>Cytochrome c (D18C7) Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology	11940T
<i>Rabbit Caspase-10 Polyclonal Antibody</i>	YL Biont	YID0803

3.1.6. Sarf malzemeler

Tez çalışması boyunca deneylerde kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.4’de verildi.

Çizelge 3.4. Deneysel çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Üretici Firma
Ayrırma hunisi	Teknik cam
Buharlaştırma balonu (armudi tip)	İldam
Blotlama kağıdı	Macherey-Nagel
Cam, rodajlı lam, 26 mm x 76 mm	Isolab
Cam lamel, 24 mm x 24 mm	Isolab
Cam pastör pipet (2 ml)	Isolab
Cam şişeler (farklı hacimlerde)	Isolab ve Schott Duran
Falkon tüpler (15 ve 50 ml)	Corning
Filtreli steril pipet uçları (10, 200 ve 1000 µl)	ATS ve Corning
Flasklar (25 ve 75 cm ²)	Corning
Immobilon-P PVDF transfer membranı (0,45 µm)	Millipore
Jel yükleme pipet uçları (200 µl, 0,57 mm)	SSIbio
Kriyoviyal tüpler (2 ml)	Corning ve Nest
Mikroplakalar (6 ve 96 kuyucuklu)	Nest
Mini protean TGX precast protein gels (% 4-15, 30 µl)	4561083, BioRad
Neubauer hemositometresi (0,1 mm 0,0025 mm ²)	Isoterm
PZR tüpleri (0,2 µl)	Thermo Scientific
Santrifüj tüpleri (0,5, 1,5 ve 2 ml)	Eppendorf
Serolojik pipetler (5 ve 10 ml)	LP Italiana Spa
Steril enjektörler (5, 10 ve 20 ml)	Hayat
Steril filtre (0,2 µm)	Corning
Steril küvet (50 ml)	Corning
Şilifli cam kaynama balonları	İldam
Şilifli cam erlenler	İldam

3.1.7. Cihazlar ve ekipmanlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar Çizelge 3.5’de verildi.

Çizelge 3.5. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Cihazlar ve Ekipmanlar	Model ve Üretici Firma
Mini-protean tetra cell (2-gel) and tetra blotting module	1660827EDU, BioRad
Analitik terazi	AUX 320, Shimadzu
Balon ısıtıcı	MX 425, Elektro-mag
Buzdolabı (4 °C)	Arçelik
Buz üretme cihazı	AF80-AS, Scotsman
Çalkalamalı inkübatör	SSI3, Shel Lab
Çok kanallı pipet (20-200 µl)	Axypet, Axygen
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Dijital kamera ataçmanlı inverted mikroskop	3032, AccuScope
Floresan ataçmanlı inverted mikroskop	N-800M, Novel
Görüntüleme cihazı	1708280, ChemiDoc™ MP, BioRad
Güç kaynağı (elektroforez için)	PS300B, Hoefer
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	MSH-300, Biosan
Kuru ısı bloğu	TS-100, Biosan
LightCycler® 480 II	05015278001, Roche
Manyetik karıştırıcı balon ısıtıcı	E-104, Mtops
Mikroplaka çalkalayıcı	PST-60HL-4, Biosan
Hassas terazi	EMB 2000-2, Kern
Inverted mikroskop	CKX41, Olympus
Kaba terazi	BP3100S, Sartorius
Karbondioksit (CO ₂)’li etüv	BB15, Thermo Scientific
Liyofilizatör	Labconco Freeze Dry System
Mekanik karıştırıcı	RZR 2021, Heidolph
Mikroplaka okuyucu	iMark, BioRad
Mikrosantrifüj	D-78532, Labogene ScanSpeed
Mini karıştırıcı	MR-1, Biosan
Minisantrifüj	Sprout
Orbital çalkalayıcılar	IKA, KS 260 basic ve Model 1000, VWR International
Otoklav	OT4060V, Nüve
Otomatik pipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl ve 100-1000 µl)	Rainin
Rotary evaporatör	Hei-VAP Advantage, Heidolph
Rotary evaporatör, büyük ölçekli	R-151, Buchi
Saf su cihazı	Simplicity® Water Purification System, Merck Millipore
Soğutmalı santrifüj	5500, Kubota
Soxhlet ekstraktörü	İldam
Spektrofotometre	NanoDrop 2000C, Thermo Scientific

Çizelge 3.5. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve ekipmanlar (devam)

Cihazlar ve Ekipmanlar	Model ve Üretici Firma
Steril kabin	Labculture Class II BSC, Esco
Su banyosu	GFL 1086, Thermolab
Şarjlı pipet pompası	Motopet, Axygen
Thermal Cyclers (termal çevrim cihazı)	GCI-96, Corbett Reseach Palm Cyclers
Tıbbi soğutma cihazı (-80 °C)	MDF-U7386S, Sanyo
Ultrasonik banyo	Elmasonic S 100 H, Elma Schmidbauer
Vakum Pompası	V100, Buchi
Vorteks	Vortex-Genie 2, Scientific Industries

3.2. Yöntem

3.2.1. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin toplanması, tanımlanması ve kurutulması

Çalışma materyalini oluşturan *Epilobium hirsutum* L. bitkisine ait örneklerin toplanması amacıyla ilk olarak, Flora of Turkey and East Aegan Islands (Davis 1972) adlı eserde ve Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu (BULU) örneklerinde bildirilen flora kayıtları incelendi. Lokaliteyi tespit etmek için bitkinin çiçeklenme zamanı, habitatu, yüksekliği ve yayılış alanları ile ilgili bilgilerden faydalanarak arazide keşif çalışmaları planlandı.

Arazi çalışmalarında, bitkinin A2 Bursa: Orhaneli, Sadağı Kanyonu'nda dere yatağı kenarlarındaki nemli topraklarda doğal yayılış gösteren popülasyonlarının varlığı tespit edildi. 23.06.2017 tarihinde, çiçek açma periyodundaki bitkinin; gövde, yaprak ve çiçekten oluşan toprak üstü kısımlarından (herba), örnek olarak ve ekstraksiyona yetecek miktarda toplandı. *E. hirsutum* bitki türünün tanımlanması ve Orhaneli, Sadağı Kanyonu'ndaki yayılış alanlarından toplanması, Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından gerçekleştirildi. Bitki örnekleri çevresel kirlilik bulunmayan temiz alandan toplandı. Bitki materyalinin toplanması sırasında ekosistemdeki hassas dengenin bozulmamasına ve türün neslinin sürdürülebilir olmasına özen gösterildi. Bitkinin tespit edildiği lokalitede geniş yayılış alanına sahip olması ve yoğun popülasyonlarının bulunması, küçük ölçekteki toplama için bir sakınca oluşturmadı. Bitkinin usulüne uygun şekilde ve morfolojisini kaybetmeden hazırlanmış herbiye örneği, BULU herbaryum

koleksiyonunda (BULU numarası: 4236) saklanmaktadır. *E. hirsutum* bitki türünün toplandığı lokalitedeki fotoğrafları Şekil 3.2’de verildi.



Şekil 3.2. Doğal yayılış alanındaki *Epilobium hirsutum* L. bitkisi

Bitkinin taze toprak üstü kısımları yabancı maddelerden temizlenerek gölgede kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş bitkinin yaprakları ve çiçekleri gövdeden ayrıldı ve elde edilen kuru ağırlık kaba terazide tartıldı. Bitkisel drog (*Epilobii herba*, tüylü yakı otu herbası), ekstraksiyon çalışmalarına kadar nem ve ışık almayan, serin, havadar ve karanlık oda koşullarında saklandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin kurutulması

3.2.2. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinin ekstraksiyon çalışmaları

E. hirsutum bitkisindeki potansiyel biyoaktif bileşenleri izole edebilmek amacıyla bitkisel drogdan, farklı çözücüler ve yöntemler ile ham ekstratlar hazırlandı. Ekstraksiyon yöntemlerinin ve organik çözücülerin seçiminde literatür bilgileri ve geleneksel kullanım şekilleri dikkate alındı. Bitki materyali etnobotanik bir bakış açısıyla seçildiğinden dolayı, etken maddelerin izole edilme şansını artırmak için genel ekstraksiyon protokolüne alternatif yöntemler ve farklı polaritelerdeki organik çözücüler dâhil edildi. Böylece, kapsamlı bir ön ekstraksiyon çalışmasıyla tüm ham ekstratların sitotoksik aktivitelerinin taranması ve en iyi sonuçları veren yöntem ve çözücü türü ile çalışmaya devam edilmesi amaçlandı.

Ekstraksiyon işlemlerinde, çözücü tabanlı katı-sıvı ekstraksiyon prosedürleri uygulandı. Ekstraksiyon çalışmalarından önce, kurutulmuş ham drog kaba toz haline getirilerek ön işleminden geçirildi (Şekil 3.4). Parçacık boyutunun küçültülmesiyle drog ile çözücü arasındaki temas yüzeyi artırıldı. Böylelikle, çözücünün droğa daha iyi düzeyde nüfuz

etmesi, drogda bulunan etken maddelerin çözücü içine daha çok difüze olması ve nihai olarak da ekstraksiyon veriminin artması sağlandı.



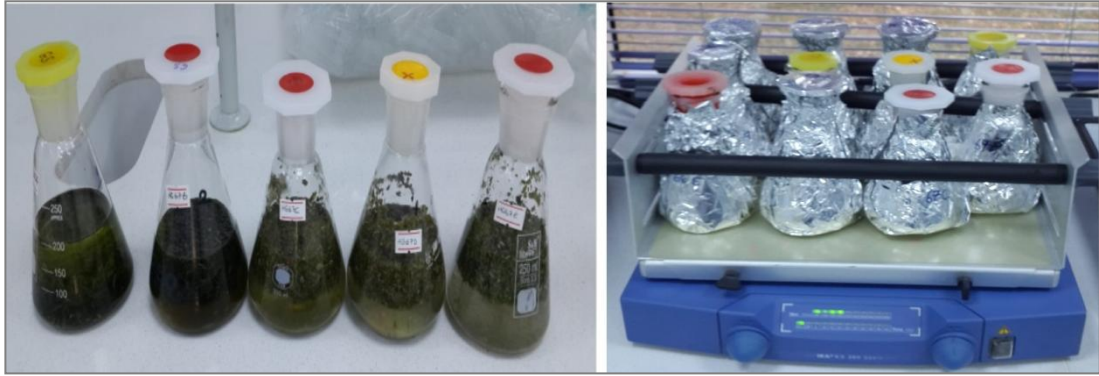
Şekil 3.4. Kaba toz haline getirilmiş drog

Maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon

Maserasyon, droğun kapalı bir ortam içinde uygun çözücü ile belli bir süre temasta bırakıldığı ve tercihen çalkalama veya sonikasyon işleminin uygulandığı ekstraksiyon tekniğidir. Maserasyon süresi sonunda, elde edilen ekstrenin (maserat) süzme işlemi ile drogdan ayrılması sağlanmaktadır (Sarker ve ark. 2006, Demirci ve ark. 2010b).

Maserasyon yöntemiyle ham ekstreler elde etmek için, 5 g olarak tartılmış kaba toz haldeki droglar, 200 ml hacimlerindeki *n*-hekzan, diklorometan, %100 metanol, %80 metanol ve su çözücüleri ile ayrı ayrı çalkalamalı ekstraksiyona tabi tutuldu. Maserasyon, oda sıcaklığında ve 200 rpm'deki orbital çalkalayıcıda ışıktan izole olarak 24 saat boyunca gerçekleştirildi. Maserasyon boyunca, ekstredeki ve drogdaki etken maddelerin konsantrasyonları arasında denge sağlandığında ekstraksiyon durmaktadır. Maserasyona devam edebilmek için bitki materyalinin, etken madde bakımından doygunluğa ulaşmış çözücünden ayrılması ve çözücünün yenilenmesi gerekmektedir. Bu sebeple, 24 saat sonra karışımlar bir filtre kâğıdı aracılığıyla süzüldü ve süzüntüler kullanılan çözücülerin türüne bağlı olarak ayrı cam şişelere aktarıldı. Kalan drogların üzerine taze çözücüler ilave edildi ve 24 saat boyunca aynı şartlar altında tekrar

maserasyon gerçekleştirildi. Bu prosedür, literatürde ifade edildiği gibi üç kez tekrarlandı (Sarker ve ark. 2006). Birinci ve ikinci ekstraksiyon adımlarında 200 ml hacminde, son adımda ise 100 ml hacminde organik çözücü kullanıldı. Ekstraksiyon süresi sonunda elde edilen toplam 500 ml hacmindeki maseratlar, yoğunlaştırılmaya kadar oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda saklandı. Maserasyon yöntemiyle gerçekleştirilen ekstraksiyonun aşamaları Şekil 3.5’de gösterildi.



Şekil 3.5. Maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon

İnfüzyon yöntemiyle ekstraksiyon

İnfüzyon, drog üzerine kaynar su eklenmesiyle hazırlanan kısa süreli maserasyon işlemidir (Sarker ve ark. 2006, Demirci ve ark. 2010b). Geleneksel tıpta bazı ilaçlar infüzyonlar şeklinde hazırlanmaktadır (Sarker ve ark. 2006). Çalışma kapsamında araştırılan *E. hirsutum* bitkisi, daha önce belirtildiği üzere halk tıbbında yaygın olarak infüzyon/çay şeklinde kullanılmaktadır. Bu nedenle, sitotoksik aktivitesini çalışmak üzere drogdan %5’lik infüzyon ekstresinin hazırlanması planlandı.

%5’lik infüzyon ekstresi hazırlamak için, 5 g olarak tartılmış kaba toz haldeki drog üzerine kaynatılıp dinlendirilmiş 100 ml distile su eklendi. Ardından, karışım 80 °C’lik su banyosunda 5 dakika boyunca bekletildi. Süre sonunda, infüzyon ekstresi su banyosundan alınıp oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuyan ekstre süzüldü ve çözücü kalan drogdan ayrıldı. Elde edilen %5’lik infüzyon ekstresi, yoğunlaştırılmaya kadar oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda saklandı.

Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu, küçük ve orta ölçekli bitki materyallerinin ekstre edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Soxhlet ekstraksiyonu, 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından geliştirilen ve en basit şekliyle şilifli cam kaynama balonu, soxhlet ekstraktörü, geri çeviren soğutucu ve balon ısıtıcı olmak üzere dört bölümden oluşan bir düzenekte gerçekleştirilmektedir (Sarker ve ark. 2006, Kırımer ve ark. 2010).

Bu çalışmada, çözücü sıcaklığının ekstraksiyondaki etkisini araştırmak amacıyla Soxhlet ekstraktörü kullanılarak devamlı ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyon için ilk olarak, 5 g olarak tartılmış kaba toz haldeki drog, filtre kâğıdından yapılmış özel kartuş içerisinde küçük ölçekli Soxhlet ekstraktörüne yerleştirildi. Daha sonra, çözücü olarak kullanılan *n*-hekzan, kaynama balonuna ve Soxhlet ekstraktörüne yeterli miktarda (1 sifon yapacak kadar) eklendi. Kaynama balonu, Soxhlet ekstraktörü ve geri çeviren soğutucu birbirine bağlanarak balon ısıtıcı üzerine yerleştirildi. Çözücünün kaynayabilmesi için sıcaklık 100 °C'ye (*n*-hekzanın kaynama noktasının üzerindeki sıcaklığa) ayarlandı ve Soxhlet ekstraktöründe 6 saat süreyle devamlı ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyon boyunca, kaynama balonunda ısıtıcı sayesinde kaynayan *n*-hekzan buharlaştı. Sıcak *n*-hekzan buharı ekstraksiyon kolundan geçerek geri çeviren soğutucuya ulaştı. Burada yoğunlaşan *n*-hekzan, damlalar halinde kartuş içerisindeki drog üzerine düşmeye başladı. Soxhlet ekstraktöründeki drog, yoğunlaşan *n*-hekzan çözücüsü ile tam dolduğunda sifon seviyesine ulaşıldı. Çözücü, sifon yaparak drogda çözdüğü etken maddeler ile birlikte kaynama balonuna boşaldı. Ekstraksiyon süresince, sıcak *n*-hekzan çözücüsünün drog içerisindeki döngüsü sürekli tekrar etti. Her döngü esnasında, drogdan ekstre edilen etken maddeler kaynama balonu içinde kalırken sadece saf çözücü ile ekstraksiyon devam etti. 6 saat süren devamlı ekstraksiyondan sonra, kaynama balonunda toplanan ekstre soğutulup yoğunlaştırılmaya kadar oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda saklandı. Soxhlet ekstraksiyonu Şekil 3.6'da gösterildi.



Şekil 3.6. Soxhlet ekstraksiyonu

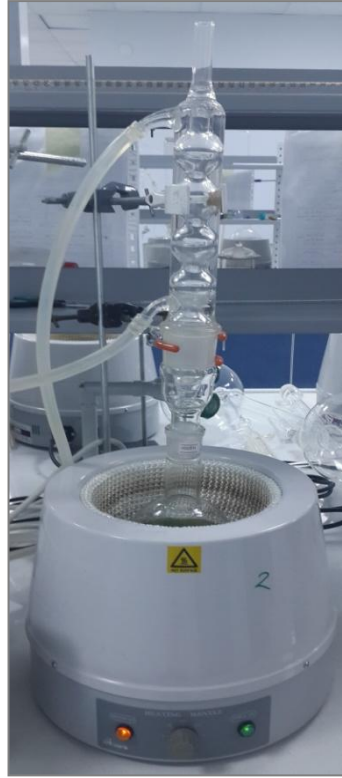
Soxhlet ekstraksiyonunu takiben yürütülen ikinci ekstraksiyon çalışmaları

Bitkisel drogların yapısında bulunan apolar bileşikler, lipofilik maddeler vb. bileşikler, etkinlik açısından daha az öneme sahip oldukları için bazı durumlarda ekstraktların biyolojik aktivitelerinde beklenen sonuçları engelleyebilmektedir. Böyle durumlarda, bu bileşiklerin drogdan uzaklaştırılması ve ardından elde edilecek ekstraktların biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi daha doğru ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu bağlamda, yürütülen çalışmada Soxhlet ekstraktöründe sürekli sıcak ekstraksiyonuna tabi tutulan drogdan, iki farklı yöntemle ikinci ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Böylece, apolar bileşiklerin ve lipofilik maddelerin bitkisel droğun aktivitesi üzerinde etkili olup olmadığı değerlendirildi.

Soxhlet ekstraksiyonu sonrası kartuştan alınan kaba toz haldeki droglar; havadar, ışık almayan ve oda sıcaklığındaki ortamda kurumaya bırakıldı. Kuruyan droglardan hem maserasyon yöntemiyle hem de geri çeviren soğutucu düzeneği aracılığıyla ayrı ekstraktlar hazırlandı.

Maserasyon yöntemiyle *E. hirsutum* ekstresinin hazırlanması, daha önce açıklanan prosedür takip edilerek yapıldı. Özetlemek gerekirse, Soxhlet ekstraksiyonu sonrası kurumaya bırakılmış 5 g drog, %80 metanol çözücüsü ile 24 saat boyunca maserasyona bırakıldı. Maserasyon, 200 rpm'deki orbital çalkalayıcıda, oda sıcaklığında ve ışıktan izole olarak yürütüldü. 24 saat sonunda, doygunluğa ulaşan çözücü süzme işlemiyle katı drogdan ayrıldı. Doygun çözücünün üç kez tazelenmesinin ardından, bitki materyalinin etkili bileşikleri neredeyse tamamen ekstre edilmiş oldu. Her maserasyon periyodunun sonunda süzülerek drogdan ayrılan maseratlar, en son hacim 500 ml olacak şekilde aynı cam şişede toplandı ve yoğunlaştırma aşamasına dek oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda saklandı.

Geri çeviren soğutucu düzeneğindeki ekstraksiyon yönteminin esası, çözücünün; drog ile birlikte kaynaması, buharlaşması ve soğutucuda yoğunlaşması ile droğun devamlı ekstraksiyonuna olanak tanınmasıdır. Soxhlet ekstraksiyonu sonrası kurumaya bırakılmış 5 g drog, 300 ml hacmindeki %80 metanol çözücüsü ile geri çeviren soğutucu düzeneğinde 4 saat süreyle devamlı ekstraksiyona tabi tutuldu. Karışım süzüldükten sonra kalan droğun taze çözücü ile 4 saat süren ikinci ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Geri çeviren soğutucu düzeneğindeki ekstraksiyon boyunca drog, %80 metanol çözücüsü ile birlikte temastaydı ve sıcaklık etkisiyle çözücü ile birlikte kaynadı. Bu sayede çözücü, drogdaki etken maddeleri çözdü. Drogdan ekstre edilen etken maddeler kaynama balonunda birikirken, kaynama etkisiyle buharlaşan çözücü geri çeviren soğutucuya ulaşır burada yoğunlaştı ve damlalar halinde tekrar kaynama balonuna boşaldı. Bu şekilde, çözücü kaybı olmaksızın toplam 8 saat boyunca devamlı ekstraksiyon gerçekleştirildi (Şekil 3.7). Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra ekstre süzülerek drogdan ayrıldı. Elde edilen ekstre, yoğunlaştırma aşamasına dek oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda saklandı.



Şekil 3.7. Geri çeviren soğutucu düzeneğinde ekstraksiyon

Bitkisel drogdan çeşitli ekstrelerin hazırlanmasında kullanılan farklı polarite aralığındaki çözücülerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.6’te verildi.

Çizelge 3.6. Ekstrelerin hazırlanmasında kullanılan çözücülerin fizikokimyasal özellikleri (Seidel 2006)

Çözücü	Formül	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Kaynama Noktası (°C)	Polarite İndeksi
<i>n</i> -Hekzan	C ₆ H ₁₄	86,18	69	0,0
Diklorometan	CH ₂ Cl ₂	84,93	41	3,1
Metanol	CH ₃ OH	32,04	65	5,1
Su	H ₂ O	18,01	100	9,0

3.2.3. Ekstrelerin yoğunlaştırılması

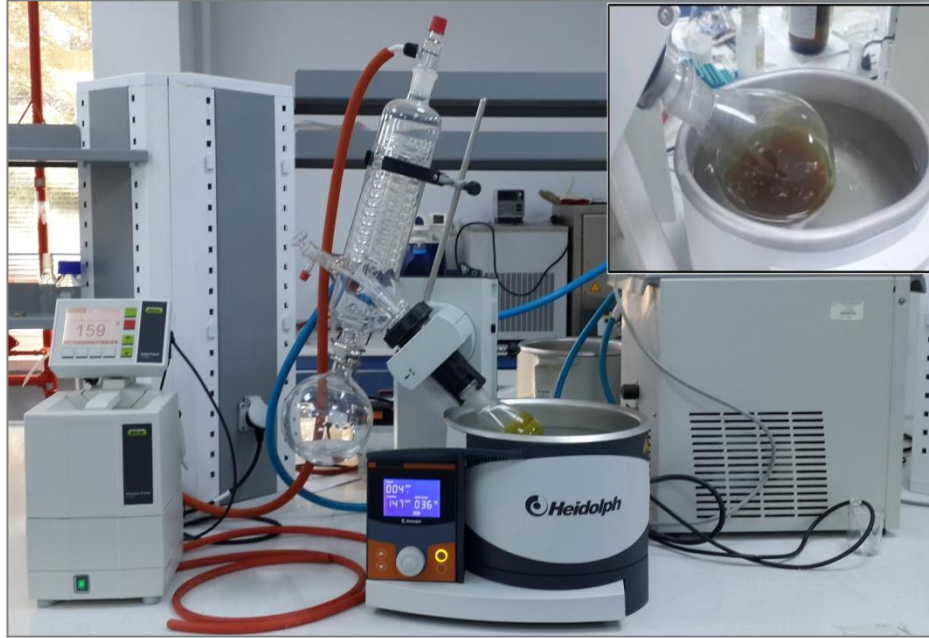
Ekstraksiyon işlemleri tamamlandıktan sonra, ekstrelerdeki organik çözücülerin uzaklaştırılması ve kuru toz haldeki ham ekstrelerin elde edilmesi gereklidir. Bu çalışmada, ekstrelerdeki stabil olmayan etken maddelerin kaybını engellemek için ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanmasının hemen ardından ekstreler yoğunlaştırıldı. Ekstraksiyon işlemleri için kullanılan organik çözücü türüne uygun yöntemler seçilerek konsantre ekstreler elde edildi.

Ekstrelerin rotary evaporatör (döner buharlaştırıcı) cihazında yoğunlaştırılması

Rotary evaporatör (döner buharlaştırıcı), düşük kaynama noktasına sahip çözücülerin buharlaştırılmasını ve ısıya duyarlı maddelerin bu çözücülerden hızlı ve etkin bir şekilde ayrılmasını sağlayan cihazdır. Uçucu bileşenlerin, uçucu olmayan bileşenlerden uzaklaştırılması temeline dayanan cihaz, 1950 yılında Lyman C. Craig tarafından icat edilmiştir. Rotary evaporatör sistemi; düşük buhar basıncı, mekanik rotasyon ve ısıtma olaylarıyla çözücülerin buharlaşma oranlarını artıracak şekilde tasarlanmıştır. Bu sistemde, vakum altında buhar basıncının azaltılması çözücünün; kaynama noktasının düşmesine, normalden daha düşük bir sıcaklıkta kaynayıp buharlaşmasına neden olmaktadır. Cam balon içindeki solüsyonun sıcak su banyosundaki mekanik rotasyonu ise, uzaklaştırılacak çözücünün yüzey alanını artırmaktadır. Böylece, çözücünün buharlaşma oranı artarken düzensiz kaynama riski azalmaktadır (Craig ve ark. 1950).

Bu çalışmada, farklı yöntemlerle *n*-hekzan, diklorometan ve %100 metanol çözücülerini kullanarak hazırlanmış bitki ekstreleri, rotary evaporatör cihazında yoğunlaştırıldı. Farklı yöntemler kullanılarak hazırlanan %80 metanol ekstreleri ise, önce rotary evaporatörde buharlaştırıldı ve metanol çözücüsü ekstreten kaldırıldı. Daha sonra, kalan sulu kısmı uzaklaştırmak için, sonraki bölümde açıklandığı gibi liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yapıldı. Rotary evaporatör cihazında buharlaştırma işlemi için, armudi tip buharlaşma balonunun yarısı ekstre ile dolduruldu. Daha sonra, buharlaşma balonu klips kullanılarak rotary evaporatör cihazındaki şilifli desteğe bağlandı ve su banyosu içerisine alındı. Ekstrelerde bulunan ısıya karşı dayanaksız bileşenlerin bozunmasını önlemek için, buharlaştırma işlemleri boyunca su banyosunun sıcaklığı

40 °C'nin altında (genellikle 35-36 °C'de) tutuldu. Vakum sistemi çalıştırılarak buharlaşma balonu içindeki atmosfer basıncının kademeli olarak azalması sağlandı. Ardından, balonun 130 rpm'de rotasyonu başlatıldı ve ekstrelerdeki çözücülerin buharlaşmasına izin verildi. Bu işlem boyunca, buharlaşma balonundaki basıncın azalmasıyla çözücülerin kaynama noktası düştü ve böylece çözücülerin düşük sıcaklıkta kaynayıp buharlaşması sağlandı. Çözücü buharları, kondansatöre (soğutucuya) ulaşır burada yoğunlaşarak damlalar halinde çözücü toplama balonunda toplandı. Çözücülerin tamamı buharlaşıp toplama balonuna çözücü akışı durana kadar rotary evaporatörde buharlaştırma yapıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ekstrelerin rotary evaporatörde yoğunlaştırılması

Çözücülerin buharlaşması sona erdiğinde, buharlaşma balonunun iç çeperinde bir film oluşturan kuru ham ekstreler, ilgili çözücülerden küçük hacimlerde kullanılarak ultrasonik banyoda çözündürüldü ve flakonlara aktarıldı. Flakonlardaki çözücüler ise, yüksek saflıktaki azot gazı (N₂) akımı altında buharlaştırıldı. Elde edilen kuru ham ekstreler, çalışma süreci boyunca ışıktan korunarak 4 °C'de muhafaza edildi.

Ekstrelerin liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemiyle kurutulması

Suyun yüksek kaynama noktasına ve yüzey gerilimine sahip olması nedeniyle, su ekstralarının ya da su ve organik çözücü karışımlarından oluşan ekstraların rotary evaporatör cihazında yoğunlaştırılması zordur. Bundan dolayı, bu tür ekstradaki su çözücüsü, dondurarak kurutma olarak da bilinen liyofilizasyon yöntemiyle uzaklaştırılmaktadır (Sarker ve ark. 2006). Liyofilizasyon, dondurulmuş bir örnekteki buz kristallerinin vakum altında süblimleştirilmesi yoluyla suyun örnekten uzaklaştırılması işlemidir (Jennings 1999). Bu çalışmada, su içinde hazırlanan ekstralar ile %80 metanol ekstralarının kalan sulu kısımları liyofilizasyon yöntemiyle kurutuldu. Özetlemek gerekirse; ilk olarak, su ekstraları -20 °C’de donduruldu ve böylece suyun buz kristalleri oluşturarak çözünen maddelerden ayrılması sağlandı. Daha sonra, düşük sıcaklıkta ve vakum altında buz kristallerinin süblimleştirilmesi sağlandı. Liyofilizasyon işlemi sonunda elde edilen kuru ham ekstralar, çalışma süreci boyunca ışıktan korunarak 4 °C’de muhafaza edildi.

Bu çalışmada, ham ekstralardan aktif bileşikleri izole edebilmek amacıyla ‘biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı’ temel alındı. Bu bağlamda, ham ekstraların androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatlarındaki olası sitotoksik etkileri *in vitro* olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar ışığında, aktiviteden sorumlu bileşikleri tayin edebilmek için en güçlü sitotoksik etkiye sahip ekstradan fraksiyonlama yapıldı.

3.2.4. Kaba fraksiyonların hazırlanması

Sitotoksikite sonuçları, tüm ekstralar arasında en iyi sitotoksik aktiviteyi sergileyen ekstranın, maserasyon yöntemiyle hazırlanan su ekstresi olduğunu gösterdi. Su ekstresinde bulunan farklı polaritedeki fitokimyasalların ayrılabilmesi için S1V1-S1V1 ekstraksiyon yöntemiyle fraksiyonlama yapılmasına karar verildi. S1V1-S1V1 ekstraksiyon yöntemi, ayırma hunisinde birbirine karışmayarak ayrı fazlar oluşturan iki çözücünün kullanılmasını ve bitkisel droglardaki bileşiklerin çözücülerdeki çözünürlük özelliklerine göre ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir (Otsuka 2006). Bu yöntemle su ekstresinden fraksiyonlama yapabilmek için öncelikle ham ekstre hazırlandı. Bu

doğrultuda, kaba toz halindeki 400 g drog, 8 litre distile su ile büyük ölçekli maserasyona tabi tutuldu (Şekil 3.9).



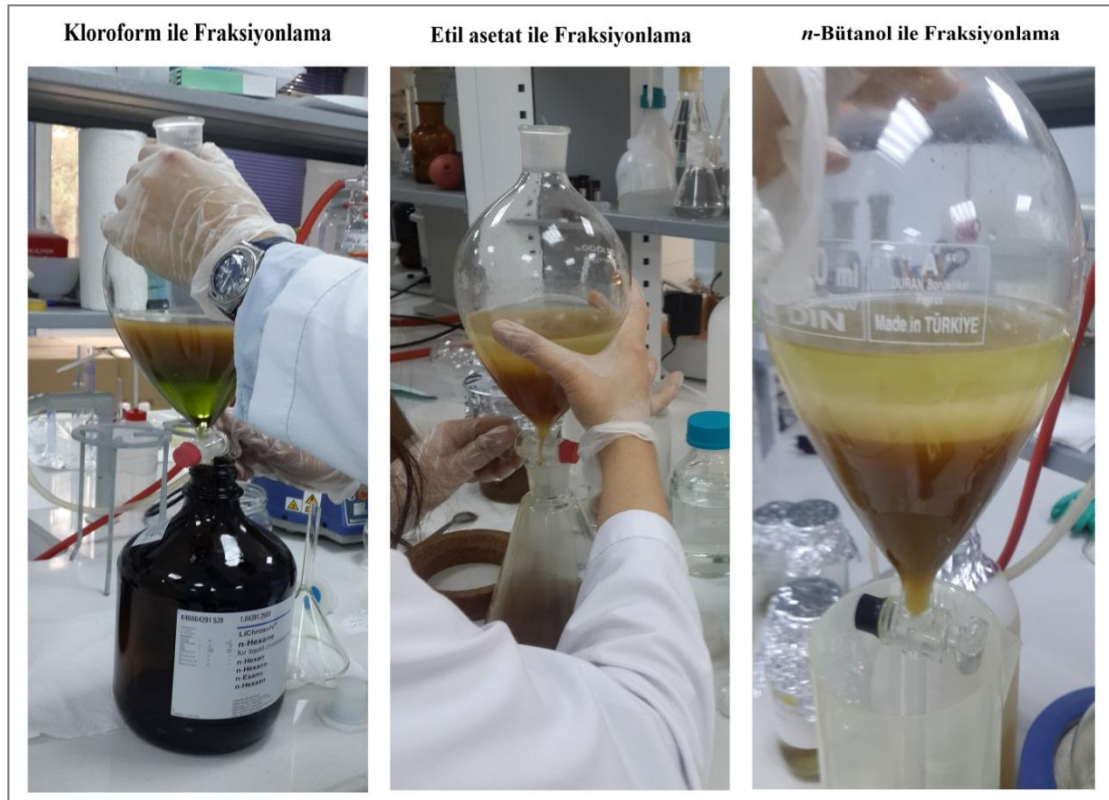
Şekil 3.9. Büyük ölçekli maserasyon

Süre sonunda, karışımın süzülmesiyle drogdan ayrılan sıvı haldeki su ekstresinin 3 litresine, artan polaritelerdeki kloroform, etil asetat ve *n*-butanol çözücüleri sırasıyla uygulanarak fraksiyonlama işlemi yürütüldü. Bu çözücülerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.7’de verildi.

Çizelge 3.7. Fraksiyonların hazırlanmasında kullanılan çözücülerin fizikokimyasal özellikleri (Seidel 2006)

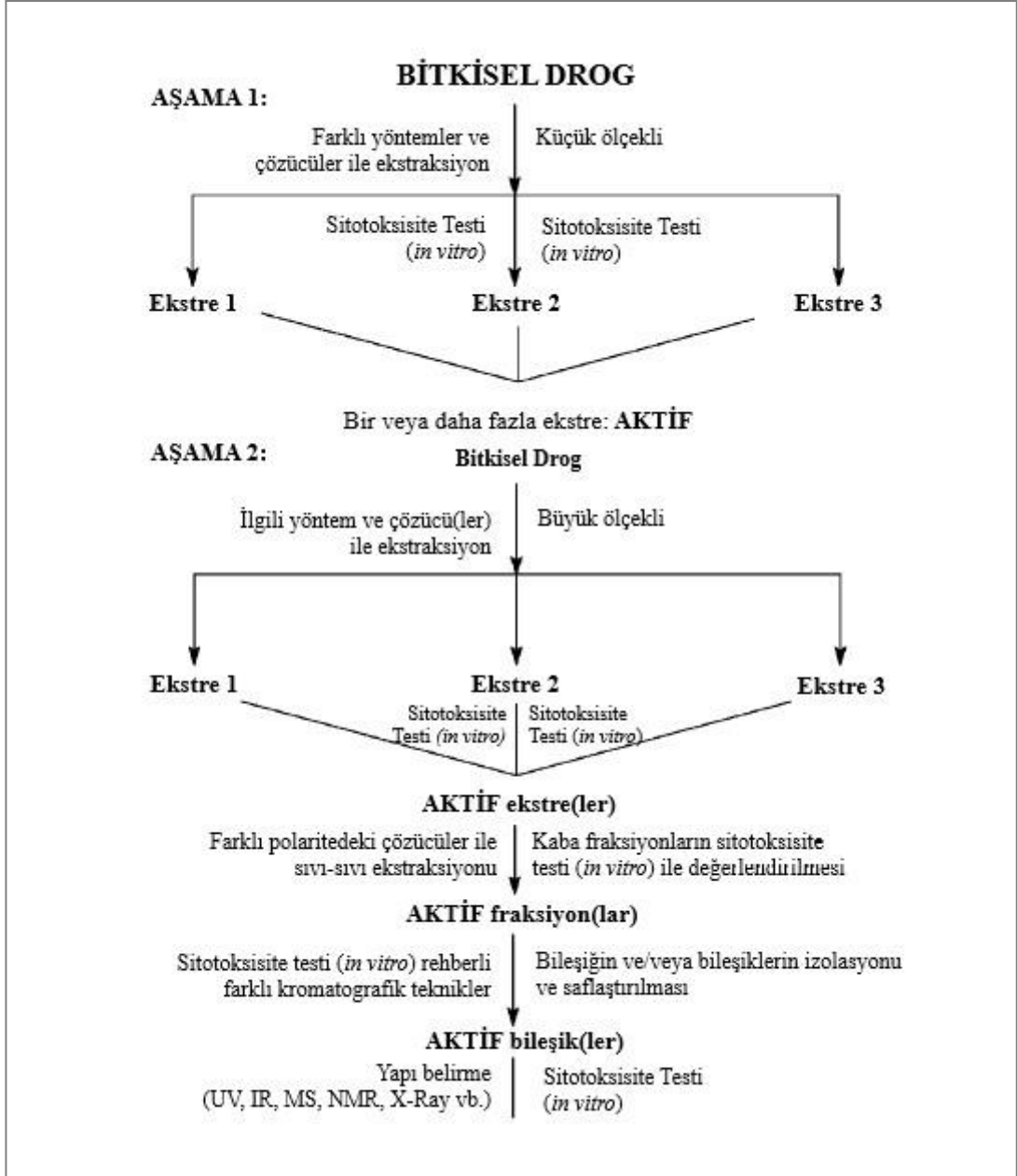
Çözücü	Formül	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Kaynama Noktası (°C)	Polarite İndeksi
<i>n</i> -Butanol	C ₄ H ₉ OH	74,12	118	3,9
Kloroform	CHCl ₃	119,38	61	4,1
Etil asetat	CH ₃ COOC ₂ H ₅	88,11	77	4,4

Fraksiyonlama işlemi için ilk olarak ham su ekstresi ayırma hunisine alındı, üzerine eşit hacimde kloroform eklendi ve karışım iyice çalkalandı. Böylece, iki çözücü moleküllerinin birbiri ile temas etmesi ve ekstredeki etken maddelerin çözücü fazına transfer olması sağlandı. Karışım, ayırma hunisinde iki ayrı faz oluşana kadar bekletildi. Kloroform fazı, sulu fazdan ayrıldı ve kloroform fraksiyonu elde edildi. Bu süreç, her aşamada taze kloroform kullanılarak 3 kez tekrarlandı. Sonra, kalan sulu kısma kloroformdan daha polar özellikte olan etil asetat çözücüsü eklendi ve aynı şekilde ekstre edilerek etil asetat fraksiyonu hazırlandı. Son olarak, sulu kısma daha polar özellikteki *n*-butanol çözücüsü eklendi ve aynı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak *n*-butanol fraksiyonu elde edildi. Kalan sulu kısım ise su fraksiyonu olarak adlandırıldı (Şekil 3.10). Kloroform, etil asetat ve *n*-butanol fraksiyonları rotary evaporatör ile yoğunlaştırıldı, su fraksiyonu ise liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen tüm fraksiyonlar, çalışma süreci boyunca ışıktan korunarak 4 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 3.10. Kaba fraksiyonların hazırlanması

Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı temel alınarak en güçlü sitotoksik etkiyi gösteren ham ekstreten sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi aracılığıyla kaba fraksiyonlama yapıldı. Ekstraksiyon ve fraksiyonlama prosedürleri için planlanan tez çalışması Şekil 3.11’de şematize edildi.



Şekil 3.11. Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı ile gerçekleştirilen çalışma planı (Sarker ve ark. 2006’ dan değiştirilerek alınmıştır)

3.2.5. Hücre Kültürü

İnsan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatlarının (DU 145 ve PC-3) deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltılmasında hücre kültürü tekniklerinden yararlanıldı. DU 145 ve PC-3 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS; ısı ile inaktive edilmiş), %1 L-glutamin solüsyonu (200 mM) ve %1 penisilin (10 000 U/ml) - streptomisin (10 mg/ml) solüsyonu içeren fenol kırmızısı ilaveli Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyerinde kültüre edildi. Bu hücre hatları, aynı büyüme şartları sağlanarak 37 °C'de, %95 nem ve %5 karbondioksit (CO₂) içeren etüvde çoğaltıldı. Hücre proliferasyonu, morfolojisi ve kontaminasyon durumu inverted mikroskop aracılığıyla günlük olarak takip edildi. Besiyerindeki nutrientlerin büyük ölçüde tüketilmesi, hücrelerden toksik atık maddelerinin birikmesi ve besiyerinin pH seviyesinin değişmesine bağlı olarak hücrelerin canlılıklarını kaybetmelerini engellemek için büyüme ortamı, her 48-72 saatte bir taze besiyeri ile değiştirildi.

Hücre hatlarının kültüre edilmesi, *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiğinden dolayı tez çalışması için etik kurul onayına ihtiyaç duyulmamıştır ve söz konusu çalışma etik açıdan hiçbir sakınca doğurmamıştır.

Hücre hatlarının stoktan çıkarılması ve çözündürülmesi

Kriyovial tüpler içerisinde dondurma ortamı (9:1 (h/h) oranında FBS:DMSO karışımından oluşan) ile dondurulmuş olan DU 145 ve PC-3 hücreleri, -80 °C'lik tıbbi soğutma cihazından alınarak sıcak su banyosunda çözündürüldü. 4 °C'nin üzerindeki dimetilsülfoksit (DMSO) hücrelere toksik olduğundan, hücreleri çözündürürken seri bir şekilde çalışıldı. Çözünmüş hücre süspansiyonları, 8-10 ml RPMI 1640 besiyerini (%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin solüsyonları ile desteklenmiş) içeren 15 ml'lik falkon tüplerin içerisine alındı. Hücre süspansiyonlarındaki dondurma ortamından kaynaklı DMSO'ü uzaklaştırmak için falkon tüpler 2000 rpm devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, falkon tüplerin üstünde toplanan süpernatant kısımlar aspire edildi. Falkon tüplerin tabanına çöken her bir hücre peletinin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Ardından, hücrelerin üzerine 7-9 ml besiyeri daha ilave edildi ve tüm hücreler 75 cm²'lik flaslara

aktarıldı. Flasklar, 37 °C'ye ayarlı, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüve alındı ve hücrelerin flask tabanında monolayer (tek tabaka) olarak büyümeleri sağlandı.

Hücre hatlarının pasajlanması ve alt kültürlerin oluşturulması

Hücre hatları %80-90 oranında konfluent olduklarında (başka bir deyişle, hücreler flask yüzeyini %80-90 oranında kapladıklarında), canlılıklarını ve çoğalma yeteneklerini korumaları için tripsinizasyon işlemi ile pasajlandı. Pasajlama işlemi için, ilk olarak besiyeri aspire edilerek flasklardan uzaklaştırıldı. Flask içerisinde besiyeri kaynaklı serum (FBS) kalıntılarının bulunması, tripsinin aktivitesini engelleyebilmektedir. Bu nedenle, hücreleri serumdan arındırmak için flaskların içerisine 2 ml 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (phosphate buffered saline, PBS, pH: 7,4) ilave edildi ve hücre yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS aspire edildikten sonra, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 1-1,5 ml %0,25 tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu ilave edildi ve inkübasyon için 5 dakika 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde tutuldu. Süre sonunda, inverted mikroskopla flask yüzeyinden ayrıldığı kontrol edilen hücrelerin üzerine, tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak için 10 ml besiyeri ilave edildi. FBS, tripsin-EDTA aktivitesi üzerinde inhibe edici etki gösterdiği için, tripsinizasyon işlemi durdurmak amacıyla kullanılan besiyerinde mutlaka FBS bulunmalıdır. Flaskların içerisindeki hücreleri birbirinden ayırmak ve kümelenmelerini önlemek için, hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi. Homojenize hücre süspansiyonları, daha sonra 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, süpernatant kısımlar uzaklaştırıldı ve peletler, hücre yoğunluğuna uygun miktardaki taze besiyerleriyle homojenize edildi. Hücre süspansiyonları, oluşturulacak alt kültür sayısına göre her biri 8-10 ml besiyeri içeren yeni 75 cm²'lik flasklara bölündü. Alt kültürler, çoğalmaya devam edebilmeleri için 37 °C'ye ayarlı, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüve kaldırılarak inkübasyona bırakıldı.

Hücre hatlarının dondurulması ve saklanması

Çalışmayı güvence altına almak ve ihtiyaç duyulduğunda geriye dönebilmek için hücrelerin dondurularak yedeklenmesi ve uzun vadeli saklanması gerekmektedir. Bu amaçla, hücre hatları DMSO gibi bir kriyoprotektan madde içeren ortam kullanılarak

donduruldu ve stoklandı. Hücre hatları %80-90 oranında konfluent oldukları zaman, hücreler dondurulmak üzere standart protokol takip edilerek tripsinize edildi. Özetle; flastaki besiyeri aspire edildi, hücreler 1X PBS ile yıkandı ve 37 °C'ye ayarlı etüvde 5 dakika boyunca %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile inkübe edildi. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerlerine besiyeri eklendikten sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın uzaklaştırılmasıyla elde edilen pelet üzerine, hücre yoğunluğu dikkate alınarak FBS:DMSO (9:1, *h/h*) karışımından oluşan dondurma ortamı eklendi. Pipetajla homojenize edilen hücre süspansiyonu, her bir kriyoviyal başına 800 µl hacimde $1-2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde buz üzerinde bekletilen soğuk kriyoviyal tüplere bölündü. Hemen ardından, kriyoviyal tüpler uzun dönemli saklama için -80 °C'lik tıbbi soğutma cihazına kaldırıldı. Dondurma süreci, hücrelere zarar vermemek adına optimum hızda (ne çok yavaş ne de çok hızlı) gerçekleştirildi. DMSO, ışığa duyarlı olduğu için hücrelerin dondurulması işlemi karanlıkta yürütüldü.

3.2.6. Tripan mavisi boyası ile canlı hücrelerin sayılması

Bu çalışma kapsamında, rutin olarak hücre canlılıklarının tayin edilmesi ve hücre süspansiyonundaki canlı ve/veya ölü hücre sayılarının tespit edilmesi için tripan mavisi boyası kullanıldı. Tripan mavisi ile boyama, hücre membran bütünlüğü prensibine dayanmaktadır. İntakt (hasar görmemiş) hücre membranlarına sahip canlı hücrelerde, tripan mavisi boyası hücre membranına nüfuz edemez ve sitoplazmaya giremez. Tripan mavisi boyası, hasar görmüş ve bundan dolayı hücre membranı geçirgenliği olan ölü hücrelerde ise porlu hücre membranından geçer, sitoplazmaya girer ve intraselüler proteinlere bağlanır. Bu nedenle, mikroskop altında incelendiğinde ölü hücreler büyük, şişmiş ve mavi renkli olarak, canlı hücreler ise küçük, yuvarlak ve refraktil olarak (boyayı almadıklarından dolayı) görülmektedir (Doyle ve ark. 1995, Strober 2001, Jain ve ark. 2017).

Bu çalışmada planlanan tüm testlerde, tripan mavisi boyası kullanılarak hemositometre ile hücre sayımı yürütüldü. Bu amaçla, ilk olarak DU 145 ve PC-3 hücreleri tripsinizasyon protokolü takip edilerek flask yüzeyinden kaldırıldı. Santrifüjden sonra, peletler RPMI 1640 besiyeri ile sulandırıldı ve pipetaj yapılarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edildi. Bu hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak bir eppendorf tüpe

aktarıldı ve üzerine 20 µl %0,5 (*a/h*) tripan mavisi solüsyonu ('Trypan blue solution') eklendi. Birkaç kez pipetaj yapılarak hücre süspansiyonunun boya ile iyice karışması sağlandı. Daha sonra, bu karışımdan 10 µl alınıp Neubauer tip hemositometrenin sayım bölmelerinden birine yüklendi. Ardından, inverted mikrokopta x10 objektif kullanılarak iki köşe karede canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı almadığı için parlak renkte görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi. Sayım tamamlandıktan sonra, 1 ml besiyerindeki toplam canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı} = (\text{iki karede sayılan toplam hücre sayısı} / 2) \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

3.2.7. Sitotoksik etkiyi belirlemek üzere hücrelerin ekimi

Hücre ekiminden önce, optimizasyon çalışması yapılarak sitotoksisite deneylerinde kullanılacak standart hücre sayısı tespit edildi. Ayrıca, bu çalışma sayesinde uygulanacak sitotoksisite testleri de standardize edildi. Standart hücre sayısı belirlendikten sonra, sitotoksisite testleri için deney kuruldu. Öncelikle, canlı hücre sayısı belirlenen süspansiyondan gerekli besiyeri hacmine ve hücre sayısına göre seyreltme yapıldı. Daha sonra, DU 145 ve PC-3 hücreleri 100 µl RPMI 1640 besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakalara ekildi. Test edilen her konsantrasyon için 3 tekrarlı (triplicate) hücre ekimi yapıldı. Ayrıca, negatif kontrol (maksimum canlılık, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 100 µl RPMI 1640 besiyeri içerisinde 5×10^3 /kuyucuk yoğunlukta hücre ekimi gerçekleştirildi. Kör (blank) kuyucuklarına ise sadece 100 µl RPMI 1640 besiyeri (hücre içermeyen) ilave edildi. Ardından, ekilen hücreler inverted mikroskopta kontrol edildi, yapışmalarını ve büyümelerini sağlamak için 24 saat boyunca 37 °C'ye ayarlı, %5 CO₂ içeren nemli etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.2.8. Test bileşiklerinin hazırlanması ve hücrelere uygulanması

Ham ekstrelerin ve kaba fraksiyonların hazırlanması

4 °C’de saklanan ham ekstreler ve kaba fraksiyonlar, DMSO içerisinde ultrasonik banyo yardımıyla çözdürüldü ve 100 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyonlar hazırlandı. Bu stok solüsyonlar, her uygulama öncesi taze olarak hazırlandı ve 0,2 µm’lik steril filtreden geçirildi. Elde edilen stok solüsyonlar, çalışma sonuna dek ışıktan muhafaza edildi.

Unotein B (Oenothain B)’nin hazırlanması

Unotein B, *Epilobium* cinsine ait türlerde bulunan polifenol bileşiklerinden biridir (Granica ve ark. 2012). Birçok çalışmada, unotein B’nin antikanser aktivite sergilediği bildirilmiştir (Miyamoto ve ark. 1987, 1993a,b, Aoki ve ark. 1995, Sakagami ve ark. 2000, Kiss ve ark. 2006). Sigma-Aldrich firmasından temin edilen ‘Oenothain B analytical standard’, bu çalışmada etken madde olarak kullanıldı. Toz haldeki unotein B maddesi (molekül ağırlığı: 1569,08 g/mol), DMSO içerisinde çözdürülerek 6 mg/ml (veya 3,82 mM) konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Bu stok solüsyon, her uygulama öncesi taze olarak hazırlandı ve çalışma sonuna dek ışıktan muhafaza edildi.

Paklitaksel (Paclitaxel, Taxol®)’in hazırlanması

Prostat kanseri tedavisinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılan paklitaksel, deneysel çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu bağlamda, ham ekstrelerin, kaba fraksiyonların ve unotein B’nin her iki hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri paklitakselin sitotoksik etkisiyle karşılaştırıldı. Sigma-Aldrich firmasından temin edilen toz haldeki paklitaksel (molekül ağırlığı: 853,91 g/mol), DMSO içerisinde çözdürülerek 1 mg/ml (veya 1,171 mM) konsantrasyonda ana stok solüsyonu hazırlandı ve alikotlanarak -80 °C’de saklandı. Ana stok solüsyonu, RPMI 1640 besiyeri (FBS, L-glutamin ve penisilin-streptomisin bileşenlerini içermeyen) içerisinde dilüe edilerek 8,5 µg/ml (veya 10 µM)’lik çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu çalışma solüsyonu, her uygulama öncesi taze olarak hazırlandı ve çalışma sonuna dek ışıktan muhafaza edildi.

Test bileşiklerinin stok solüsyonlarından RPMI 1640 besiyeri ile gerekli seyreltmeler yapıldı. Böylece konsantrasyonları; ekstreler için 3,13-200 µg/ml aralığında, fraksiyonlar için 1,56-100 µg/ml aralığında, unotein B için 2,5-160 µg/ml aralığında ve paklitaksel (pozitif kontrol) için 0,001-0,5 µg/ml aralığında değişen final dozları hazırlandı. Seyreltme işlemleri sonunda, DMSO'in son kültür ortamındaki konsantrasyonu ≤%0,1'dir. DU 145 ve PC-3 hücrelerinin bu konsantrasyonu tolere edebildikleri ön çalışmalarda doğrulanmış olup hücre canlılıkları üzerinde hiçbir olumsuz etki görülmemiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra, final konsantrasyonlardaki test bileşikleri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde DU 145 ve PC-3 hücrelerine uygulandı. Test bileşikleri eklendikten sonra, tüm kuyucuklardaki son hacimlerin 200 µl olması için negatif kontrol ve kör için ayrılan kuyucuklara 100 µl besiyeri ilave edildi. Uygulamayı takiben hücreler, 37 °C'ye ayarlı %5 CO₂'li etüvde 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 96 kuyucuklu mikropalakalarda, test bileşiklerinin tüm dozları, negatif kontrol ve kör için 3 farklı kuyucuk (3 tekrar) kullanıldı.

3.2.9. Sitotoksik etkinin belirlenmesi

E. hirsutum ekstrelerinin, kaba fraksiyonlarının, unotein B'nin ve paklitakselin prostat kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla *in vitro* hücre canlılık deneyleri yürütüldü. Çalışma kapsamında, hücre canlılığını farklı parametrelere göre ölçen kolorimetrik testler (SRB ve XTT testleri) kullanıldı. Böylece, farklı türdeki sitotoksik analizlerle daha güvenilir sonuçların elde edilmesi amaçlandı.

Sülforodamin B (SRB) hücre canlılık testi

Sülforhodamin B (SRB) hücre canlılık testi, kültürdeki hücrelerin protein içeriğinin ölçülmesini sağlayan bir testtir (Skehan ve ark. 1990). Bu testin prensibi; asidik şartlar altında SRB boyasının (iki sülfonik gruplu, pembe renkli aminoksanten boyası), trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilmiş hücre proteinlerinin bazik aminoasitlerine bağlanmasına, bazik şartlar altında ise hücrelerden ayrılmasına dayanmaktadır. Oluşan renk değişiminin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi, hücresel protein miktarı ve dolayısıyla hücre canlılığı ve/veya sitotoksikite hakkında bilgiler sunmaktadır (Papazisis ve ark. 1997, Mathen ve Hardikar 2010).

İnkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saatlik) sonunda, test bileşiklerinin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki potansiyel sitotoksik aktiviteleri SRB hücre canlılık testiyle değerlendirildi. SRB testi, Skehan ve ark. (1990) tarafından tanımlanan protokolde küçük değişiklikler yapılarak yürütüldü. İlk olarak, hücresel proteinleri fikse etmek için 96 kuyucuklu mikropolanın her kuyucuğuna 50 µl %50'lik (*a/h*) soğuk TCA (steril distile su içinde çözündürülmüş) solüsyonu eklendi ve TCA solüsyonunun her kuyucuktaki final konsantrasyonun %10 olması sağlandı. TCA ilavesi, fiksasyon sırasında hücre kaybı riskini en aza indirmek için dikkatlice yapıldı. Daha sonra, 4 °C'de en az 1 saat boyunca fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyon süresi tamamlandıktan sonra, mikropolaka ters çevrilerek içeriği boşaltıldı. TCA solüsyonunu, besiyerini, metabolitleri ve serum proteinleri uzaklaştırmak için bütün kuyucuklar 5 defa deiyonize su ile yıkandı. Her yıkama sonunda, mikropolaka ters çevrilerek kuyucuklardaki deiyonize su boşaltıldı. Yıkama işlemini takiben mikropolaka kurumaya bırakıldı. Ardından, mikropolanın her kuyucuğuna 50 µl %0,4'lük (*a/h*) SRB boyası ('Sulphorodamine B sodium salt', %1 asetik asit içinde çözündürülmüş) eklendi, hücrelerin boyanmasına izin vermek için oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Boyama süresinin sonunda, mikropolaka ters çevrilerek SRB boyası döküldü. Bağlanmayan boyayı uzaklaştırmak için, bütün kuyucuklar 5 defa %1'lik (*h/h*) asetik asit çözeltisi (steril distile su ile hazırlanmış) ile yıkandı. Her yıkama sonunda, mikropolaka ters çevrilerek kuyucuklardaki asetik asit boşaltıldı. Kuyucuklar tamamen kurduktan sonra, hücre proteinlerine bağlanan boyayı çözmek amacıyla, her kuyucuğa 150 µl 10 mM tamponlanmamış Tris bazı (pH: 10, steril distile su içinde çözündürülmüş) ilave edildi. 10 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde bekletilen mikropolanın optik yoğunluğu, mikropolaka okuyucu kullanılarak 595 nm dalga boyunda ölçüldü ve kantitatif absorban değerleri elde edildi.

XTT hücre canlılık testi

XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit) hücre canlılık testi; tetrazolyum tabanlı, hızlı, kullanımı kolay ve güvenilir bir testtir. XTT reaktifi, metabolik olarak aktif hücreler tarafından turuncu renkli, suda çözünür formazan kristallerine indirgenir. Oluşan formazan yoğunluğunun spektrofotometrik olarak doğrudan ölçülmesiyle canlılığın değerlendirilmesi mümkün

olmaktadır (Scudiero ve ark. 1988). Bu sayede; XTT testi, hücre canlılığı/sitotoksiste hakkında hassas ve doğru bilgi sunmaktadır (Berridge ve ark. 1996, Tokur ve Aksoy 2017).

Test bileşiklerinin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkileri, XTT hücre canlılık testiyle analiz edildi. Deney, 'Cell Proliferation XTT' kit içeriğinde bulunan ve firma tarafından önerilen protokole göre yürütüldü. Test bileşikleriyle tedavi süresi (24, 48 ve 72 saatlik) tamamlandıktan sonra, XTT reaktifi ve PMS (N-metil dibenzopirazin metil sülfat) içeren aktivasyon solüsyonu 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözdürüldü. Çözünmelerinden sonra, 5 ml XTT reaktifine 100 µl aktivasyon solüsyonu eklenerek bir mikrolpaka (96 kuyucuk) için yeterli bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Test bileşiklerini içeren besiyeri mikrolpakanın tüm kuyucuklarından aspire edildi, hemen ardından her kuyucuğa 100 µl RPMI 1640 besiyeri (FBS, L-glutamin ve penisilin-streptomisin bileşenlerini içeren) eklendi. Daha sonra, taze olarak hazırlanmış reaksiyon karışımı 50 µl/kuyucuk olacak şekilde hücrelerin üzerine ilave edildi. Hücreler, 4 saat boyunca 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben oluşan renk değişimi miktarı (optik yoğunluk), mikrolpaka okuyucu kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü. 'Background' absorbans değerleri (kör) ise, 655 nm dalga boyunda ölçüldü ve 450 nm'de kaydedilen değerlerden çıkarılarak kantitatif absorbans değerleri elde edildi. XTT kimyasalı ışığa duyarlı olduğundan tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirildi.

Hücre canlılığının hesaplanması

Hücre canlılık testlerinden elde edilen ham verilerin işlenmesi, Microsoft Office Excel programı kullanılarak yapıldı. Test bileşikleri uygulanmamış kontrol hücreleri (canlılığın %100 olarak kabul edildiği) referans alınarak test bileşikleri uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{ortalama Abs}_{\text{bileşik}} - \text{ortalama Abs}_{\text{kör}}) / (\text{ortalama Abs}_{\text{kontrol}} - \text{ortalama Abs}_{\text{kör}})$$

(Abs: Okuma sonucu elde edilen absorbans değerlerini ifade etmektedir.)

Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, Microsoft Office Excel programında doza karşı yüzde canlılık grafikleri çizildi. Tahmin fonksiyonu kullanılarak, bu grafiklerden test bileşiklerinin IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.10. Kombinasyon analizi

Çalışma kapsamında araştırılan test bileşiklerinin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri SRB ve XTT hücre canlılık testleriyle tarandıktan sonra, en aktif bileşiğin maserasyon yöntemiyle hazırlanan su ekstresi olduğu tespit edildi. Bu bulgudan hareketle, ekstre ile paklitaksel kombinasyonunun hücre canlılıkları üzerindeki muhtemel sinerjik etkisinin araştırılmasına karar verildi. Kombinasyon çalışmasında kullanılması planlanan ekstre ve paklitaksel dozları, hücre canlılık testlerinden elde edilen sonuçlar dikkate alınarak seçildi. Bu amaçla, DU 145 ve PC-3 hücreleri 100 µl RPMI 1640 besiyeri içinde, 5×10^3 hücre/kuyucuk yoğunlukta ve 3 tekrarlı olarak 96 kuyucuklu mikropalakaya ekildi. 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 24 saatlik inkübasyondan sonra, ekstre ile paklitakselin Çizelge 3.8'de gösterilen doz kombinasyonları 100 µl besiyeri içinde hücrelere uygulandı. Negatif kontrol için 200 µl besiyeri içinde kültüre edilen hücreler, kör çinse sadece 200 µl besiyeri kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise paklitaksel kullanıldı. 24, 48 ve 72 saat süren kombinasyon tedavisi sonrası, hücrelerin canlılıkları SRB ve XTT testleriyle değerlendirildi. Verilerin işlenmesi, hücre canlılık yüzdelerinin ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması daha önce açıklanan formüle göre yapıldı.

Çizelge 3.8. Kombinasyon analizi için oluşturulan tedavi grupları

Tedavi Grupları	Tedavi Dozları (µg/ml)		
	Ekstre (E)	Paklitaksel	
1. Negatif Kontrol (Yalnızca hücreler)	-	-	
2. Pozitif Kontrol (Hücreler + Paklitaksel)	-	0,001	
	-	0,002	
	-	0,004	
3. Test Grubu (Hücreler + Ekstre)	33	-	
	66	-	
	99	-	
4. Kombinasyon Grubu (Hücreler + Ekstre + Paklitaksel)	33	+	0,001
	33	+	0,002
	33	+	0,004
	66	+	0,001
	66	+	0,002
	66	+	0,004
	99	+	0,001
	99	+	0,002
	99	+	0,004

3.2.11. Hücre morfolojisinin değerlendirilmesi

Ham ekstrelerin, kaba fraksiyonların, unotein B'nin ve paklitakselin hücre morfolojileri ve canlılıkları üzerindeki etkileri, inverted mikroskopta hücre canlılık testleriyle eş zamanlı olarak analiz edildi. Test bileşikleri ve ayrıca kombinasyon grupları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon periyodu tamamlandığında, hücre canlılık testlerini çalışmadan önce DU 145 ve PC-3 hücreleri inverted mikroskobun x10'luk büyütmesi kullanılarak fotoğraflandı. Hücrelerin adezyon durumları, konfluensi seviyeleri, şekil ve boyut değişimleri, negatif kontrol hücreleri ile ve ayrıca DMSO (%0,1 konsantrasyonda) ile muamele edilmiş hücre grubu ile kıyaslandı. Böylece, test edilen bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin mikroskobik olarak da doğrulanması sağlandı.

3.2.12. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerinin ölçülmesi

Apoptoz sırasında, hücrelerin sitoplazmik ve nükleer iskeleti yeniden yapılanmakta ve hücre morfolojisi önemli değişikliklere uğramaktadır (Oberhammer ve ark. 1994, van Engeland ve ark. 1997). Bu süreç boyunca, sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen kaspazlar birçok hücrel proteininin yıkılmasına yol açmaktadır. Epitelyal hücrelerde, kaspazların en önemli substratlarından biri de hücre iskeletinde yer alan ve ara filament protein ailesine ait sitokeratin 18 (cytokeratin, CK18)'dir. Apoptoz geçiren hücrelerde; CK18, kaspazlar tarafından Aspartat 238 (Asp²³⁸) ve Aspartat 396 (Asp³⁹⁶) noktasından kırılarak CK18Asp396 neo-epitopu (M30 antijeni) oluşmaktadır. Apoptotik hücrelerden serum veya plazmaya salınan bu neo-epitopun, monoklonal bir antikor olan M30 tarafından tanınmasıyla apoptozun erken evreleri saptanmış olmaktadır (Leers ve ark. 1999, Kramer ve ark. 2004, Schutte ve ark. 2004, van der Kuip ve ark. 2006).

Bu prensibe dayanarak, apoptotik hücre kültürü süpernatantlarındaki kaspazla kırılmış CK 18 fragmentlerini ölçmek için immünohistokimyasal yöntemlerden biri olan M30 ELISA testi kullanıldı. M30 ELISA, katı fazlı sandviç (iki yönlü) enzim immünosorbent testidir. Bu test ile apoptoz miktarının belirlenmesi, CK 18'in ölçülmesinden kaynaklandığı için kullanılan hücre hatlarının bu proteini eksprese etmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin, CK 18 proteini için majör ekspresyon gösterdiği literatürde bildirilmiştir (Sherwood ve ark. 1990). Bu sebeple, kültüre edilen DU 145 ve PC-3 hücrelerinin M30 ELISA testiyle analiz edilmesi uygundur. Bu amaçla; DU 145 ve PC-3 hücreleri, sayılarak 200 µl RPMI 1640 besiyeri içinde, 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 96 kuyucuklu mikropalakaya ekildi. 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 24 saatlik inkübasyonu takiben, tüm kuyucuklardan hücrelere zarar vermeden 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. XTT ve SRB testi sonuçlarına göre, 48 saatlik periyotta DU 145 ve PC-3 hücreleri için elde edilen ortalama IC₅₀ dozları hücrelere uygulanacak bileşik konsantrasyonları olarak belirlendi (Çizelge 3.9). Besiyeri içinde dilüe edilip istenilen dozlarda hazırlanan test bileşikleri, tüm kuyucuklardaki hücrelere 100 µl hacimde uygulandı. Negatif kontrol için sadece besiyeri içinde kültüre edilen hücreler kullanıldı ve ilgili kuyucuklara 100 µl besiyeri ilave edildi. Hücrelerde apoptozu indüklediği bilinen paklitaksel ise pozitif kontrol

olarak kullanıldı. Test bileşikleri uygulandıktan sonra, hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle 37 °C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübasyona tabi tutuldu.

Çizelge 3.9. DU 145 ve PC-3 hücre hatları için elde edilen ortalama IC₅₀ dozları

	Ortalama IC ₅₀ Dozları (µg/ml)	
	DU 145	PC-3
Ekstre (E)	90,65	113,40
Fraksiyon (E2)	114,62	77,23
Unotein B	122,31	86,46
Paklitaksel	0,0045	0,015
Ekstre (E) + Paklitaksel kombinasyonu	90,65 + 0,0045	113,40 + 0,015

Süre sonunda hücreleri lizis etmek için 200 µl besiyeri içindeki hücrelerin üzerine doğrudan 10 µl %10’luk (*h/h*) Nonidet P-40 (NP-40, steril distile su içinde hazırlanmış) solüsyonu eklendi ve mikrolplaka çalkayıcı kullanılarak 600 rpm’de ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca lizis işlemi gerçekleştirildi. Lizis tamamlandıktan sonra, hücre lizatları pipetaj yapılarak kuyucuklardan toplandı ve 2000 rpm’de 30 saniye süreyle santrifüj yapıldı. Bu sayede, ölü hücrelerden süpernatantlara transfer olan kaspazla kırılmış CK 18 fragmentlerinin ölçülmesi, ‘M30 CytoDeath™ ELISA kit’ içeriğine ve üreticinin talimatlarına göre yürütüldü. Analiz, her örnek ve/veya standart için iki tekrarlı (dublike) olarak ve oda sıcaklığında (24±3 °C) gerçekleştirildi. Deney öncesi, tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve kullanmadan önce vorteks ile karıştırıldı. Yüzeyi CK 18’i tanıyan fare monoklonal M6 antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu mikrolplakanın her kuyucuğuna 25 µl süpernatant ve standart eklendi. Hemen ardından, tüm kuyucuklara 75 µl M30 CytoDeath horseradish peroksidaz (horseradish peroxidase, HRP) konjugat solüsyonu (HRP enzimi ile konjuge fare monoklonal M30 antikoru) eklendi ve mikrolplaka çalkalayıcı kullanılarak 600 rpm’de, oda sıcaklığında 4 saat süreyle inkübe edildi. M6 antikoru/M30 antijeni/enzim işaretli M30 antikoru sandviç kompleksinin oluşmasını takiben, bağlanmayan fazla konjugatı uzaklaştırmak için manual olarak yıkama yapıldı. İnkübasyon solüsyonu mikrolplakadan aspire edildi ve tüm kuyucuklar 250 µl yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Daha sonra, her kuyucuğa 200 µl 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 20±1 dakika boyunca inkübe edildi. Reaksiyona bağlı olarak gerçekleşen renk oluşumu, her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu (1 M sülfürik asit (H₂SO₄) içeren)

beklenmesiyle durduruldu. Ardından, mikropilaka okuyucuda 450 nm'de absorbanans belirlendi. Oluşan renk şiddeti, örnekteki M30 antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

M30 antijen konsantrasyonunun hesaplanması

M30 CytoDeath™ ELISA sonuçları Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplandı. Ölçülen absorbananslara karşı bilinen konsantrasyonlardan standart bir eğri grafiği çizildi ve eğri denklemi oluşturuldu. Bu grafik ve denklemden yararlanarak örneklerdeki M30 antijen miktarları hesaplandı. M30 antijen konsantrasyonları litre başına birim (U/L) olarak ifade edildi.

3.2.13. Floresan mikroskobunda hücre ölüm modunun belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında; test bileşiklerine maruz kalmış hücrelerin ölüm modları, morfoloji tabanlı testlerden biri olan floresan mikroskopi ile değerlendirildi. Bu yöntemin prensibi, floresan boyaların DNA'ya bağlanarak kromatini ve nükleusu görünür kılmasıdır. Böylece, floresan mikroskop aracılığıyla hem canlı/ölü hücre ayrımı yapılabilmektedir hem de hücrelerin ölüm şekilleri tespit edilebilmektedir (Ulukaya 2003, Ulukaya ve ark. 2011).

Floresan boyama çalışmasında, hücre membranından nüfuz ederek canlı ve ölü tüm hücreleri boyayan Hoechst 33342 floresan boyası kullanıldı. Ayrıca, ölü hücreleri canlı hücrelerden ayırt etmek için Hoechst 33342 boyası, sadece ölü hücreleri boyayabilen Propidyum İyodür boyası ile birlikte kullanıldı. Propidyum iyodür boyası, hücre membranı bütünlüğüne bağlı olarak hücre canlılığının tespitine olanak sağlamaktadır. Bu boya, intakt yani bütünlüğü bozulmamış membrana sahip canlı hücrelere nüfuz edemediği için canlı hücreler propidyum iyodür boyası ile boyanmamaktadır. Bunun aksine; propidyum iyodür boyası, bütünlüğü bozulmuş, hasar görmüş membrana sahip hücrelere girerek tüm ölü hücreleri (primer nekrotik ve sekonder nekrotik/geç apototik) boyamaktadır. Bu bağlamda, ikili boyama yöntemiyle hücre canlılığının ve ölüm modunun tespiti nükleus morfolojisi dikkate alınarak aşağıdaki kıstaslara göre yapıldı. Bu kıstaslar Çizelge 3.10'da özetlendi (Ulukaya 2003, Ulukaya ve ark. 2011).

Canlı hücreler: Nükleusları normal boyuttadır. Hoechst 33342 boyasıyla boyanırlar, ancak propidyum iyodür boyasıyla boyanmazlar.

Erken apoptotik hücreler: Apoptozun erken safhasındaki hücrelerde membran bütünlüğü korunduğu için bu hücreler propidyum iyodür boyasıyla boyanmazlar. Fakat hücreler Hoechst 33342 boyası için pozitifler. Kromatin yoğunlaşması, piknotik ve/veya fragmente nükleus gibi apoptotik değişikliklerin varlığı, erken apoptotik hücrelerin teşhisinde en önemli bulgudur.

Geç apoptotik/sekonder nekrotik hücreler: Sekonder nekroz, apoptozun geç safhasıdır. Bu evrede, hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğundan hücreler propidyum iyodür boyası için pozitifdir. Ayrıca, hücreler Hoechst 33342 boyasıyla da boyanırlar. Bunun yanı sıra, geç apoptotik veya sekonder nekrotik hücrelerde, apoptoza özgü belirteçler de mevcuttur.

(Primer) Nekrotik hücreler: Hem propidyum iyodür boyası hem de Hoechst 33342 boyası ile boyanarak ölü oldukları belirlenen hücrelerin nükleuslarında apoptotik görünüm yoktur. Apoptotik hücrelerden farklı olarak, nekrotik hücrelerin nükleusları canlı hücrelerin nükleuslarından göreceli olarak daha büyüktür. Nekrotik hücrelerin gerçekleştirdiği floresan ışımaya ilk başta normaldir, ancak nekroz süreci ilerledikçe hücrelerin lizise uğramalarından dolayı floresan ışımaya yoğunluğu azalır.

Çizelge 3.10. İkili boyama yöntemiyle hücre ölüm modunun tespit edilmesi

	Hoechst 33342	Propidyum İyodür	Apoptotik Morfoloji
Canlı Hücreler	+	-	-
Erken Apoptotik Hücreler	+	-	+
Geç Apoptotik/Sekonder Nekrotik Hücreler	+	+	+
(Primer) Nekrotik Hücreler	+	+	-

+, boyanma durumu; -, boyanmama durumu ifade etmektedir.

Test bileşiklerinin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki etkilerini ikili boyama yöntemiyle saptamak amacıyla ilk olarak, tripan mavisi boyası kullanılarak Neubauer hemositometresinde canlı hücre sayımı yapıldı. Daha sonra, 6 kuyucuklu mikropolanın

kuyucuklarının içlerine steril cam lameller (24 mm x 24 mm) yerleştirildi. DU 145 (1×10^5 hücre/kuyucuk) ve PC-3 ($7,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk) hücreleri, 1,5 ml RPMI 1640 besiyeri içinde 3 tekrarlı olarak doğrudan cam lamellerin üzerine ekildi. 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde 24 saatlik inkübasyonu takiben, hücrelere zarar vermeden kuyucuklardaki tüm besiyeri aspire edildi. Beklemeden kuyucuklara 1,5 ml taze besiyeri ilave edildi. Ardından, XTT ve SRB yöntemleriyle test bileşikleri için belirlenen ortalama IC₅₀ dozları (bkz. Çizelge 3.9), 1,5 ml besiyeri içinde cam lameller üzerindeki hücrelere uygulandı. Negatif kontrol için sadece besiyeri içinde kültüre edilen aynı sayıdaki hücreler kullanılırken, pozitif kontrol için paklitaksel kullanıldı. Ardından, hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C’lik etüvde 48 saat süreyle test bileşiklerine maruz bırakıldı. İkili boya karışımını hazırlamak üzere, Hoechst 33342 (200 µg/ml’lik ana stok) ve propidyum iyodür (‘Propidium iodide’, 100 µg/ml’lik ana stok) boyaları 1X PBS solüsyonu (Ca ve Mg içermeyen) içinde seyreltildi. Son konsantrasyonları; Hoechst 33342 boyası için 3 µg/ml, propidyum iyodür boyası için 7 µg/ml olan çalışma solüsyonları elde edildi. 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde 48 saatlik tedavi sona erdiğinde, hücrelere zarar vermeden kuyucuklardaki tüm besiyeri uzaklaştırıldı. Sonra, cam lamellerin üzerindeki hücreler 1X PBS solüsyonu ile yıkandı. İkili boya karışımından 250 µl alınarak doğrudan hücrelerin üzerine uygulandı ve 15 dakika boyunca 37 °C’de karanlık inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda, cam lamel üzerine 10-20 µl daha boya karışımı eklenerek steril cam lam (26 mm x 76 mm) ile kapatıldı. Floresan ataçmanlı inverted mikroskopun x20 büyütmesi kullanılarak aynı alandaki hücrelerin fotoğrafları çekildi. Hücre ölüm modları ‘Kameram 21 (Mikrosistem)’ yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.2.14. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Test bileşiklerinin, hücre ölüm yollarında (apoptoz, nekroz ve otofaji) görevli genlerin ekspresyon profili üzerindeki etkileri, kantitatif gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. Kantitatif gerçek zamanlı PZR, nükleik asit dizilerinin kantifikasyonu ile gen ekspresyonunun gerçek zamanlı olarak saptanmasında kullanılan bir yöntemdir (Rodríguez ve ark. 2015, Hawkins ve Guest 2017). Bu yöntemde, reaksiyon boyunca PZR ürünü yapısına dâhil olan floresan boyalar kullanılarak DNA miktarı izlenmektedir. Floresan sinyaldeki artış, PZR ürünü miktarı ile doğru orantılıdır (Anonim 208).

Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde; SYBR[®] Green gibi spesifik olmayan boyalar veya hidrolizis problemleri, moleküler işaretler, floresan rezorans enerji transferi (FRET) problemleri ve Scorpions primerleri gibi floresan boyalara bağlı sekansa özgü primerler/problar kullanılabilir (Rodriguez-Lazaro ve Hernandez 2013).

Hidrolizis problemleri, kantitatif gerçek zamanlı PZR protokollerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rodríguez ve ark. 2015). Bu problemler, iki etiket ile işaretlidir. Bunlardan; 5' ucundaki floresan 'haberci' (raportör, reporter) molekül, 3' ucundaki ise 'baskılayıcı' (quencher) moleküldür. Prob intakt iken haberci moleküle yakın olan baskılayıcı molekül, haberci molekülün floresan sinyal oluşturmasını engellemektedir. PZR reaksiyonu sırasında, primer uzaması probun hedef diziye bağlandığı noktaya geldiği zaman, Taq polimeraz enziminin 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi hidrolizis probunu yıkar. Böylece, haberci ve baskılayıcı moleküller birbirinden ayrılır ve serbest hale geçen haberci molekül floresan sinyal oluşturur. Her PZR döngüsü boyunca, hedef dizi miktarı arttıkça daha fazla prob yıkılır ve floresan sinyal miktarı artar. Dolayısıyla, floresan sinyal şiddeti örnekte bulunan ampikon miktarı ile doğru orantılıdır. Sonuç olarak; kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemlerinden prob tabanlı olanları, boya tabanlı olanlarından daha spesifik olduğu için analizlerde daha çok tercih edilmektedir. Bu amaçla, hücre ölüm yollarında kilit rol üstlenen bazı genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler, prob tabanlı PZR yöntemiyle analiz edildi (Holland ve ark. 1991, Livak ve ark. 1995, Hawkins ve Guest 2017, Neidler 2017, Anonim 2018).

RNA izolasyonu

Hücrelerden ribonükleik asit (RNA) izolasyonu, 'innuPREP RNA mini kit' kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle, DU 145 ve PC-3 hücreleri sayılarak 75 cm²'lik flasklara 7 ml RPMI 1640 besiyeri içinde 5x10⁶ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin flask yüzeyine tutunmalarını sağlamak üzere, tüm flasklar 8 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. Tüm hücrelerin flask yüzeyine yapıştıkları belirlendikten sonra, XTT ve SRB yöntemleriyle test bileşikleri için tespit edilen ortalama IC₅₀ değerleri (Çizelge 3.9) hücrelerin bulunduğu 75 cm²'lik flasklara 3 ml RPMI 1640 besiyeri içinde eklendi. RNA izolasyonunda, negatif (sadece besiyerindeki hücreler) ve pozitif (paklitaksel uygulanan hücreler) kontrol grupları da çalışıldı. 18 saatlik inkübasyondan sonra, DU 145 ve PC-3 hücreleri tripsinizasyon işlemiyle flasklardan 15

ml'lik falkon tüplere toplandı ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, hücre pelleti 1 ml 1X PBS (pH: 7,4) ile yıkanarak ikinci kez santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletinden innuPREP RNA mini kit talimatlarında küçük değişiklikler yapılarak aşağıda tarif edildiği gibi RNA izolasyonu yürütüldü.

İlk olarak, homojenize edilen hücre pelleti üzerine 500 µl 'Lysis Solution RL' eklenip oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Hücre pelleti bekleme süresi boyunca her 5 dakikada bir resüspanse edildi. Lizis işlemi tamamlandıktan sonra lizat, vorteks cihazında karıştırıldı ve 2 ml'lik tüp içinde bulunan 'D' kodlu filtre (mavi renkli) üzerine aktarılarak 11 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda; filtreye bağlanan genomik DNA ortamdan uzaklaştırıldı, filtreden geçerek 2 ml'lik tüp içerisinde toplanan süzüntü ise RNA'yı içermekteydi. Bu süzüntünün üzerine, 500 µl %70'lik (*h/h*) etanol ilave edilerek pipetaj yapıldı. Ardından bu karışım, 2 ml'lik tüp içine yerleştirilmiş 'R' kodlu filtre (pembe renkli) üzerine aktarılarak 11 000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Süre sonunda, süzüntüyü içeren tüp atıldı. RNA'nın bağlandığı 'R' kodlu filtre yeni bir tüpe yerleştirildi. Bu filtre üzerine, 500 µl 'HS' kodlu yıkama solüsyonu eklendi ve 11 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra, süzüntüyü içeren tüp atılarak aynı filtre yeni bir 2 ml'lik tüp içine yerleştirildi. Bu filtrenin üzerine, 'LS' kodlu yıkama solüsyonundan 700 µl eklendi ve 11 000 rpm'de 1 dakika boyunca tekrar santrifüj yapıldı. Santrifüj bittikten sonra, aynı filtre yeni bir 2 ml'lik tüp içine alındı. Tüm etanol kalıntılarını uzaklaştırmak için 11 000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminin ardından, filtre 1,5 ml'lik elüsyon tüp içine yerleştirildi. Filtreye bağlanan RNA'nın eldesi için, filtre üzerine 30 µl RNaz içermeyen su ilave edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, filtre üzerine tekrar 30 µl RNaz içermeyen su ilave edildi ve oda sıcaklığında ikinci kez 5 dakikalık inkübasyon yapıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, 11 000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminin ardından, elüsyon tüpte toplanan süzüntü total RNA'yı içermektedir. İzole edilen RNA'ların miktarı (ng/µl) ve saflığı (260/280 nm dalga boyundaki absorpsiyon değeri) spektrofotometrede ölçülerek belirlendi. Total RNA örnekleri, çalışma yapılmıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Komplementer DNA (Complementary DNA, cDNA) sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden ‘iScript™ cDNA synthesis kit’ kullanılarak ters transkripsiyon (reverse transcription, RT) yöntemiyle komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezlendi. Reaksiyon öncesi, izole edilen tüm RNA örneklerinin konsantrasyonları, RNaz içermeyen steril saf su kullanılarak eşitlendi. Daha sonra, cDNA sentezi için Çizelge 3.11’de belirtildiği şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.11. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)	
	Tek reaksiyon	<i>n</i> sayıda reaksiyon
RNA örneği	15	15 <i>n</i>
5x iScript Reaction Mix	4	4 <i>n</i>
iScript Reverse Transcriptase	1	1 <i>n</i>
Toplam	20	20 <i>n</i>

Son hacim olarak 20 µl reaksiyon karışımı içeren 0,2 µl’lik PZR tüpleri, Thermal Cycler (termal çevrim) cihazına yerleştirildi. Cihazda, sırasıyla 25 °C’de 5 dakika (priming); 46 °C’de 20 dakika (RT); 95 °C’de 1 dakika (RT inaktivasyonu) ve 4 °C’de bekleme (isteğe bağlı) aşamalarından oluşan program ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri, kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı.

Primer tasarımı ve optimizasyonu

Kantitatif gerçek zamanlı PZR testlerinin spesifikliği, tasarlanan primer ve problemlerin uygunluğu ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle; primer ve problemlerin optimum tasarımı, test başarısında önemli paya sahiptir (Rosadas ve ark. 2013, Rodríguez ve ark. 2015). Bu çalışmada, hedef gen bölgeleri için kullanılacak olan primer ve problemler, ‘NCBI’ ve ‘Ensemble’ gen bankaları kullanılarak tasarlandı. Elde edilen primerlerin spesifikliği, ‘Blast’ programı ile kontrol edildi. Analiz sonuçlarını standardize etmek için, *ACTB* (β -Actin) ‘housekeeping’ geni referans (kontrol) olarak kullanıldı. Kullanılan primer ve problemler, Çizelge 3.12’de listelendi.

Çizelge 3.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genler ve primer dizileri

Yolak	Gen	Left (L) / Right (R) primerler
Apoptoz (Ekstrinsik)	<i>Caspase 8 (CASP8)</i>	L: AGTCTGTGCCCAAATCAACA R: TGCTTCTCTCTTTGCTGAATTCTT
	<i>Caspase 10 (CASP10)</i>	L: GGCAAATAAGCATGCAGGTA R: TGTTAGCAGATGCTCCTTGC
	<i>FADD</i>	L: TCTACCTCCGAAGCGTCCT R: CCTTCCTGGAGAGAACCAAA
Apoptoz (İntrinsik)	<i>Cytochrome C (CYCS)</i>	L: TTACACAGCCGCAATAAGA R: TCATTTTTGTTCCAGGGATGT
	<i>Caspase 3 (CASP3)</i>	L: CATACTCCACAGCACCTGGTT R: GGCACAAAGCGACTGGAT
	<i>Caspase 9 (CASP9)</i>	L: TCAGGCCCATATGATCG R: GACTCCCTCGAGTCTCCAGAT
Nekroz	<i>PARP1</i>	L: ACAGTGCGAGTCAGCTCAAG R: CCACCTCATCGCCTTTTCT
	<i>RIPK1</i>	L: CTGGGCGTCATCATAGAGG R: TTCCTTTTACAGAAAGCGGAGT
Otofaji	<i>ATG5</i>	L: CGGGTGAAGGTGGTTCCT R: TTATTTCAACCAAAGCCAAACTT
	<i>Beclin 1 (BECN1)</i>	L: ACCGTGTCACCATCCAGGAA R: CTGGCGAGGAGTTTCAATAAA
Housekeeping	<i>β-Actin (ACTB)</i>	L: GCACCCAGCACAATGAAGA R: CGATCCACACGGAGTACTTG

Tasarlanan forward ve reverse primerler, optimizasyon için önce 100 µM'a sulandırıldı. Daha sonra, bu primerlerden her parametre için 10 µM'lık ara stoklar oluşturularak kantitatif gerçek zamanlı PZR analizine hazır hale getirildi.

Kantitatif gerçek zamanlı PZR

Hücre ölümü ile ilişkili genlerin ekspresyon değişiklikleri (bkz. Çizelge 3.12), 'LightCycler® 480 Probes Master' kullanılarak LightCycler® 480 II cihazında gerçekleştirilen cDNA amplifikasyonu ile belirlendi. Bu amaçla; sentezlenen cDNA'lar, ilgili gen bölgeleri için tasarlanan primerler ve probalar ile LightCycler® 480 Probes Master kullanılarak bir reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)	
	Tek reaksiyon	n sayıda reaksiyon
PZR-grade su	1,25	1,25 n
Forward primer (10 µM)	0,5	0,5 n
Reverse primer (10 µM)	0,5	0,5 n
UPL prob (10 µM)	0,25	0,25 n
LightCycler® 480 Probes Master (2X)	5	5 n
cDNA	2,5	2,5 n
Toplam	10	10 n

Reaksiyon sayısına göre, cDNA hariç tüm bileşenlerin eklenmesiyle hazırlanan bu karışımdan 7,5 µl alınarak 96 kuyucuklu PZR mikroyuvasının tüm kuyucuklarına dağıtıldı. Sonra, üzerlerine 2,5 µl cDNA örneği eklenerek her gen için toplam reaksiyon hacminin 10 µl olması sağlandı. Hazırlanan mikroyuvasının üzeri kapatıldı ve kısa süreli santrifüj edildi. Ardından, mikroyuva LightCycler® 480 II cihazına yerleştirildi ve Çizelge 3.14’de belirtilen protokole göre gerçek zamanlı olarak cDNA amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.14. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi için cihaz protokolü

Program Adı	Pre-inkübasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Analiz Modu	Yok	Kuantifikasyon Modu			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1
Hedef Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	40 °C
Süre	10 dakika	10 saniye	30 saniye	1 saniye	30 saniye
Sıcaklık Artış Hızı	4,8 °C/s	4,8 °C/s	2,5 °C/s	4,8 °C/s	2 °C/s
Okuma Modu	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

Veri analizi

Kantitatif gerçek zamanlı PZR sonunda elde edilen veriler ‘Absolute Quantification’ ve ‘Advanced Relative Quantification’ yöntemleriyle analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda ‘Relative Quantification’ yapabilmek için ‘Fold Change’ yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle, hedef genin CT (cycle threshold) değerleri *ACTB* (β -Actin) gen seviyeleri ile normalize edildi. Normalize değerler, kontrol grupları ile oranlanarak genlerin

ekspresyon değişimini gösteren ‘Fold Change’ değerleri bulundu. ‘Fold Change’ değerleri, 2’den büyük ise anlamlı ‘target up regülasyon’; -2’den küçük ise anlamlı ‘target down regülasyon’ durumunu ifade etmektedir. Gen ekspresyon verilerinin değerlendirilmesi ile hücrelerde aktif olan ölüm yolakları tespit edildi.

3.2.15. Western blot analizi

Test bileşiklerine maruz bırakılan hücrelerin hedef protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri saptamak amacıyla protein blotlama veya immünoblotlama olarak da bilinen western blot yöntemi kullanıldı. Bu teknik, bir hücre veya doku lizatında bulunan hedef proteinlerin ayrılarak tanımlanması prensibine dayanmaktadır. Özetlenecek olursa; western blot analizinde ilk olarak, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanır. Daha sonra proteinler, hedef proteine özgü antikorlar kullanılarak analiz yapmak üzere jelden bir membran üzerine transfer edilir (Burnette 1981, Kurien ve Scofield 2006, Jensen 2012). Bu çalışmada, western blot yöntemiyle hedef proteinlerin görüntülenmesinde izlenen aşamalar aşağıda özetlendi.

Total protein izolasyonu

Ekspresyon çalışmalarından (mRNA ve protein düzeyindeki) anlamlı sonuçlar elde edebilmek adına, hücrelerden total proteinlerin ve RNA’ların izole edilmesi eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Total protein izolasyonu için, DU 145 ve PC-3 hücreleri 5 ml RPMI 1640 besiyeri içinde 25 cm²’lik flasklara ekildi. 8 saat boyunca, 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde inkübe edilerek hücrelerin flask yüzeyine tutunmalarını sağlandı. Daha sonra, DU 145 ve PC-3 hücreleri 18 saat süreyle test bileşiklerinin ortalama IC₅₀ dozlarına (bkz. Çizelge 3.9) maruz bırakıldı. Total protein izolasyonunda, negatif (sadece besiyerindeki hücreler) ve pozitif (paklitaksel uygulanan hücreler) kontrol grupları da çalışıldı. İnkübasyon süresinin bitiminde; bütün flasklardaki hücreler tripsinize edildi, soğuk 1X PBS (pH: 7,4) ile yıkandı ve buz üzerindeki 15 ml’lik falkon tüplere toplandı. Soğutmalı santrifüjde (5 °C), 1500 g devirde 5 dakikalık santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine 200 µl soğuk 1X PBS (pH: 7,4)

eklendi. Homojenize edilen hücre süspansiyonu 1,5 ml'lik eppendorf tüpte toplanarak soğutmalı santrifüjde (5 °C), 1500 g'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, tüpte hiç PBS kalıntısı kalmayacak şekilde tüm süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin lizisi için, pellet üzerine 200 µl RIPA tampon çözeltisi (10 ml 'RIPA lysis and extraction buffer' içinde 100 µl 100X proteaz/fosfataz inhibitör karışımı ve 30 µl Triton X-100 içeren) eklendi, vortekslendi ve 15 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Elde edilen lizatlar; soğutmalı santrifüjde (5 °C), 14 000 g'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, total proteinleri içeren süpernatant, soğuk 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı ve çalışma yapılınca kadar -80 °C'de saklandı.

Total protein konsantrasyonunun ölçülmesi

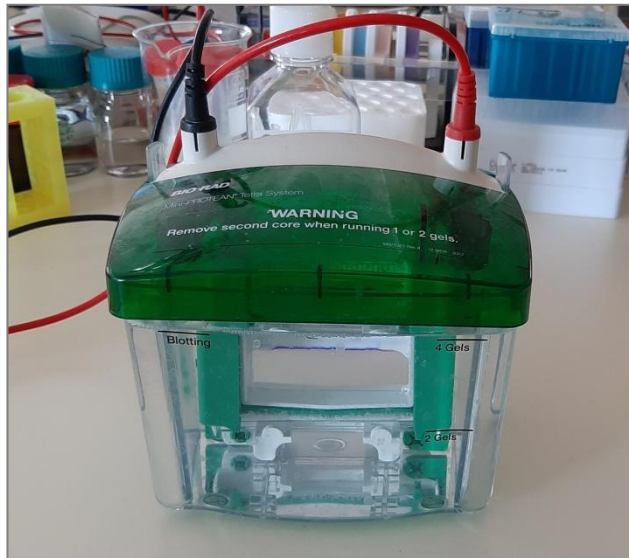
Total protein örneklerinin konsantrasyonları 'Pierce TM BCA protein assay kit' kullanılarak kolorimetrik olarak ölçüldü. BCA (biçinkoninik asit), bakır sülfat içeren yeşil renkli bir solüsyondur. Bu test, protein örneği ile etkileşen BCA solüsyonundaki Cu⁺² iyonunun Cu⁺¹ iyonuna indirgenmesi ve oluşan suda çözünebilir mor renkli ürünün spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle proteinlerin bilinmeyen konsantrasyonlarının belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Smith ve ark. 1985).

Protein konsantrasyonu tayini için öncelikle, kit içerisindeki 'BCA Reagent A' ve 'BCA Reagent B' reaktiflerinden örnek sayısına göre 50:1 (*h/h*) oranında alınarak bir çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu çalışma solüsyonu, 96 kuyucuklu mikrolakada örnek ve blank (kör) için ayrılan kuyucuklara 200 µl hacminde 2 tekrarlı olarak dağıtıldı. Örnek kuyucuklarına, buz üzerinde bekletilen protein örneklerinden 25 µl; blank kuyucuklarına ise RIPA tampon çözeltisinden 25 µl eklenerek nazikçe pipetaj yapıldı. Daha sonra, mikrolaka 37 °C'de, çalkalayıcı üzerinde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, mikrolaka okuyucuda 562 nm'de absorbans okuması yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri, Microsoft Office Excel programında analiz edildi ve denklem kullanılarak protein konsantrasyonları (µg/ml) hesaplandı. En düşük konsantrasyona sahip örnek baz alınarak diğer örneklerin konsantrasyonları RIPA tampon çözeltisiyle seyreltildi ve bütün proteinlerin konsantrasyonları eşitlendi. Protein örneklerini denatüre etmek için, tüm örnekler 2X Sample tamponu, Laemmlı (2-Merkaptoetanol eklenmiş) ile 1:1 (*h/h*) oranda karıştırıldı ve 95-100 °C'ye ayarlı kuru

ısı bloğunda 5 dakika ısıtıldı. Protein örnekleri soğuduktan sonra jele yüklendi, hemen yükleme yapılmadıysa çalışma aşamasına dek -20 °C’de saklandı.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Denatüre protein örnekleri, SDS-PAGE yöntemi kullanılarak molekül ağırlıklarına göre ayrıldı. Bu amaçla; %4-15 yüzdeliğe sahip hazır mini jel (‘Mini-protean TGX precast protein gels’), jel kasetine sabitlenip elektroforez tankına (‘Mini-protean tetra cell (2-gel) and tetra blotting module’) yerleştirildi. Daha sonra, tankın içi doluluk sınırına kadar steril distile su içinde seyreltilmiş 1X yürütme tamponu (10X tris/glycine/SDS running buffer) ile dolduruldu. Jel kuyucukları içinde kalan koruma sıvısı, pipetaj işlemi yapılarak temizlendi. Eşit miktarda (25 µl) protein içeren örnekler özel pipet uçları ile SDS-PAGE kuyucuklarına yüklendi. Kontrol olarak, hem renkli marker (‘color prestained protein standard, broad range, 11-245 kDa’) hem de biyotinli protein ladder (‘biotinylated protein ladder detection pack’ içinde yer alan) kullanıldı. Biyotinli protein ladder, kullanılmadan önce 95-100 °C’ye ayarlı kuru ısı bloğunda 2 dakika ısıtılıp soğumaya bırakıldı. Renkli marker ve biyotinli protein ladder, 7 µl hacimde jele yüklendi. Proteinler, 80 volt (V)’da 30 dakika yürütüldü, sonra voltaj 100 V’a arttırılarak yaklaşık 2 saat boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.12. SDS-PAGE

Islak transfer

Elektroforez işlemiyle, jel üzerinde bantlar oluşturarak molekül ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinlerin membrana aktarılması için, ıslak transfer yöntemiyle elektroblotlama ('electroblotting') yapıldı. Bu yöntem, jel-membran sandviç düzeneğinin 1X transfer tamponu içine tamamen daldırılmasıyla yürütüldü. 1 litre transfer tamponu (1X) hazırlamak için; 700 ml steril distile su içine, 200 ml metanol ve 100 ml 'Pierce™ 10X western blot transfer buffer (metanol-free)' eklendi. Elektroforezin bitmesine yakın, transfer düzeneğinde kullanılan tüm materyaller 1X transfer tamponu bulunan küvet içine alınıp ıslatıldı. 0,45 µm por büyüklüğüne sahip polivinilidin florür (PVDF) transfer membranı, önce %100 metanol sonra steril distile su ile yıkanarak 1X transfer tamponu içine alındı. Bromfenol mavisini boyası jellerin sonuna ulaştığında, elektroforez işlemi durduruldu.

Transfer kaseti üzerine, katot kutbundan (-) anot kutbuna (+) doğru sırasıyla; fiber ped, blotlama kağıdı, jel, membran, tekrar blotlama kağıdı ve fiber ped konuldu ve her kat 1X transfer tamponu ile ıslatılarak sandviç düzeneği oluşturuldu. Daha sonra, transfer kaseti ve soğutma ünitesi blotlama modülüne ('Mini-protean tetra cell (2-gel) and tetra blotting module') yerleştirildi ve tankın içi doluluk sınırına kadar 1X transfer tamponu ile dolduruldu. Ardından, tank güç kaynağına bağlandı ve soğuk ortamda 300 miliamper (mA) akımda 2 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.13). Bu işlem sayesinde; negatif yüklü proteinlerin (SDS'den dolayı), katottan anoda doğru göç ederek jelden membrana transfer olması sağlandı.



Şekil 3.13. Transfer materyallerinin hazırlanması ve ıslak transferin gerçekleştirilmesi

Bloklama ve antikor inkübasyonları

Transfer tamamlandıktan sonra, membranla primer antikor arasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla %5'lik yağsız kuru süt tozu çözeltisi (1X Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) çözeltisi ve %2 sodyum azid ile hazırlanmış) ile bloklama yapıldı. Bu kapsamda; membran, %5'lik yağsız kuru süt tozu çözeltisi ile oda sıcaklığında ve yatay çalkalayıcıda, nispeten düşük hızda 1 saatlik inkübasyona tabi tutuldu. Bloklama süresi sonunda; bu membranlar, 1X TBS-T çözeltisi (10X TBS-T stokunun, steril distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanmış) ile 3 kez ve 10 dakika süreyle yatay çalkayıcı üzerinde, nispeten yüksek hızda yıkandı.

Primer antikorlar ile işaretleme için öncelikle, hedef proteinlere özgü monoklonal antikorlar önerilen çözeltiler içinde ve dilüsyon oranlarında seyreltildi (Çizelge 3.15). Daha sonra; membranlar, taze olarak hazırlanan bu primer antikor solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde (nispeten düşük hızda) ve 4 °C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün, membranları primer antikor kalıntılarından uzaklaştırmak için 1X TBS-T çözeltisi ile 3 kez 10 dakika yıkama yapıldı. Ardından, membranlara kemiluminesans deteksiyon için enzim (HRP) ile konjuge sekonder antikor işaretlemesi yapıldı. Western blot analizinde kullanılan primer antikorlar 'rabbit' yani tavşan kaynaklı olduğundan dolayı 'anti-rabbit IgG' sekonder antikor ile çalışıldı. Sekonder antikor, %5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde 1:3000 oranında seyreltildi. Biotinli protein ladder deteksiyonu için bu karışıma, 1:10 000 oranında seyreltilmiş anti-biyotin ('biotinylated protein ladder

detection pack' içinde yer alan) de eklendi. Ardından, membranlar çalkalayıcı üzerinde (nispeten düşük hızda) ve oda sıcaklığında sekonder antikor solüsyonu ile 1 saat muamale edildi. İnkübasyondan sonra, membranları sekonder antikor kalıntılarından uzaklaştırmak için 3 kez 10 dakika boyunca 1X TBS-T çözeltisi ile yıkama yapıldı.

Çizelge 3.15. Western blot analizinde kullanılan primer antikorlara ilişkin bilgiler

Primer Antikor	Molekül Ağırlığı	Dilüsyon Çözültisi	Dilüsyon Oranı
β -Actin	45 kDa	%5 sığır serum albümini	1:1000
Atg5	55 kDa	%5 sığır serum albümini	1:1000
Caspase-3	17, 19, 35 kDa	%5 yağsız kuru süt tozu	1:1000
Caspase-8	10, 57 kDa	%5 sığır serum albümini	1:1000
Caspase-9	35, 37, 47 kDa	%5 yağsız kuru süt tozu	1:1000
Caspase-10	22, 59 kDa	%5 sığır serum albümini	1:1000
Cytochrome c	14 kDa	%5 sığır serum albümini	1:1000

Hedef proteinlerin görüntülenmesi

Hedef proteinleri membran üzerinde görüntüleyebilmek amacıyla, substrat içeren ışığa hassas reaktif karışımı ('Luminata Forte Western HRP substrate') membranların üzerine 2 ml hacimde eklendi ve 3 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Antikora bağlı enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan kemilüminesan sinyal, görüntüleme cihazında görüntülendi. Protein bantları 'ImageLab' yazılımı ile analiz edildi.

3.2.16. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 20 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm analizlerin sonuçları, ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu. Normal dağılım gösteren verilerin kıyaslanması için 'One way ANOVA (tek yönlü varyans analizi)' testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0.05$ değerine göre belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Botanik Çalışmalara İlişkin Bulgular

4.1.1. Tayin anahtarları

Tez çalışması kapsamında, Bursa (A2) ili sınırları içinde gerçekleştirilen arazi çalışmaları sonucunda, *E. hirsutum* bitkisinin Orhaneli, Sadağı Kanyonu'nda dere yatağı kenarlarındaki nemli topraklarda yayılış gösterdiği saptandı. Ekstraksiyon çalışmaları için araştırma alanındaki *E. hirsutum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından küçük ölçekte örnek toplandı. Bitki türünün tanımlanması için aşağıda verilen tayin anahtarlarından faydalanıldı.

Onagraceae familyasına ait cinslerin tayin anahtarı

1. Sepaller ve petaller 2 tane; meyve kapalı, 1-2 tohumlu

1. *Circaea*

1. Sepaller 4-5; petaller 4-5 tane veya yok; meyve çok tohumlu bir kapsül

2. Sepaller 4-5 tane, meyvede kalıcı; petaller 0-5 tane; stamenler 4-10 tane

3. *Ludwigia*

2. Sepaller ve petaller 4 tane, erken dökülen; stamenler 8 tane

3. Tohumlar kalaza tüyleri içerir; korolla beyaz veya morumsu-pembe renkli

4. *Epilobium*

3. Tohumlar kalaza tüyleri içermez; korolla sarı renkli

2. *Oenothera*

Epilobium L. cinsine ait taksonların tayin anahtarı

1. Alt yapraklar spiral olarak düzenlenmiş; çiçekler zigomorfik (Sect. *Chamaenerion*)

2. Çiçek durumu, keskin bir şekilde geriye doğru kıvrık tomurcuklar ile basit bir rasem; yapraklar tüysüz veya çok az pübesent (ince ve kısa tüylü); tohumlar pürüzsüz

1. *angustifolium*

2. Çiçek durumu, dik tomurcuklar ile bileşik bir rasem; yapraklar tüysüz veya yoğun olarak çok kısa sık tüylerle kaplı; tohumlar ince papilloz

3. Yapraklar tüysüz, dar eliptik, serrulat (testere dişçikli); stilüs genellikle stamenlerden daha uzun

2. colchicum

3. Yapraklar pubesent veya tüysüz, lanseolat (mızraksı), düz, tam kenarlı; stilüs stamenlerin uzunluğunda

4. Yapraklar yoğun olarak yatık-çok kısa sık tüylerle kaplı, linear (şeritsi)-lanseolat

3. stevenii

4. Yapraklar seyrek yayılışlı-pubesent, linear

4. dodonaei

1. Alt yapraklar karşılıklı veya dairesel; çiçekler düzenli (Sect. *Epilobium*)

5. Stigma derin 4-loblu yapıda

6. Gövde uzun tüylerle kaplı

7. Yapraklar gövdeyi saran ve dekürent; petaller 8-20 mm, morumsu

5. hirsutum

7. Yapraklar fakat subsesil gövdeyi saran değil; petaller 5-8 mm, pembe

6. parviflorum

6. Gövde kırışık tüylü veya tüysüz

8. Yapraklar ovat-lanseolat, geniş yuvarlak tabanda kenarlar serrat (testere dişli); petiyol (yaprak sapı) 0-2 mm

7. montanum

8. Yapraklar lanseolat, küneat (kamamsı) tabanda kenarlar bütün; petiyol 4-10 mm

8. lanceolatum

5. Stigma düz, bütün veya çok yüzeysel loblu

9. Çiçek durumu tomurcukta sarkık veya düşük; tohumlar pürüzsüz veya papilloz ise 1,5-2 mm; yapraklar düz, tam kenarlı ya da dentat

10. Alt yapraklar dairesel, keskin serrat

9. alpestre

10. Alt yapraklar karşılıklı, düz, tam kenarlı veya dentat

11. Yapraklar en az 4 kat daha geniş; tohumlar 1,6-2 mm

14. *palustre*

11. Yapraklar en fazla 3 kat geniş; tohumlar 1-1,5 mm

12. Bitki boyu 4, 10(20) cm; yapraklar düz, tam kenarlı; tohumlar pellusid gagalı

21. *anagallidifolium*

12. Bitki boyu (5)10, 50 cm; yapraklar dentat; tohumlar pellusid gaga yok

13. Petaller pembemsi-mor, 6-10 mm

19. *ponticum*

13. Petaller beyaz veya soluk pembe, 4,6-6(8) mm

17. *frigidum*

9. Çiçek durumu tomurucukta dik; tohumlar papilloz, bezen çok ince, 1-1,5 mm; yapraklar dentat veya serrat

14. Gövde çiçek durumunun altında salgı tüylü; çiçek durumu kırışık tüylü, salgısız; yaprak aksillerinde yavru soğanlar veya vejatatif sürgünler var

20. *gemmascens*

14. Gövde genellikle kırışık tüylü ve salgısız ya da tüysüz, salgılı ise çiçek durumu salgı tüylü; yavru soğanlar yok

15. Çiçekler 3-5,5 mm; tohumlar kısa gagalı

16. Tohumlar 13 tane, 1,5 mm büyüklüğünde, attenüat (daralan); gövde sıklıkla basit; çiçek durumu kısmen salgı tüylü

16. *confusum*

16. Tohumlar 1 mm, obovat (ters yumurtamsı); gövde çok dallı; çiçek durumu çok yoğun kısa tüylerle kaplı; tüyler salgısız, kırışık

15. *minutiflorum*

15. Çiçekler 4-15 mm; tohumlar gagalı değil

17. Çiçek durumu yoğun olarak kırışık tüylü, salgısız veya kalikslerin üzerinde birkaç salgı tüylü

18. Yapraklar tabanda ovat, subkordat (yüreksi) veya turunkat (kesik); gövde sıklıkla 2 yüksek hat şeklinde

13. *roseum*

18. Yapraklar eliptik veya oblong (dikdörtgensi), sıklıkla tabanda küneat; gövde genellikle 4-köşeli

19. Kapsüller (5)7-11 cm; bitkiler gövde tabanındaki subsesil rozetlerle yayılırlar; çiçek durumunda salgı tüyleri yok

10. tetragonum

19. Kapsüller 4-6 cm; bitkiler yapraklı topraküstü stolonlarla yayılırlar; çiçek durumunda sıklıkla birkaç salgı tüyü mevcut

11. obscurum

17. Çiçek durumunun tümü veya birçoğu salgı tüylü

20. Petaller 4, 5 (-6) mm; petiyoller 0,5-8 mm; yapraklar tabanda küneat; salgı tüyleri çoğunlukla pediseller ve çiçek durumunun ana dalları ile sınırlı

13. roseum

20. Petaller 6-15 mm; petiyoller 0-2 mm; yapraklar genellikle geniş tabanlı; çiçek durumu belirgin bir şekilde salgılı-pubesent

21. Tohumlar obovat, kabaca papilloz; stigma kısa çomaksı, emarginat değil

12. anatolicum

21. Tohumlar attenüat, ince papilloz; stigma kapitat, emarginat veya tepede belirsiz 4-loblu

18. algidum

Sect. *Chamaenerion* Tausch. (Syn: *Chamaenerion* Adans.). Yaprakların tümü spiral şekilde düzenlenmiştir. Çiçekler zigomorfik simetridir, üstteki 2 petal alttaki 2 petalden daha geniş; stigma derin 4-loblu.

4.1.2. Ekstraksiyon ve fraksiyonlama çalışmaları

E. hirsutum bitkisinin, DU 145 ve PC-3 androjen bağımsız prostat kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek üzere biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı temel alınarak ekstraksiyon ve fraksiyonlama çalışmaları yürütüldü. Bu bağlamda, ekstraktların ve fraksiyonların aktivitelerinin tespitinde

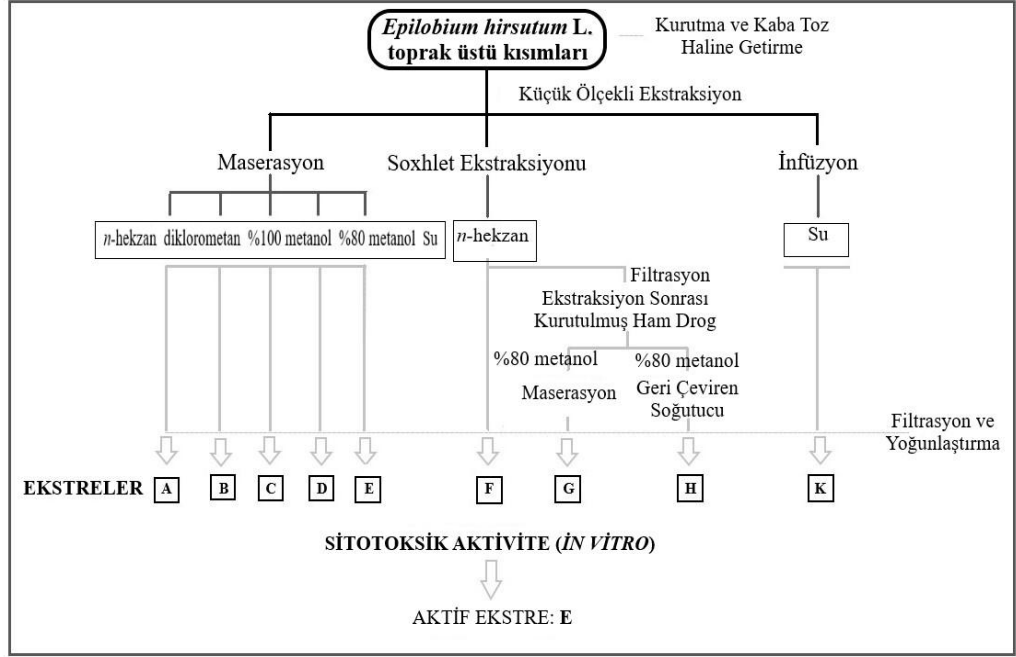
sitotoksosite etkili oldu. Bu amaçla; bitkisel drog (bitkinin toprak üstü kısımları), çeşitli yöntemler kullanılarak farklı polaritedeki çözücülerle ön ekstraksiyon çalışmasına tabi tutuldu. Elde edilen ham ekstrelerin sitotoksik aktiviteleri, iki farklı hücre canlılık testiyle *in vitro* olarak tarandı. Her iki testin sonuçlarına göre, hücre hatları karşısında en güçlü aktiviteyi gösteren ekstre (maserasyon yöntemiyle hazırlanan su ekstresi) belirlendi. Bu aktiviteden sorumlu bileşiği veya bileşikleri izole edebilmek amacıyla aktif ekstreden S1V1-S1V1 ekstraksiyon yöntemiyle kaba fraksiyonlar hazırlandı. *E. hirsutum* bitkisinden elde edilen ham ekstreler ve kaba fraksiyonlar ile ilgili bilgiler ise Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1. *Epilobium hirsutum* L. bitkisinden elde edilen ham ekstreler ve kaba fraksiyonlar

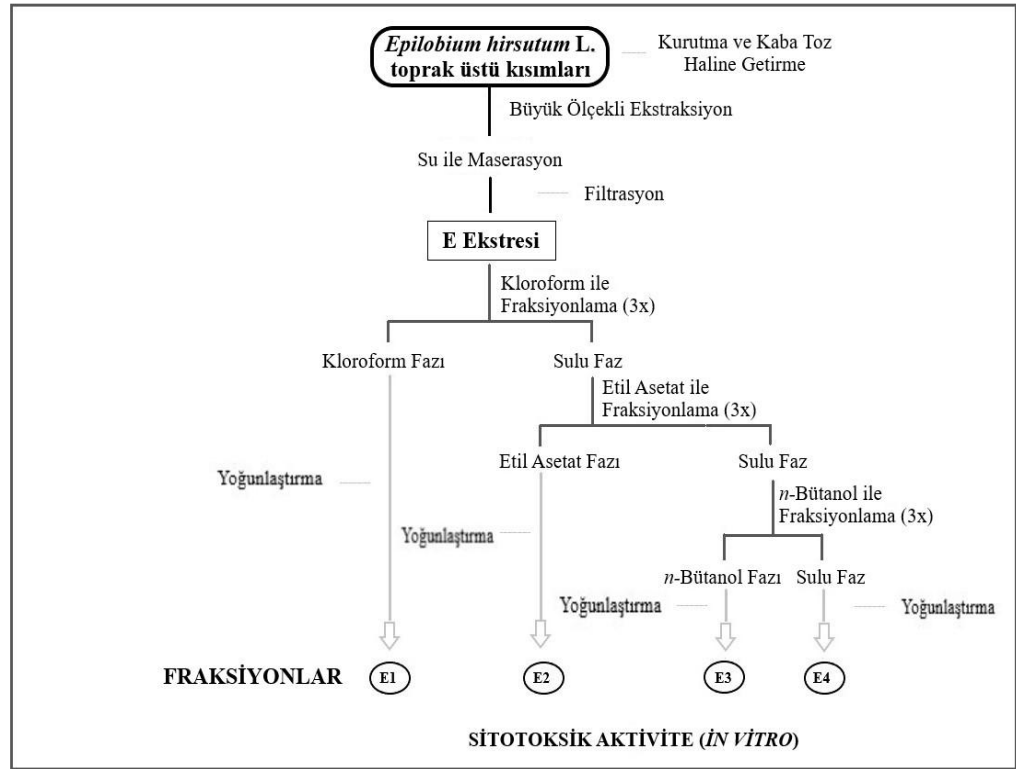
Kod	Ekstraksiyon Yöntemi	Açıklama
Ham Ekstreler		
A	Maserasyon	<i>n</i> -Hekzan ekstresi
B	Maserasyon	Diklorometan ekstresi
C	Maserasyon	% 100 metanol ekstresi
D	Maserasyon	%80 metanol ekstresi
E	Maserasyon	Su ekstresi
F	Soxhlet ekstraksiyonu	<i>n</i> -Hekzan ekstresi
G	Soxhlet ekstraksiyonu sonrası maserasyon	%80 metanol ekstresi
H	Soxhlet ekstraksiyonu sonrası geri çeviren soğutucuda ekstraksiyon	%80 metanol ekstresi
K	İnfüzyon	Su ekstresi
Kaba Fraksiyonlar		
E1	S1V1-S1V1 ekstraksiyonu	Kloroform fraksiyonu
E2	S1V1-S1V1 ekstraksiyonu	Etil asetat fraksiyonu
E3	S1V1-S1V1 ekstraksiyonu	<i>n</i> -Butanol fraksiyonu
E4	S1V1-S1V1 ekstraksiyonu	Su fraksiyonu (fraksiyonlanma sonrası kalan sulu kısım)

Tez çalışması kapsamında, biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi kullanılarak ekstre ve fraksiyonların hazırlanması Şekil 4.1’de özetlendi. Ekstrelerin ve fraksiyonların sitotoksik etkilerine ilişkin bulgular ise bir sonraki bölümde verildi.

ÖN EKSTRAKSİYON ÇALIŞMASI



KABA FRAKSİYONLAMA ÇALIŞMASI



Şekil 4.1. Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi ile ekstrelerin ve fraksiyonların elde edilmesi

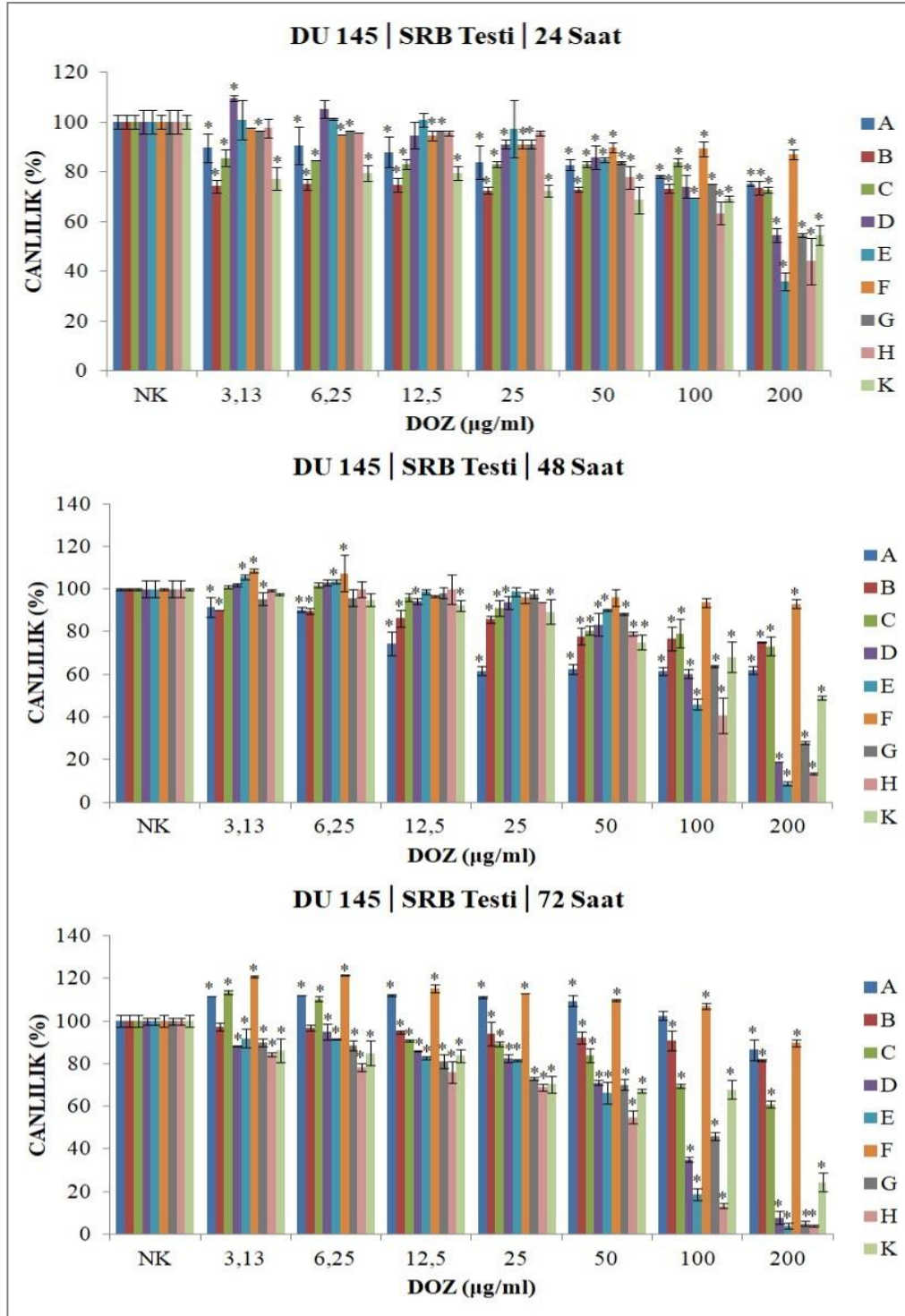
4.2. *In Vitro* ve Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular

4.2.1. Ham ekstrelerin sitotoksik etkilerine ilişkin bulgular

E. hirsutum bitkisinden elde edilen ham ekstrelerin (A, B, C, D, E, F, G, H ve K), DU 145 ve PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki potansiyel sitotoksik aktiviteleri *in vitro* hücre canlılık testleriyle araştırıldı. Bu amaçla, kolorimetrik testler olan SRB ve XTT hücre canlılık testlerinden yararlanıldı.

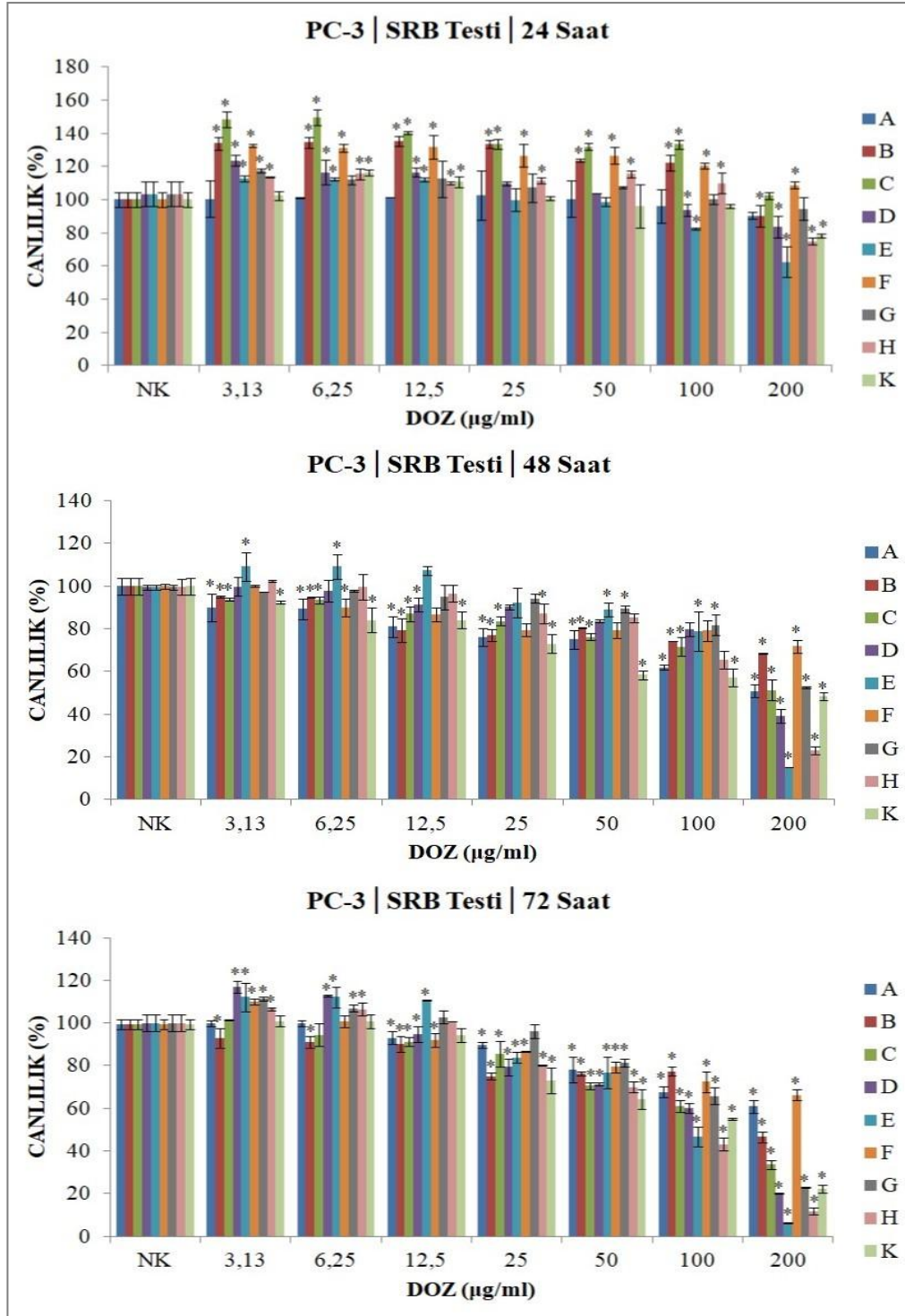
SRB hücre canlılık testi bulguları

İlk olarak, *E. hirsutum* bitkisinden ön ekstraksiyon yöntemleriyle hazırlanan ham ekstrelerin, DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri SRB testiyle tarandı. Sitotoksik etkisi en yüksek olan ekstreyi saptamak amacıyla, hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı ekstre konsantrasyonları (3,13-200 µg/ml) ile muamele edildi ve tedavi sürelerini takiben elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de gösterildi. Elde edilen verilere göre; DU 145 hücrelerinde, tüm ekstreler arasında en iyi sitotoksik etkiyi gösteren ekstrelerin E ve H kodlu ekstreler olduğu tespit edildi. Bu ekstrelerin, negatif kontrol ile kıyaslandığında, DU 145 hücrelerinin canlılıklarını, doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0,05$). İki ekstrenin de DU 145 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi benzer bir eğilim gösterdi. Bu ekstrelerin özellikle 200 ve 100 µg/ml’lık dozlarının, hücre canlılıklarında keskin bir azalışa neden olduğu gözlemlendi. Buna karşılık, D ve G kodlu ekstrelerin sadece 200 ve 100 µg/ml’lık dozlarının DU 145 hücrelerinde güçlü sitotoksositeye neden olduğu görüldü. K kodlu ekstrenin ise, zayıf sitotoksik etki göstererek sadece 200 µg/ml’lık dozda DU 145 hücrelerini öldürdüğü saptandı. 24 - 72 saatlik tedavi aralığında A, B, C ve F kodlu ekstreler için DU 145 hücrelerinde sitotoksik etkiden ziyade daha çok antiproliferatif/sitostatik etkinin (hücre büyümesini engelleyen etki) varlığı gözlemlendi.



Şekil 4.2. DU 145 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, ham ekstre uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

SRB hücre canlılık testiyle elde edilen sonuçlar incelendiğinde; ham ekstrelerin (A-K), PC-3 hücrelerinde DU 145 hücre hattına benzer bir sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.3). PC-3 hücrelerinde, E ve H kodlu ekstrelerin negatif kontrol ile karşılaştırıldığında doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik etkiler gösterdiği bulundu ($p<0,05$). Bu ekstreler, söz konusu etkilerini yüksek dozlarda (200 ve 100 $\mu\text{g/ml}$) gösterirken, daha düşük dozlarda dikkate değer bir etki tespit edilemedi. D, G ve K kodlu ekstrelerin uygulandığı PC-3 hücrelerinde, konsantrasyon arttıkça hücre canlılık oranlarında anlamlı azalmalar ($p<0,05$) gözlenirse de sitotoksik açıdan en önemli etkiler, ekstrelerin sadece 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lık dozlarında saptandı. PC-3 hücrelerinde, taranan tüm ekstreler arasında en zayıf sitotoksik etkiyi gösteren ekstreler; B, C ve K kodlu ekstreler olarak belirlendi. Ancak, DU 145 hücrelerinin aksine PC-3 hücrelerinde, bu ekstrelerin 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lık dozlarının hücre canlılıklarını ciddi oranda azalttığı görüldü ($p<0,05$). A ve F kodlu ekstrelerin, PC-3 hücreleri üzerindeki etkisi ise antiproliferatif/sitostatik olarak değerlendirildi.



Şekil 4.3. PC-3 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, ham ekstre uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

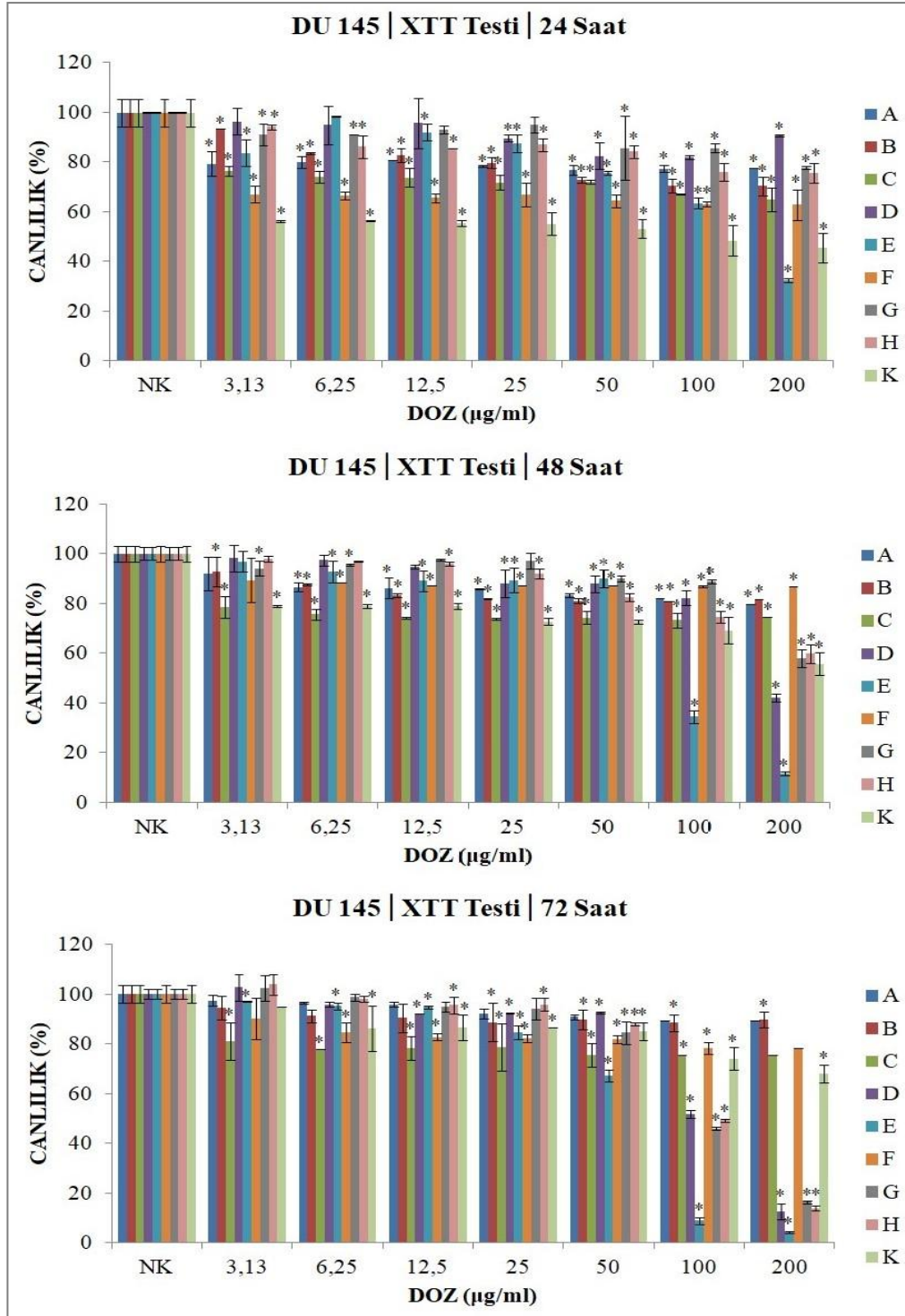
Ham ekstre uygulanan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin SRB hücre canlılık testiyle doza karşı yüzde canlılık grafiklerinden türetilen ve hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon olarak ifade edilen IC₅₀ değerleri, Çizelge 4.2'de verildi. IC₅₀ değerleri dikkate alındığında, her iki hücre hattında da en iyi sitotoksik aktivitelerin 72 saatlik tedavi süresinde elde edildiği görüldü. Bu sonuç; ham ekstreler ile daha uzun süreli tedavinin, daha düşük IC₅₀ dozlarına ve buna bağlı olarak daha yüksek sitotoksik etkilere neden olmasıyla açıklandı. Ham ekstrelerin uygulandığı DU 145 ve PC-3 hücrelerinde tespit edilen en düşük IC₅₀ dozları E ve H kodlu ekstrelere aittir. 72 saatlik uygulama için E kodlu ekstre için DU 145 hücrelerindeki IC₅₀ dozu 67,14 µg/ml, PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ dozu ise 94,50 µg/ml olarak belirlendi. H kodlu ekstre için 72. saatte elde edilen IC₅₀ değerleri ise sırasıyla; DU 145 hücre hattında 55,96 µg/ml, PC-3 hücre hattında 87,17 µg/ml olarak bulundu. Bu ekstrelerin etki derecelerine benzer etkinlik gösteren diğer ekstrelerin D ve G kodlu ekstreler olduğu görüldü. SRB testiyle elde edilen IC₅₀ değerleri kıyaslandığında, DU 145 hücrelerinin D, E, G ve H kodlu ekstrelere PC-3 hücrelerinden daha duyarlı olduğu bulundu. Bunlara ek olarak; B, C ve K kodlu ekstrelerin PC-3 hücrelerinde daha etkili olduğu ancak bu ekstreler için hesaplanan IC₅₀ dozlarının nispeten yüksek olduğu belirlendi. Her iki hücre hattında, A ve F kodlu ekstreler için ise etkin dozlar belirlenememiş olup hesaplanan IC₅₀ değerleri uygulanan doz aralığının dışındadır (IC₅₀ >200 µg/ml).

Çizelge 4.2. *Epilobium hirsutum* L. ham ekstrelerinin SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

Ham Ekstreler	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)					
	DU 145			PC-3		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
A	>200	>200	>200	>200	>200	>200
B	>200	>200	>200	>200	>200	188,80
C	>200	>200	>200	>200	>200	140,63
D	>200	124,60	79,26	>200	173,08	124,86
E	157,89	95,37	67,14	>200	145,12	94,50
F	>200	>200	>200	>200	>200	>200
G	>200	138,25	91,67	>200	>200	136,97
H	169,23	87,93	55,96	>200	136,70	87,17
K	>200	194,26	141,15	>200	179,45	115,29

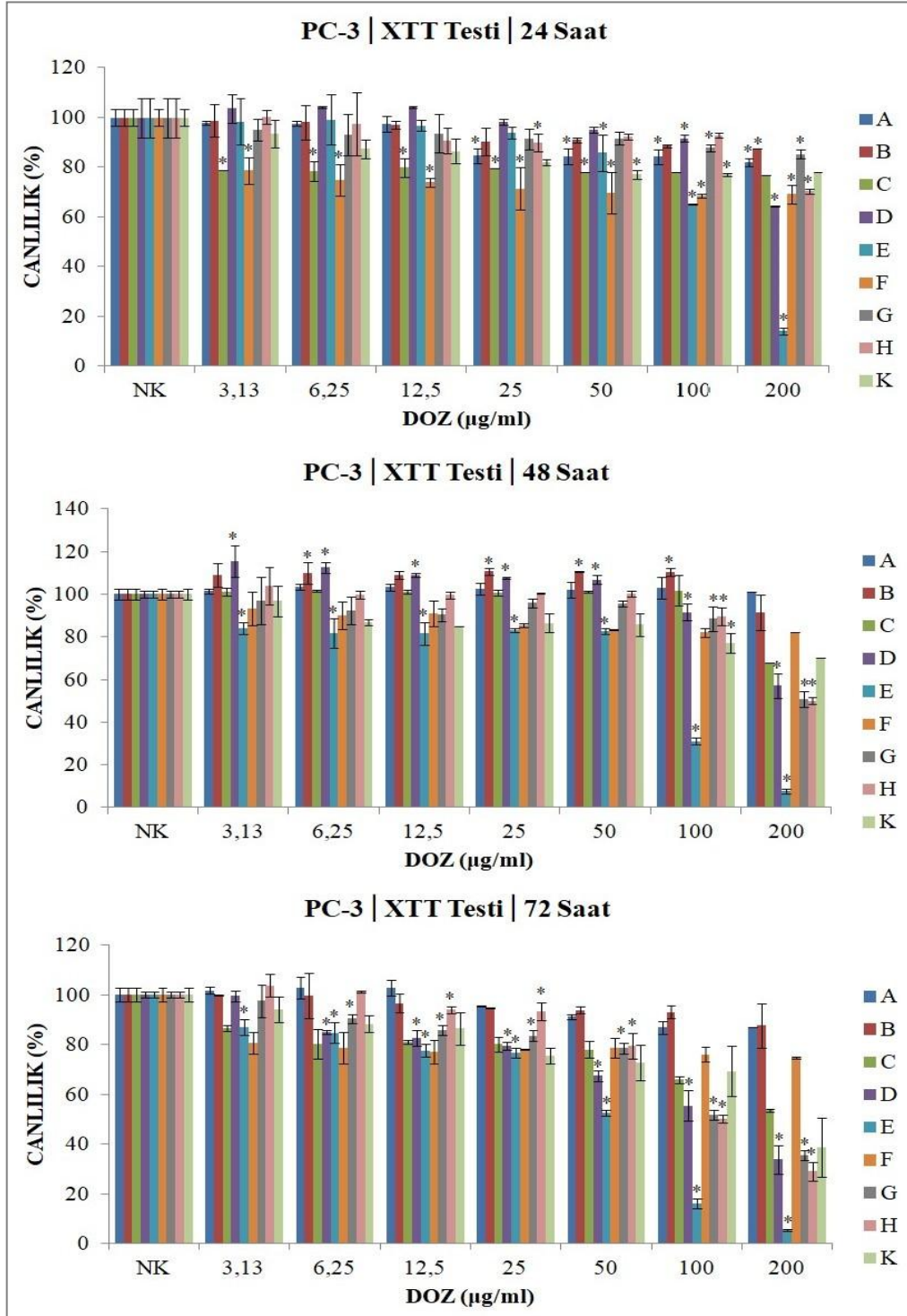
XTT hücre canlılık testi bulguları

Ham ekstrelerin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini doğrulamak için, XTT hücre canlılık testinden yararlanıldı. Ham ekstrelerin 3,13-200 µg/ml aralığında yer alan konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saatlik tedaviden sonra elde edilen sonuçlara göre, E kodlu ekstrenin DU 145 hücre hattına karşı en güçlü sitotoksik aktiviteyi gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.4). Bu ekstrenin, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, DU 145 hücre canlılıklarını doza ve zamana bağımlı olarak anlamlı şekilde azalttığı görüldü ($p<0,05$). Ancak, bu ekstrenin uygulanan tüm dozlarda sitotoksik etki göstermediği belirlendi. 24 saatlik tedavi sonrası, E kodlu ekstrenin sadece 200 µg/ml'lik dozunda sitotoksik etki gözlenirken 48 ve 72 saatlik muameleler sonucu, hem 200 µg/ml hem de 100 µg/ml konsantrasyonlarda sitotoksik etki incelendi. E kodlu ekstrenin daha düşük dozlarının ise, DU 145 hücreleri üzerinde antiproliferatif/sitostatik olarak etki gösterdiği belirlendi. E kodlu ekstrelerden sonra, DU 145 hücrelerine karşı en iyi sitotoksik aktiviteyi gösteren ekstreler; D, G ve H kodlu ekstreler olup bu ekstrelerin etki dereceleri birbirine benzerdir. K kodlu ekstrenin, DU 145 hücreleri karşısında en güçlü sitotoksik etkiyi kısa süreli tedavide (24. saat) göstermesi bu çalışma için dikkat çekici bir sonuç oldu.



Şekil 4.4. DU 145 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, ham ekstre uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Şekil 4.5’de gösterildiği gibi, taranan tüm ham ekstrelerin, PC-3 hücre hattında diğer hücre hattına benzer sitotoksik aktivite sergilediği incelendi. Bu hücre hattında da, sitotoksik açıdan en yüksek etki E kodlu ekstrede tespit edildi. Bu ekstre ile muamele sonrası, konsantrasyon ve tedavi süresi artışına bağlı olarak PC-3 hücre canlılıklarında, negatif kontrole kıyasla, anlamlı azalışlar olduğu belirlendi ($p<0,05$). 24. saatte, bu ekstrelerin yalnızca 200 µg/ml’lik dozunun sitotoksik olarak, daha düşük dozlarının (3,13-100 µg/ml) ise antiproliferatif/sitostatik olarak etkili olduğu görüldü. Bunun aksine, tedavi süresinin 48. ve 72. saatlerinde, ekstrelerin hem 200 µg/ml hem de 100 µg/ml’lik dozlarının sitotoksikiteye yol açtığı gözlemlendi. Bu süre içinde, diğer dozların (3,13-50 µg/ml) sitotoksik etkiden çok hücre çoğalmasını baskılayıcı yönde etki gösterdiği bulundu. 24-72 saatlik tedavi aralığında, PC-3 hücrelerine karşı E kodlu ekstre haricinde en iyi sitotoksik aktiviteyi sergileyen diğer ekstreler; D, G ve H kodlu ekstrelerdir. Bu ekstrelerin aktiviteleri birbirine yakın düzeydedir. Tüm bunlara ilave olarak; 72 saatlik tedaviden sonra, K kodlu ekstreye ait 200 µg/ml’lik konsantrasyonun PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. A, B, C ve F kodlu ekstrelerin ise antiproliferatif/sitostatik etkili olduğu, ancak DU 145 hücrelerinden farklı olarak PC-3 hücrelerinin C kodlu ekstreye daha duyarlı olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.5. PC-3 hücrelerine ham ekstrelerin uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, ham ekstre uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Ham ekstrelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde önemli olan IC₅₀ değerleri, DU 145 ve PC-3 hücrelerine ait XTT hücre canlılık testi sonuçlarından yola çıkılarak hesaplandı. Çizelge 4.3'de verilen sonuçlar incelendiğinde, her iki hücre hattında da ham ekstrele ait en düşük IC₅₀ değerleri 72 saatlik tedavi sonunda belirlendi. İstisnai olarak, K kodlu ekstre için en güçlü sitotoksik etki, 24. saatte ve sadece DU 145 hücre hattında tespit edildi (IC₅₀ dozu: 83,78 µg/ml). Hem DU 145 hem de PC-3 hücrelerinde en düşük IC₅₀ değerlerinin hesaplandığı dolayısıyla en güçlü sitotoksik aktiviteyi sergileyen ekstrenin, E kodlu ekstre olduğu saptandı. 72 saatlik muamelenin ardından, E kodlu ekstrenin DU 145 hücrelerindeki IC₅₀ dozu 64,58 µg/ml iken, PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ dozu 53,23 µg/ml olarak hesaplandı. Bu sonuç, hücrelerin bu ekstreye karşı duyarlılıklarının benzer olduğu göstermektedir. Sitotoksik etki olarak nispeten birbirine yakın sonuçlar veren diğer ekstreler; D, G ve H kodlu ekstrelerdir ve bu etki, iki hücre hattında da geçerlidir. Ancak, hücrelerin D kodlu ekstrede çok G ve H kodlu ekstreler ile tedaviye daha iyi yanıt verdiği gözlemlendi. Ayrıca, K kodlu ekstrenin hem DU 145 hem de PC-3 hücrelerine karşı zayıf sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. A, B, C ve F kodlu ekstreler için ise sitotoksositeye dair olumlu bir bulgu elde edilememiş olup IC₅₀ değerleri iki hücre hattı için de doz aralığının dışındadır (IC₅₀ >200 µg/ml).

Çizelge 4.3. *Epilobium hirsutum* L. ham ekstrelerinin XTT testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

Ham Ekstreler	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)					
	DU 145			PC-3		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
A	>200	>200	>200	>200	>200	>200
B	>200	>200	>200	>200	>200	>200
C	>200	>200	>200	>200	>200	>200
D	>200	180,23	104,50	>200	>200	124,77
E	143,39	85,93	64,58	129,49	81,67	53,23
F	>200	>200	>200	>200	>200	>200
G	>200	>200	94,67	>200	200	109,91
H	>200	>200	99,02	>200	200	100,46
K	83,78	>200	>200	>200	>200	162,94

Kısaca özetlemek gerekirse; farklı *E. hirsutum* ekstrelerinin test edilen hücre hatları karşısındaki sitotoksik etkileri ilk önce SRB hücre canlılık testiyle araştırıldı. Daha

sonra, bu testten elde edilen verilerin doğruluğunu teyit etmek için seçilen alternatif bir test ile aynı deneysel şartlar altında analiz yapılması planlandı. Bu amaçla, XTT hücre canlılık testi kullanılarak ikinci bir deney yürütüldü. Sonuç olarak, bu iki farklı testten elde edilen bulguların birbiriyle uyumlu olduğu ve SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ dozlarının görece düşük olduğu bulundu.

Bu bulgulardan yola çıkarak, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde en güçlü sitotoksik etki, su içinde maserasyon yöntemiyle hazırlanan E kodlu ekstrede görüldü. Bu bağlamda, biyolojik aktivite rehberli olarak aktiviteden sorumlu bileşikler tanımlayabilmek için SIV1-SIV1 ekstraksiyon yöntemi kullanılarak E kodlu ekstreden kaba fraksiyonlama gerçekleştirildi.

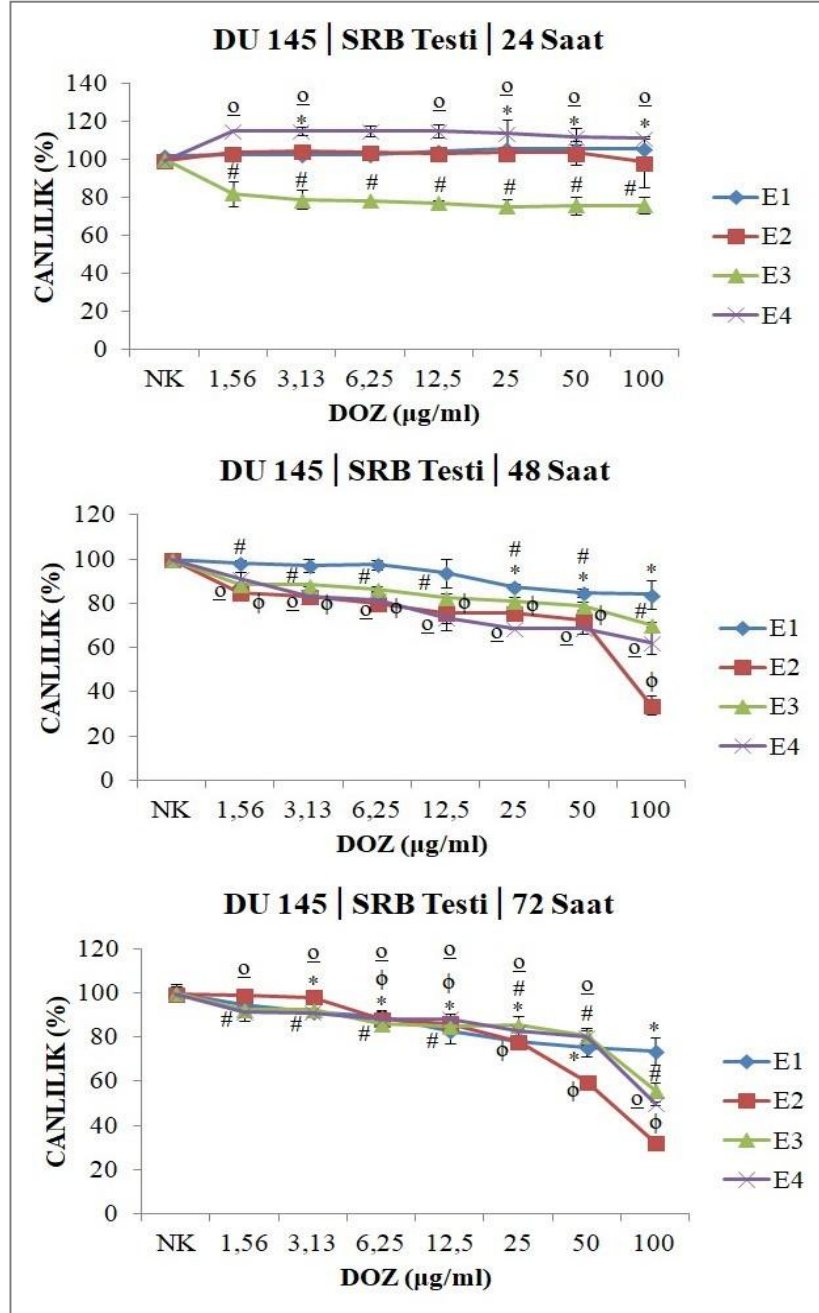
4.2.2. Kaba fraksiyonların sitotoksik etkilerine ilişkin bulgular

E. hirsutum bitkisine ait E kodlu ham ekstreden elde edilen kaba fraksiyonların (E1, E2, E3 ve E4) DU 145 ve PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkileri, ekstreler ile aynı deney koşulları altında incelendi. Bu kapsamda, kaba fraksiyonların sitotoksik ve/veya antiproliferatif/sitostatik etkileri, SRB ve XTT hücre canlılık testleri ile değerlendirildi.

SRB hücre canlılık testi bulguları

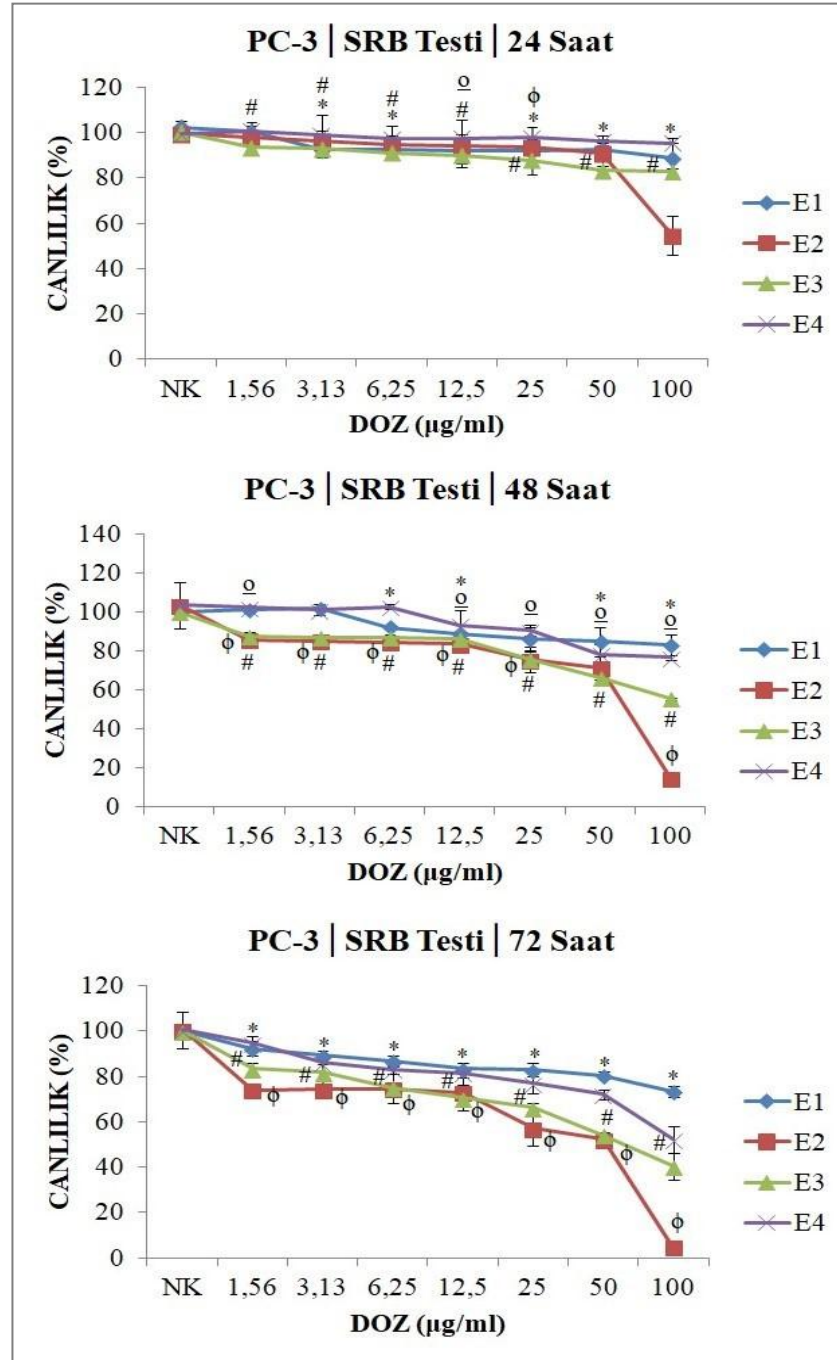
E1, E2, E3 ve E4 olarak adlandırılan 4 farklı fraksiyonunun (1,56-100 µg/ml konsantrasyon aralığındaki) DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki etkisi, 24, 48 ve 72 saat sonra ilk olarak SRB hücre canlılık testiyle analiz edildi. Şekil 4.6'da verildiği üzere, tüm kaba fraksiyonların, negatif kontrole kıyasla, DU 145 hücre canlılıklarında doza ve zamana bağlı anlamlı azalışlar gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$). Fraksiyonlar arasında, E2 kodlu etil asetat fraksiyonunun diğer fraksiyonlardan daha etkili olduğu bulundu. Ancak, bu fraksiyonun yalnızca en yüksek konsantrasyonun (100 µg/ml) DU 145 hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olduğu görüldü. Bununla beraber, DU 145 hücre hattında, E3 ve E4 kodlu fraksiyonların E2 kodlu fraksiyona yakın sitotoksik aktivite sergilediği tespit edildi. Bu fraksiyonların aktiviteleri benzer bir eğilim göstermiş olup etkili oldukları doz 100 µg/ml'dir. E1 kodlu fraksiyon için, tüm dozların; diğer

fraksiyonlar için, <100 µg/ml dozların hücre çoğalmasını baskılayarak antiproliferatif/sitostatik yönde etki gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.6. DU 145 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, kaba fraksiyon uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. *, φ, # ve ◯ Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Test edilen kaba fraksiyonların çalışma dozları ve inkübasyon süresi arttıkça, PC-3 hücre canlılıklarında da istatistiksel olarak anlamlı azalışlar belirlendi ($p<0,05$). DU 145 hücrelerinde gözlemlendiği gibi, E2 kodlu fraksiyonun PC-3 hücrelerine karşı diğer fraksiyonlardan daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği saptandı (Şekil 4.7). Fakat 24, 48 ve 72 saat boyunca, PC-3 hücrelerinin bu fraksiyona DU 145 hücrelerinden daha duyarlı olduğu gözlemlendi. PC-3 hücre hattı için en önemli etki, E2 fraksiyonunun en yüksek dozunda (100 µg/ml) görüldü ve sadece bu dozun hücrelerde sitotoksositeye neden olduğu belirlendi. Daha düşük dozlarda ise, etki daha zayıf olmakla birlikte hücre çoğalmasının baskılanması (antiproliferatif/sitostatik etki) açısından önemlidir. Diğer yandan, E1, E3 ve E4 kodlu fraksiyonların varlığında, en yüksek konsantrasyonda dahi bu hücre hattı için sitotoksik etki elde edilemedi. Bu sebeple; E1, E3 ve E4 kodlu fraksiyonların aktiviteleri, antiproliferatif/sitostatik olarak değerlendirildi. Ayrıca, E3 ve E4 kodlu fraksiyonların, aktivite bakımından birbirine benzer sonuçlar verdiği görüldü.



Şekil 4.7. PC-3 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, kaba fraksiyon uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. *, ϕ , # ve \circ Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Çizelge 4.4. *Epilobium hirsutum* L. kaba fraksiyonlarının SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)					
	DU 145			PC-3		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kaba fraksiyonlar						
E1	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E2	>100	79,24	67,82	>100	68,87	52,24
E3	>100	>100	>100	>100	>100	65,51
E4	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ham ekstre						
E	>100	95,37	67,14	>100	>100	94,50

DU 145 ve PC-3 hücreleri için, kaba fraksiyonların ve bu fraksiyonların elde edildiği ham ekstrenin IC₅₀ değerleri Çizelge 4.4’de sunuldu. Bu sonuçlara göre; 24 saat sonunda, tüm fraksiyonların, kullanılan konsantrasyonlarda iki hücre hattı üzerinde sitotoksik olmadığı bulundu (IC₅₀ >100 µg/ml). Bunun aksine, 48 saatlik tedavi sonrası, hücre hatlarında sadece E2 kodlu fraksiyonun sitotoksik etkisi saptandı. DU 145 ve PC-3 hücrelerinin bu fraksiyona karşı neredeyse eşit seviyede duyarlı olduğu gözlemlendi (IC₅₀ dozları; 79,24 µg/ml ve 68,87 µg/ml, sırasıyla). Daha uzun süreli tedavinin daha düşük IC₅₀ değerlerine neden olduğu gösterilerek, 72. saatte E2 kodlu fraksiyon için her iki hücre hattında da en düşük IC₅₀ dozları elde edildi (IC₅₀ dozları; DU 145 için 67,82 µg/ml ve PC-3 için 52,24 µg/ml). 72 saatlik tedaviden sonra, diğer fraksiyonların (E1, E3 ve E4), DU 145 hücrelerine karşı olası bir sitotoksik aktivitesi belirlenmezken PC-3 hücrelerinde E2 kodlu fraksiyonun yanı sıra E3 kodlu fraksiyonun da önemli bir etkiye sahip olduğu görüldü. Sonuçlar ele alındığında, daha düşük IC₅₀ değerleri elde edilmesi nedeniyle, PC-3 hücrelerinin çalışılan fraksiyonlara DU 145 hücrelerinden daha duyarlı olduğu sonucuna varıldı.

Çizelge 4.4’de özetlendiği üzere, tüm kaba fraksiyonların sitotoksik aktiviteleri farklı konsantrasyon aralıklarında ham ekstrenin sitotoksik aktivitesi ile karşılaştırıldı. DU 145 hücrelerinde, E2 kodlu fraksiyonun E kodlu ekstre ile benzer seviyede sitotoksik etki gösterdiği bulundu. Aksine; E1, E3 ve E4 kodlu fraksiyonların sitotoksik ve/veya antiproliferatif (sitostatik) etki bakımından ekstreten daha az potansiyele sahip olduğu gözlemlendi. PC-3 hücre hattında ise, E2 ve E3 kodlu fraksiyonların ekstrete göre daha

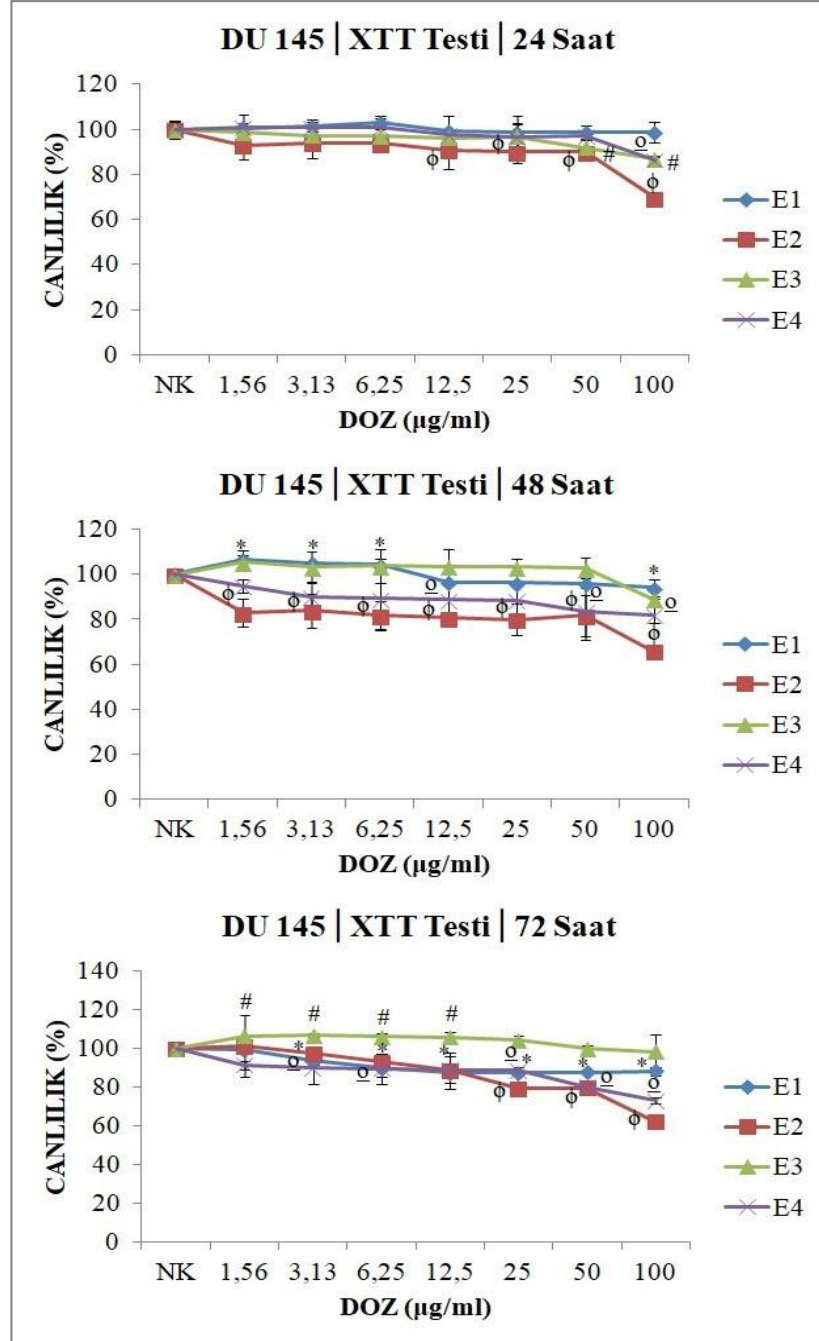
yüksek sitotoksik aktivite sergilemesi dikkat çekici bir sonuç oldu. Öte yandan; E1 ve E4 kodlu fraksiyonların, tedavi süresi boyunca ekstre kadar önemli bir etki gösteremediği tespit edildi.

XTT hücre canlılık testi bulguları

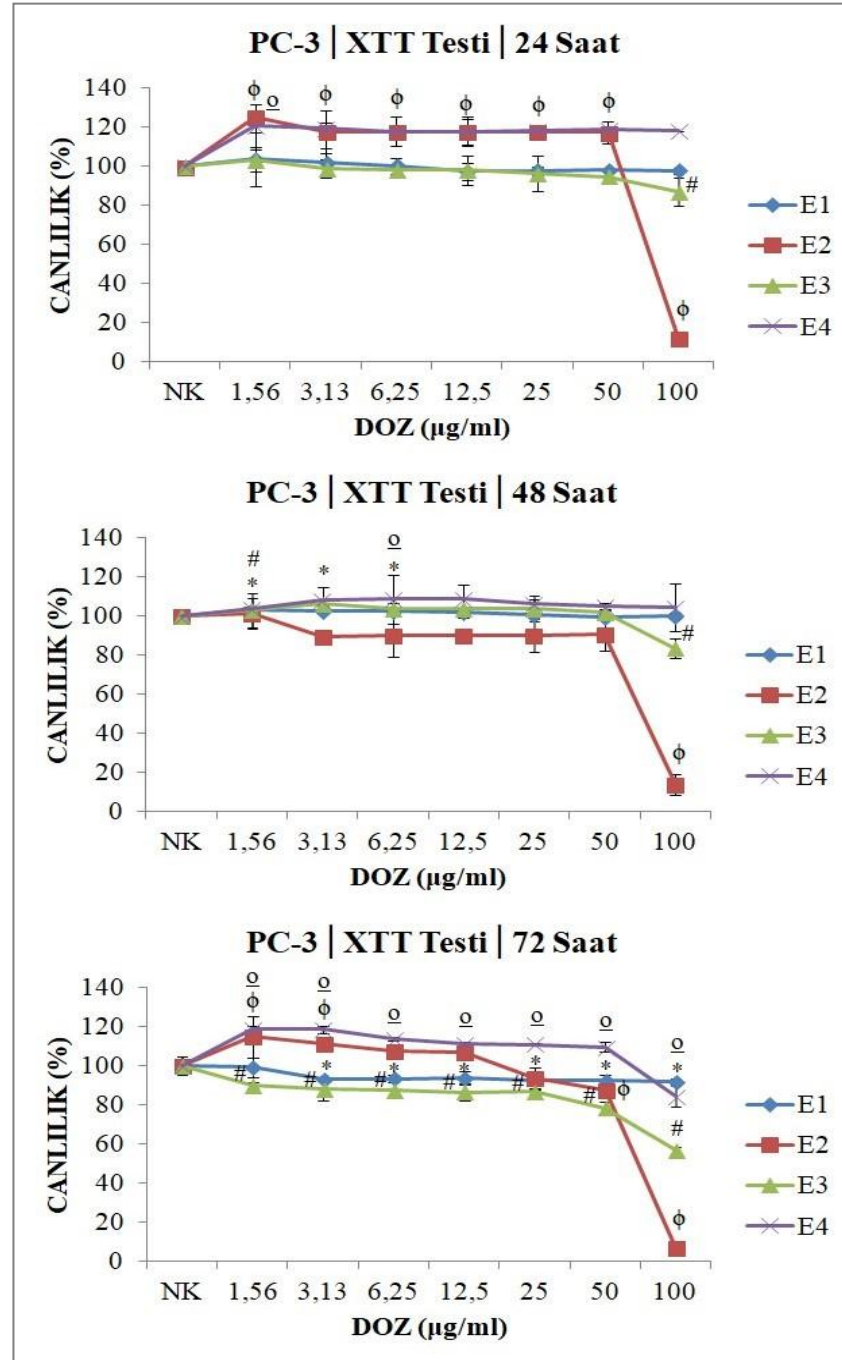
SRB testi bulgularından hareketle, kaba fraksiyonlar için elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla XTT hücre canlılık testinin yürütülmesine karar verildi. Bu nedenle; 24, 48 ve 72 saat boyunca, tüm fraksiyonların DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri aynı doz aralığında (1,56-100 µg/ml) test edildi. Farklı fraksiyon konsantrasyonlarının DU 145 ve PC-3 hücrelerine karşı etkisi, sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da sunuldu. Analiz sonuçlarına göre; E2 kodlu fraksiyonun varlığında, DU 145 hücre canlılıklarında doza ve zamana bağlı olarak anlamlı azalışlar ($p<0,05$) tespit edilmesine rağmen, canlılık oranlarının en yüksek konsantrasyonda dahi %50'nin altına düşmediği görüldü. Bu sonuç, E2 kodlu fraksiyonun DU 145 hücrelerinde sitotoksik etkiden ziyade antiproliferatif/sitostatik ölçekte etkili olduğu anlamına gelmektedir. Diğer fraksiyonlar (E1, E3 ve E4 kodlu) ise, DU 145 hücre çoğalmasını, nispeten yüksek dozlarda, kısmen baskılayarak antiproliferatif/sitostatik şekilde etki gösterdi (Şekil 4.8).

PC-3 hücreleri için elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; DU 145 hücrelerindeki duruma benzer şekilde, en etkili fraksiyonun E2 kodlu fraksiyonun olduğu, ancak bu fraksiyonun PC-3 hücrelerinde daha iyi aktivite sergilediği görüldü. Şekil 4.9'da gösterildiği gibi, PC-3 hücre hattı için E2 kodlu fraksiyonunun 100 µg/ml'lik konsantrasyonunda, negatif kontrole kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki söz konusudur ($p<0,05$). 24, 48 ve 72 saat boyunca, sözü edilen fraksiyonun, daha düşük dozlarda proliferatif bir etki göstermesi, fakat 100 µg/ml doza ulaşıldığında hücre canlılığının ani ve belirgin bir şekilde %50'nin altına düşmesi dikkat çekici bir sonuçtur. PC-3 hücre hattında, E2 kodlu fraksiyondan sonra en iyi aktivite E3 kodlu fraksiyon için kaydedildi. Ancak, bu fraksiyon, 24-48 saat aralığında hücre büyümesini baskılayarak antiproliferatif/sitostatik etkinlik gösterdi. E1 kodlu fraksiyon için zayıf ancak istatistiksel olarak en anlamlı antiproliferatif/sitostatik etki, 72. saatte ölçüldü. E4

kodlu fraksiyonda saptanan kayda değer tek etki, 72 saatlik inkübasyon sonrası 100 µg/ml'lik doz için elde edilen antiproliferatif/sitostatik ölçekli etkidir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. DU 145 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, kaba fraksiyon uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. *, φ, # ve o Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.



Şekil 4.9. PC-3 hücrelerine kaba fraksiyonların uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, kaba fraksiyon uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. *, ϕ , # ve \square Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Ham ekstrenin ve bu ekstreya ait kaba fraksiyonların, her iki hücre hattı için elde edilen IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.5’de verildi. DU 145 hücre hattı için; 24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen tüm fraksiyonların (E1, E2, E3 ve E4) IC₅₀ değerleri uygulanan doz aralıklarının dışındadır (IC₅₀ >100 µg/ml). E2 kodlu fraksiyonun 100 µg/ml’lik dozunun varlığında, DU 145 hücre canlılıkları önemli oranda azalmasına karşın, sitotoksik olarak bir etki gözlenmedi (hücre canlılıkları, 24. saatte %69,60; 48. saatte %65,91 ve 72. saatte %62,23). PC-3 hücrelerinde, E2 kodlu fraksiyon dışındaki fraksiyonlar için test edilen doz aralığında IC₅₀ değeri hesaplanamadı (IC₅₀ >100 µg/ml). PC-3 hücreleri için fraksiyonlar arasında sitotoksik açıdan en aktif fraksiyon, E2 kodlu fraksiyon olarak belirlendi. PC-3 hücrelerinde, bu fraksiyona ait IC₅₀ dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik tedaviler arasında önemli farklılıklar gösterdiği bulundu. 3 farklı tedavi süresi sonunda elde edilen IC₅₀ değerleri birbirine yakın olmakla birlikte en düşük IC₅₀ değerine 72. saat sonunda ulaşıldı (IC₅₀ değeri: 73,22 µg/ml). E3 kodlu fraksiyon 100 µg/ml’lik dozda, özellikle 72 saatlik tedaviden sonra, PC-3 hücre canlılığını önemli oranda düşürmesine rağmen (%56,63) sitotoksik olarak etki gösteremedi. XTT testiyle elde edilen veriler kıyaslandığında, PC-3 hücrelerinin fraksiyonlara karşı DU 145 hücrelerinden daha hassas olduğu görüldü.

Çizelge 4.5. *Epilobium hirsutum* L. kaba fraksiyonlarının XTT testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)					
	DU 145			PC-3		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kaba fraksiyonlar						
E1	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E2	>100	>100	>100	81,87	76,47	73,22
E3	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E4	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ham ekstre						
E	>100	85,93	64,58	>100	81,67	53,23

Çizelge 4.5’de verildiği gibi, tüm kaba fraksiyonların ve E kodlu ham ekstrenin sitotoksik potansiyellerinin kıyaslanması, elde edilen IC₅₀ değerlerine göre yapıldı. XTT testi sonuçlarına göre, taranan tüm fraksiyonların DU 145 hücreleri üzerinde ham ekstre kadar sitotoksik aktivite göstermediği belirlendi. PC-3 hücrelerinde; E1, E3 ve E4 kodlu

fraksiyonların ham ekstreden daha zayıf aktivite sergilediği bulundu. E2 kodlu fraksiyonun ise PC-3 hücreleri karşısında ekstre ile kıyaslanabilir değerde sitotoksik etki gösterdiği saptandı. 24. ve 48. saatlerde, E2 kodlu fraksiyon için ekstreden daha düşük IC₅₀ değerleri elde edildi ve bu fraksiyonun ekstreden nispeten iyi bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Ancak, PC-3 hücrelerinde 72 saat sonunda ekstrenin E2 kodlu fraksiyona kıyasla daha güçlü sitotoksik etkiye neden olduğu görüldü.

Sitotoksikite deneyleri kapsamında elde edilen tüm sonuçlar ışığında; kaba fraksiyonların prostat kanseri hücrelerine karşı E kodlu ekstre kadar etkili olmadığı, ancak kaba fraksiyonlar arasından E kodlu ekstreye en yakın etkiyi E2 kodlu fraksiyonun gösterdiği bulunmuştur. E kodlu ham ekstrede bulunan etken maddelerin veya bileşiklerin birlikte bulduklarında sinerjik etki gösterdikleri açıktır. Kaba fraksiyonların E kodlu ekstreden daha zayıf sitotoksik etkinliğe sahip olması nedeniyle, alt fraksiyonlama çalışmasının yapılmamasına karar verilmiştir. Bu bağlamda, ileri analizlere E kodlu ekstre ve E2 kodlu fraksiyon ile devam edilmesi planlanmıştır.

4.2.3. Unotein B'nin sitotoksik etkisine ilişkin bulgular

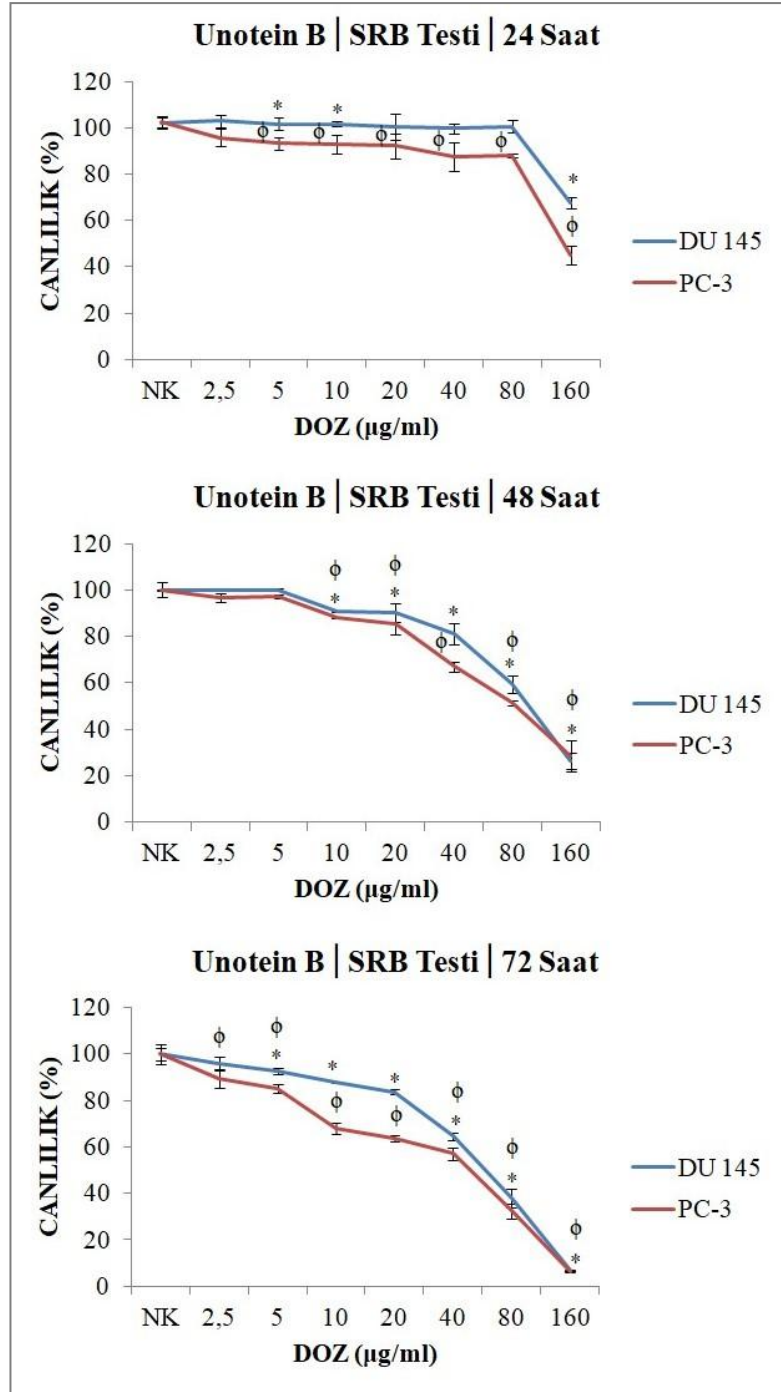
Tez çalışmasında kullanılan unotein B'nin DU 145 ve PC-3 hücre canlılıkları üzerindeki etkisi, kaba fraksiyonlar ile eş zamanlı olarak analiz edildi. Unotein B'nin muhtemel aktivitesinin tespiti için kolorimetrik testler olan SRB ve XTT hücre canlılık testlerinden yararlanıldı.

SRB hücre canlılık testi bulguları

Unotein B'nin farklı konsantrasyonlarına (2,5-160 µg/ml) maruz bırakılan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin canlılık oranlarındaki değişim; 24, 48 ve 72 saat sonra SRB deneyi ile belirlendi. Unotein B'nin, negatif kontrole oranla, DU 145 hücre canlılıklarında hem doza hem de zamana bağlı olarak anlamlı azalışlara neden olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 4.10). 24 saatlik tedaviyi takiben unotein B'nin, uygulanan tüm dozlarda, DU 145 hücre hattına karşı sitotoksik etkisi belirlenemedi. Bu süre zarfında elde edilen tek kayda değer sonuç, en yüksek dozdaki (160 µg/ml) antiproliferatif/sitostatik ölçekli etkidir. Daha uzun süreli tedavinin sonucu olarak, 48. ve 72. saatlerde unotein B'nin

DU 145 hücreleri üzerinde daha güçlü sitotoksik aktivite sergilediği saptandı. 48. saatte, 160 µg/ml'lik en yüksek konsantrasyonun; 72. saatte ise 160 ve 80 µg/ml'lik konsantrasyonların önemli ölçüde hücre ölümüne (sitotoksositeye) neden olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, daha düşük dozlarda antiproliferatif/sitostatik etki kaydedildi.

24, 48 ve 72 saat boyunca unotein B uygulanan PC-3 hücreleri için DU 145 hücrelerine benzer bir sitotoksosite grafiği elde edildi (Şekil 4.10). Unotein B'nin PC-3 hücre canlılığını, negatif kontrole kıyasla, doza ve zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azalttığı görüldü ($p<0,05$). Ancak, bu bileşiğin tüm çalışma dozlarında sitotoksik etki söz konusu değildir. 24 ve 48 saatlik tedavilerden sonra sadece en yüksek konsantrasyonda (160 µg/ml) sitotoksik aktivite incelenirken, 72 saatlik tedaviyi takiben en yüksek iki konsantrasyonda da (160 ve 80 µg/ml) sitotoksik etki tespit edildi. Bunun yanı sıra, tedavi süresince daha düşük dozların antiproliferatif/sitostatik bakımdan PC-3 hücrelerine karşı önemli bir etkinlik gösterdiği kaydedildi.



Şekil 4.10. DU 145 ve PC-3 hücrelerine unotein B uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, unotein B uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * ve φ Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Çalışmada kullanılan unotein B'nin DU 145 ve PC-3 hücreleri için elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.6'da gösterildi. Elde edilen IC₅₀ sonuçlarına göre; iki hücre hattında 24, 48 ve 72 saatlik tedaviler arasında önemli farklılıklar belirlendi. Bu bulgu; uzun süreli tedavilerin, sitotoksik ajanların etkinliğini arttırdığını ve daha düşük IC₅₀ değerlerinin elde edilmesini açıklamaktadır. 24 saat sonra hesaplanan IC₅₀ değerleri, DU 145 hücreleri için doz aralığı dışındayken (>160 µg/ml) PC-3 hücre hattı için 150,64 µg/ml'dir. 48 saatlik tedavinin ardından unotein B'nin, DU 145 hücrelerindeki IC₅₀ dozu 103,12 µg/ml, PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ dozu ise 84,93 µg/ml olarak bulundu. 72. saatte DU 145 ve PC-3 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 61,74 µg/ml ve 51,43 µg/ml'dir. PC-3 hücreleri için elde edilen IC₅₀ dozlarının DU 145 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ dozlarından görece daha düşük olması nedeniyle PC-3 hücrelerinin unotein B'ye daha duyarlı olduğu söylenebilmektedir.

Çizelge 4.6. Unotein B'nin SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

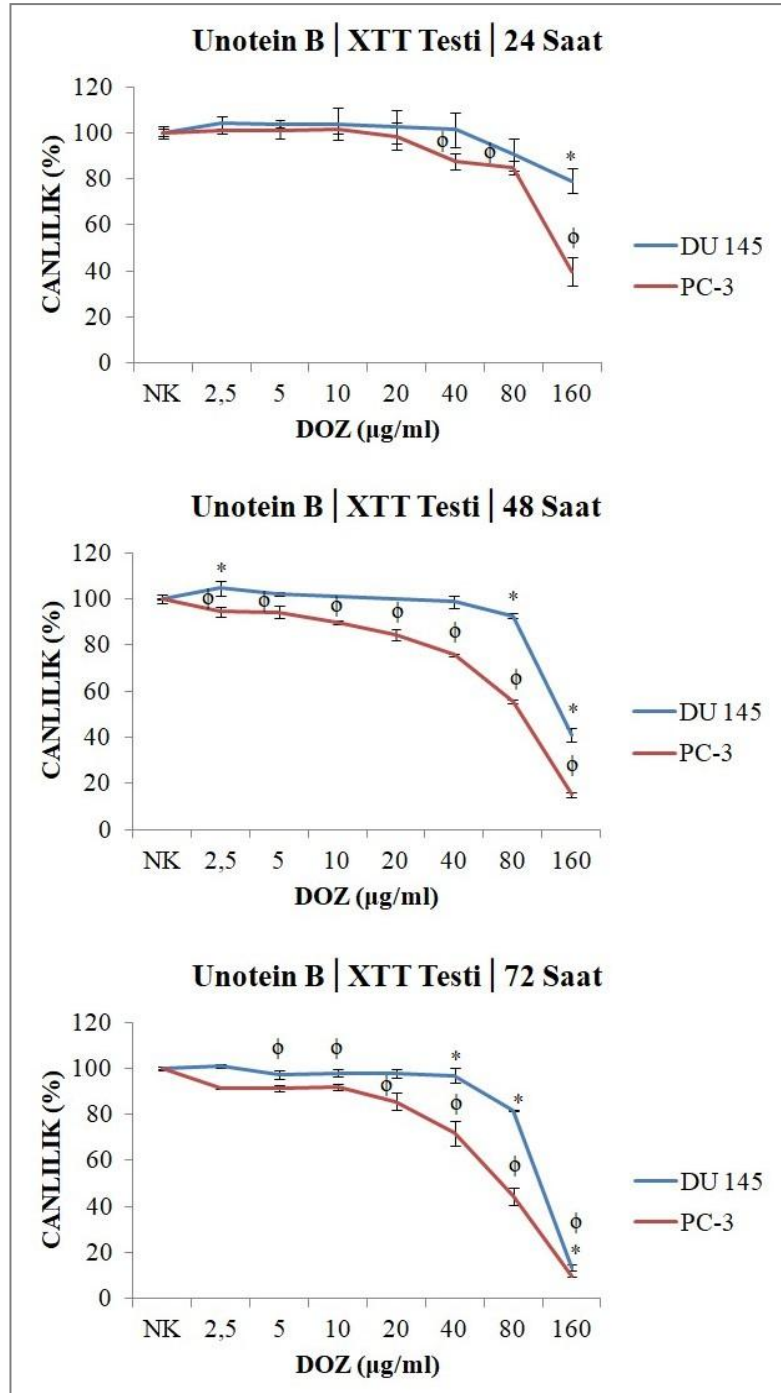
	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
DU 145	>160	103,12	61,74
PC-3	150,64	84,93	51,43

XTT hücre canlılık testi bulguları

SRB testi ile sağlanan bulguları teyit etmek amacıyla aynı deneysel şartlar altında XTT hücre canlılık testi yürütüldü. Bu bağlamda; DU 145 ve PC-3 hücre hatlarına, 24, 48 ve 72 saat boyunca artan dozlardaki (2,5-160 µg/ml) unotein B uygulandı ve süre bitiminde hücre canlılıklar incelendi. Analiz sonuçlarına göre; negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, unotein B'nin her iki hücre canlılığında da doza ve zamana bağlı olarak anlamlı azalışlara neden olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.11). Fakat PC-3 hücre canlılıklarındaki düşüşün, DU 145 hücrelerinden istatistiksel olarak daha önemli olduğu görüldü. DU 145 hücrelerinde, ilk 24 saatlik tedavide unotein B'nin uygulanan tüm dozlarda sitotoksik olmadığı, ancak en yüksek dozunda (160 µg/ml) zayıf ancak istatistiksel olarak önemli bir antiproliferatif/sitostatik etki gösterdiği incelendi. 48. ve 72. saatlerde ise yalnızca 160 µg/ml'lik en yüksek konsantrasyonda sitotoksik aktivite gözlemlendi. Bu zaman aralıklarında, daha düşük dozların (<160 µg/ml) DU 145

hücrelerine karşı zayıf da olsa antiproliferatif/sitostatik etki gösterdiği sonucuna ulaşıldı.

DU 145 hücrelerinden farklı olarak, unotein B'nin PC-3 hücreleri üzerinde daha etkili olduğu gözlemlendi. Sözü edilen bileşik, konsantrasyon ve inkübasyon süresi artışına bağlı olarak PC-3 hücre canlılıklarında, negatif kontrole kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep oldu ($p<0,05$) (Şekil 4.11). PC-3 hücrelerinde, 24 ve 48 saatlik tedaviyi takiben sitotoksik olarak etkisi ölçülen unotein B konsantrasyonu 160 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. 72. saatte, bu hücre hattı için unotein B bileşiğinin sitotoksik etkisi 160 ve 80 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda elde edildi. Ayrıca, PC-3 hücrelerinde, bu bileşiğin düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif/sitostatik olarak daha güçlü aktivite sergilediği belirlendi.



Şekil 4.11. DU 145 ve PC-3 hücrelerine unotein B uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, unotein B uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * ve ϕ Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

DU 145 ve PC-3 hücreleri için XTT testi sonuçlarına göre hesaplanan unotein B'ye ait IC₅₀ değerleri Çizelge 4.7'de gösterildi. SRB testi sonuçlarına uygun olarak, XTT testiyle en düşük IC₅₀ değerleri 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edildi. 24 saatte, unotein B için DU 145 hücrelerinde IC₅₀ değeri hesaplanamazken (>160 µg/ml), PC-3 hücrelerinde elde edilen IC₅₀ değeri 142,05 µg/ml'dir. 48 saat sonra, DU 145 ve PC-3 hücreleri için belirlenen IC₅₀ dozları arasında önemli fark bulunmaktadır (IC₅₀ değerleri: 146,19 µg/ml ve 91,38 µg/ml, sırasıyla). Benzer sonuç, 72 saatlik tedavi sonucu hesaplanan IC₅₀ değerlerinde de mevcuttur. Nitekim 72. saatte DU 145 ve PC-3 hücrelerinde unotein B için tespit edilen IC₅₀ sonuçları, sırasıyla, 117,26 µg/ml ve 72,06 µg/ml'dir. XTT testi bulgularından hareketle, unotein B'nin PC-3 hücrelerine karşı daha güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.7. Unotein B'nin XTT testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
DU 145	>160	146,19	117,26
PC-3	142,05	91,38	72,06

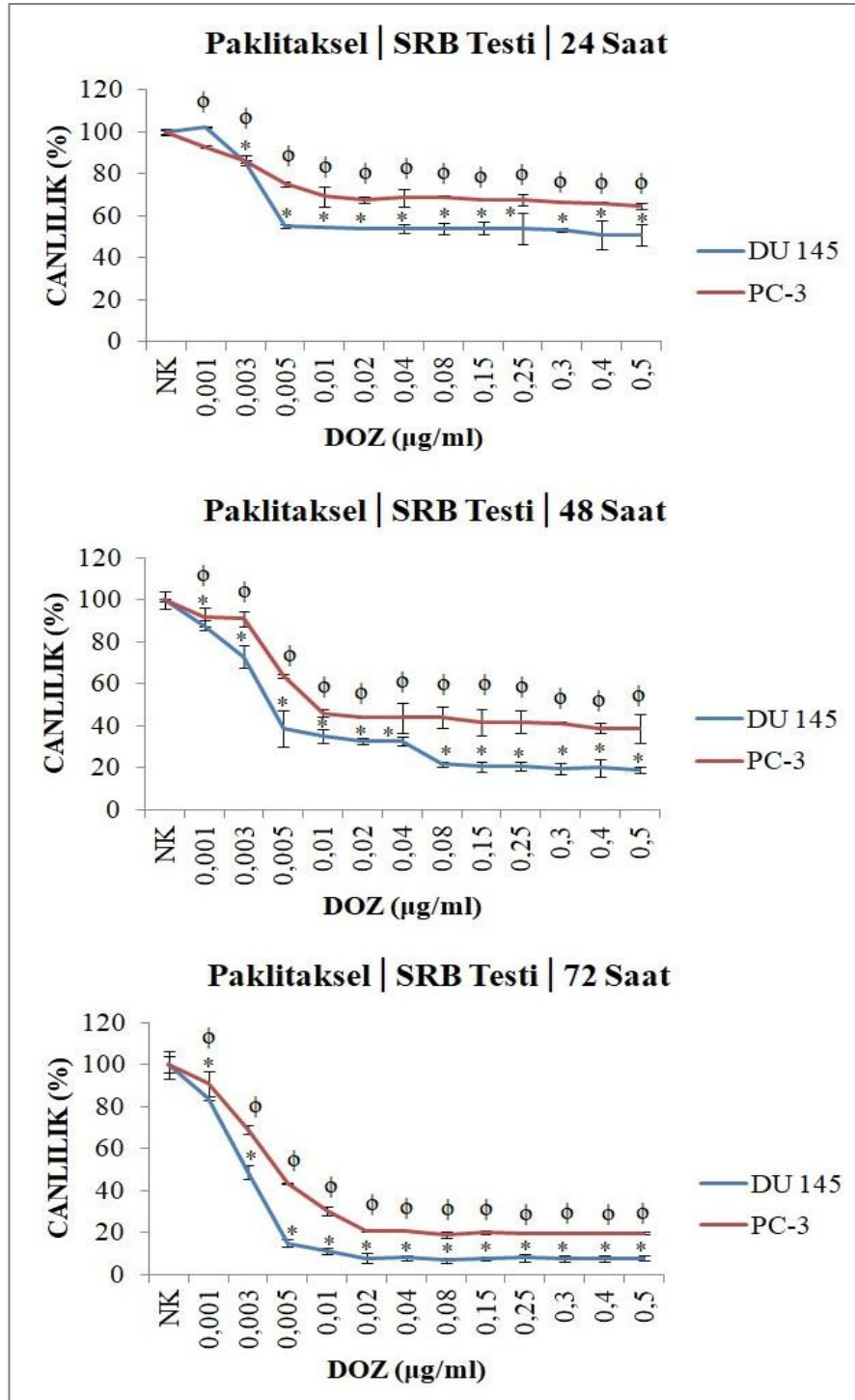
Sonuç olarak, tez çalışmasında kullanılan unotein B'nin prostat kanseri hücre hatları üzerindeki potansiyel etkilerini *in vitro* olarak çalışmak üzere hem SRB hem de XTT hücre canlılık testi yürütüldü. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki test ile ulaşılan verilerin birbiriyle uyumlu olduğu görüldü. Bununla birlikte, SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ değerlerinin nispeten daha düşük olduğu bulundu. Unotein B bileşiği ile tedaviye PC-3 hücrelerinin daha duyarlı gözlemlendi.

4.2.4. Paklitaksel'in sitotoksik etkisine ilişkin bulgular

DeneySEL çalışmalarda, pozitif kontrol olarak kemoterapötik bir ilaç olan paklitaksel kullanıldı. Paklitakselin farklı konsantrasyonlarda DU 145 ve PC-3 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi, SRB ve XTT hücre canlılık testleri çalışılarak değerlendirildi.

SRB hücre canlılık testi bulguları

Paklitakselin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki doza ve zamana bağlı sitotoksik aktivitesi Şekil 4.12’de gösterildi. SRB hücre canlılık testi sonuçlarına göre; 0,001-0,5 µg/ml aralığındaki tüm dozlarda, negatif kontrole oranla, hücre canlılıklarının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). 24 saat sonra, hem DU 145 hem de PC-3 hücrelerinde doz artışına bağlı olarak canlılık yüzdelerinin ciddi anlamda düştüğü, ancak en yüksek konsantrasyonda (0,5 µg/ml) dahi sitotoksik etki elde edilemediği gözlemlendi. Bu nedenle, paklitakselin 24 saatlik tedavi sonundaki etkisinin büyüme baskılayıcı yönde (antiproliferatif/sitostatik) olduğu belirtilebilir. 48 saat sonra, paklitaksel dozlarının büyük çoğunluğunda iki hücre hattı için önemli sitotoksik etkiler kaydedildi. DU 145 hücreleri için, paklitakselin en düşük iki konsantrasyonunda (0,001 ve 0,003 µg/ml) tespit edilen etki, antiproliferatif/sitostatik kapsamda olup diğer yüksek dozlarda önemli sitotoksik aktivitelerin var olduğu görüldü. Özellikle, paklitaksel konsantrasyonu 0,005 µg/ml’ye ulaştığında DU 145 hücre canlılıklarının ciddi bir biçimde düştüğü tespit edildi. PC-3 hücrelerinde ise; 0,001, 0,003 ve 0,005 µg/ml konsantrasyonları dışındaki paklitaksel dozlarında dikkate değer sitotoksik etkiler saptandı. Fakat 0,01 µg/ml’lik konsantrasyondan sonra, doz artışına rağmen hücre canlılık yüzdelerinde önemli bir azalış olmadığı, nispeten sabit kaldığı gözlemlendi. Etki süresine bağlı olarak, iki hücre hattı için en güçlü sitotoksik etkiler 72. saat sonunda elde edildi. DU 145 hücrelerinde, en düşük paklitaksel dozu (0,001 µg/ml) haricindeki tüm dozlarda güçlü sitotoksik etkiler söz konusu iken PC-3 hücrelerinde paklitakselin sitotoksik etkinliğinin 0,005 µg/ml’lik konsantrasyonda başladığı görülmektedir. Paklitakselin uygulanmasından 72 saat sonra, konsantrasyona bağlı olarak DU 145 ve PC-3 hücrelerinin ölmesiyle canlılık değerlerinin anlamlı bir şekilde düştüğü incelendi. Ancak 0,02 µg/ml’lik dozdan itibaren iki hücre hattına ait canlılık oranlarının neredeyse aynı yüzdelerde devam ettiği ve tedavi süresi boyunca sözü edilen hücrelerin tamamının ölmediği gözlemlendi.



Şekil 4.12. DU 145 ve PC-3 hücrelerine paclitaxel uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, Paclitaxel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * ve φ Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Paklitaksel uygulanan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin SRB hücre canlılık testi sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.8’de sunuldu. Tedaviden 24 saat sonra, paklitakselin DU 145 ve PC-3 hücrelerine karşı fark edilir bir etkisi olmakla beraber bu hücre hatlarında paklitaksel için IC₅₀ dozu elde edilemedi (>0,5 µg/ml). Bu etkinin aksine, hücre canlılıklarının 48. saatte keskin bir hızla azaldığı belirlendi. Buna bağlı olarak, paklitakselin DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla, 0,0043 µg/ml ve 0,0089 µg/ml olarak bulundu. Bu çalışma kapsamında, daha önce analiz edilmiş test bileşiklerine (ekstre, fraksiyon ve unotein B) dair bulgularda ifade edildiği gibi, daha uzun süreli tedavilerin sitotoksik aktiviteye olumlu bir etki sağladığı görülmektedir. 72 saatlik tedavinin ardından paklitakselin; DU 145 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 0,0029 µg/ml iken, PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 0,0045 µg/ml’dir. Bu sebeple, paklitaksel için en düşük IC₅₀ değerleri dolayısıyla en güçlü sitotoksik aktiviteler 72 saatin sonunda elde edildi. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, hesaplanan IC₅₀ değerlerinin DU 145 hücrelerinde daha düşük olması nedeniyle bu hücre hattının paklitaksel tedavisine daha duyarlı olduğu söylenebilmektedir.

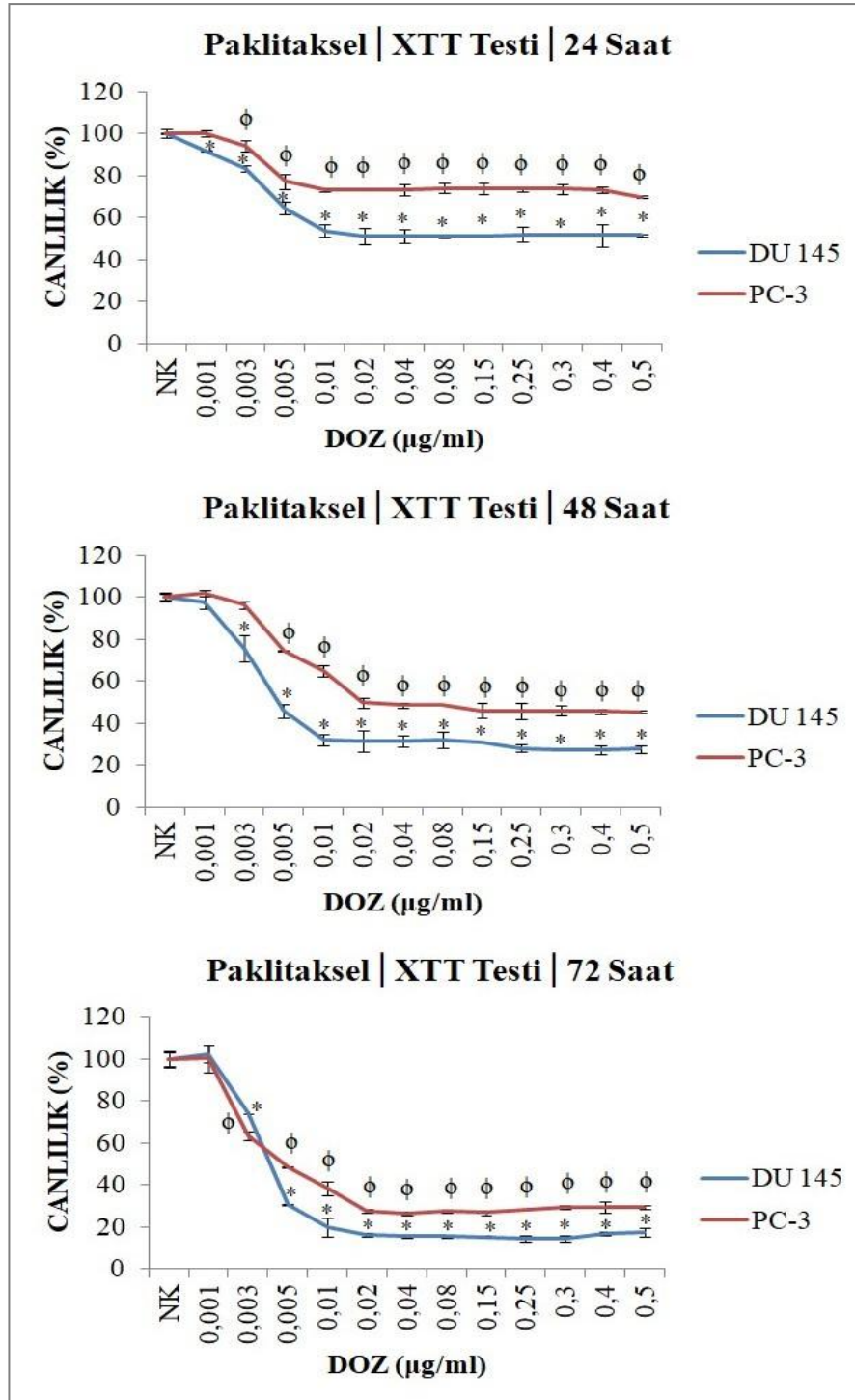
Çizelge 4.8. Paklitakselin SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
DU 145	>0,5	0,0043	0,0029
PC-3	>0,5	0,0089	0,0045

XTT hücre canlılık testi bulguları

SRB testiyle elde edilen bulgular doğrultusunda, pozitif kontrol olarak çalışılan paklitakselin mevcut sitotoksik aktivitesinin XTT hücre canlılık testi ile doğrulanmasına karar verildi. Bu amaçla, 0,001-0,5 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan paklitakselin, DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saat boyunca aynı ortam koşulları altında araştırıldı. Şekil 4.13’de verildiği gibi, negatif kontrol grupları ile kıyaslandığında, DU 145 ve PC-3 hücre canlılıklarındaki doza ve zamana bağımlı azalışların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu saptandı ($p<0,05$). 24 saatlik tedaviyi takiben, DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki proliferasyonun doz artışıyla orantılı olarak baskılandığı ve güçlü antiproliferatif (sitostatik) etkinin mevcut olduğu

bulundu. Tedavi süresinin etkisine dayalı olarak, 48. saatte sitotoksik aktivite adına her iki hücre hattı için de daha iyi veriler elde edildi. DU 145 hücrelerinde, paklitakselin 0,005 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik etkinin söz konusu olduğu ve etkinin doz artışı ile paralel olarak arttığı görüldü. Bununla beraber, 0,01 µg/ml'lik dozdan itibaren giderek artan dozlarda, sitotoksik etkinin benzer seviyede devam ettiği ve hücresel canlılıkların neredeyse aynı yüzdede seyrettiği belirlendi. PC-3 hücreleri için, 48 saatlik tedavide 24. saate göre daha iyi aktiviteler elde edildi. 0,02-0,5 µg/ml doz aralığında önemli sitotoksik etkiler gözlenmekle birlikte, özellikle yüksek dozlarda, hücre canlılıklarında belirgin bir değişiklik tespit edilemedi. Paklitaksel ile 72 saatlik inkübasyon sonrası, iki hücre hattında da sitotoksik etkinin incelendiği konsantrasyon aralığı; 0,005-0,5 µg/ml'dir. PC-3 hücre canlılıklarının 0,02 µg/ml'lik doza kadar önemli derecede azaldığı, fakat bu dozdan sonra canlılık değerlerinin tedavi periyodu sonuna dek değişmeden kaldığı görüldü.



Şekil 4.13. DU 145 ve PC-3 hücrelerine paclitaxel uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana bağlı olarak değişimi. NK, paclitaxel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * ve φ Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre farklı dozlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Paklitakselin prostat kanseri hücre hatları karşısındaki mevcut sitotoksik etkisini teyit etmek amacıyla uygulanan XTT hücre canlılık testi sonuçlarının SRB testi verileriyle uyumlu olduğu belirlendi. Çizelge 4.9'da gösterildiği üzere, paklitaksele maruz bırakılan DU 145 ve PC-3 hücreleri için 24. saat sonunda IC₅₀ değerleri tespit edilemedi. 48 saatlik tedavi sonrası, çalışılan doz aralığında paklitaksel için önemli sitotoksik etkiler saptanmış olup hesaplanan IC₅₀ değerleri; DU 145 hücrelerinde 0,0047 µg/ml, PC-3 hücrelerinde 0,0198 µg/ml'dir. Tedavi süresinin ilerlemesiyle orantılı olarak sitotoksosite açısından en iyi verilere 72. saat sonunda ulaşıldı. 72 saat boyunca paklitaksel ile muamele edilen DU 145 ve PC-3 hücreleri için elde edilen IC₅₀ dozları sırasıyla, 0,0041 µg/ml ve 0,0048 µg/ml'dir. XTT testi sonuçlarından hareketle; 48 saatlik sürede PC-3 hücre hattının, 72 saatlik periyotta ise iki hücre hattının eşit seviyede paklitaksele karşı duyarlılık gösterdiği söylenebilmektedir.

Çizelge 4.9. Paklitakselin XTT testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

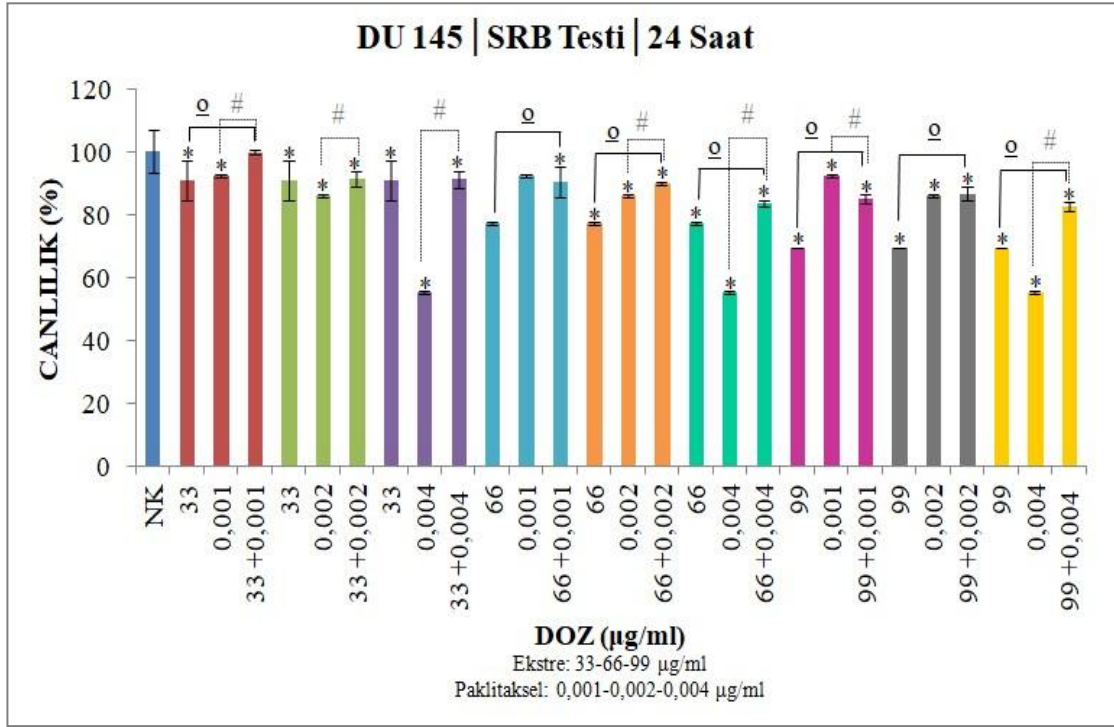
	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
DU 145	>0,5	0,0047	0,0041
PC-3	>0,5	0,0198	0,0048

4.2.5. Kombinasyon analizine ilişkin bulgular

E. hirsutum ekstresi (E kodlu) ile paklitaksel kombinasyonunun DU 145 ve PC-3 hücre hatlarındaki sitotoksik potansiyeli, SRB ve XTT hücre canlılık testleri kullanılarak tespit edildi. Kombinasyon çalışmasında, E kodlu bitki ekstresi ve paklitaksel için SRB ve XTT hücre canlılık testleriyle belirlenen IC₅₀ değerlerinin 1:2 oranda dilüe edilmesiyle hazırlanan farklı kombinasyon dozları kullanıldı (bkz. Çizelge 3.8). Analiz için DU 145 ve PC-3 hücreleri ekstre ve paklitaksel dozları ile eş zamanlı tedaviye bırakıldı. 24, 48 ve 72 saat sonra kombine etkiler, ekstrenin ve paklitakselin ayrı olarak gösterdiği sitotoksik aktiviteler ile karşılaştırıldı.

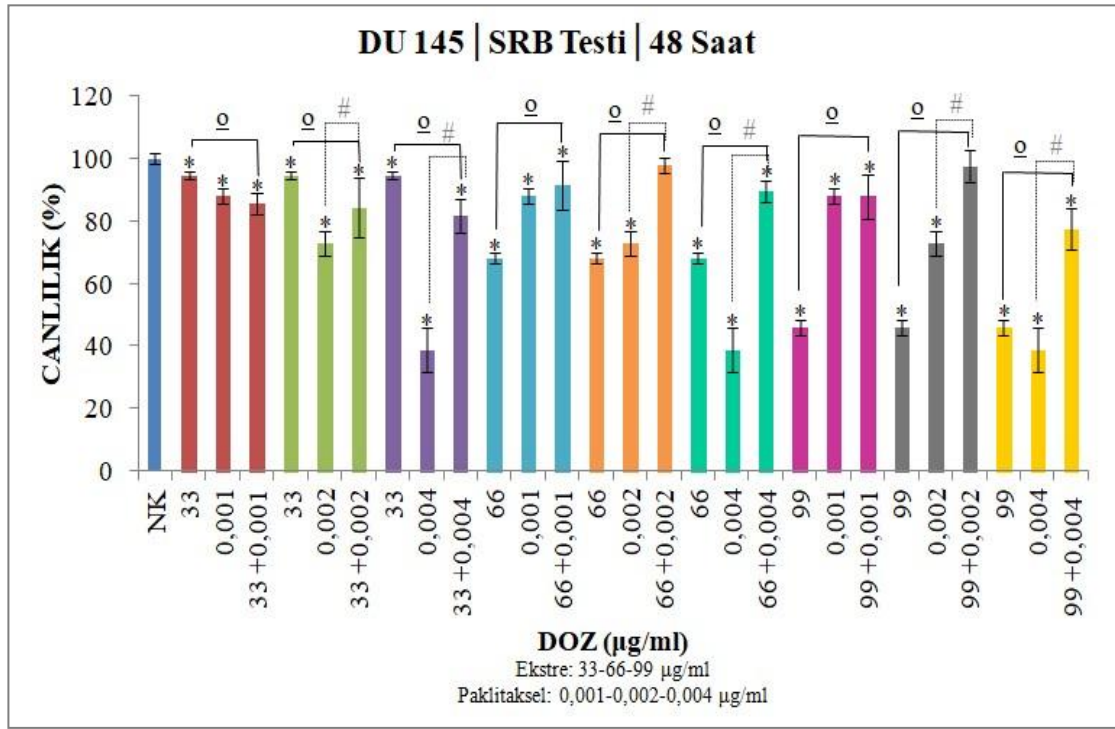
SRB hücre canlılık testi bulguları

Ekstre - paklitaksel kombinasyon etkilerini değerlendirmek amacıyla ilk olarak SRB hücre canlılık testiyle analiz gerçekleştirildi. DU 145 hücrelerinde, 24 saat sonra, ayrı olarak uygulanan ekstrenin ve paklitakselin hücre canlılıklarında, negatif kontrole kıyasla, doza bağımlı olarak anlamlı azalışlara neden olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.14). Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, kombinasyon tedavisinin, hücre canlılıklarında anlamlı fakat daha zayıf azalmalara neden olduğu bulundu ($p<0,05$). Ancak bu süre boyunca, ekstre ve paklitakselin hem ayrı hem kombine olarak çalışıldığı hücre gruplarında hiçbir sitotoksik aktivite saptanmadı.



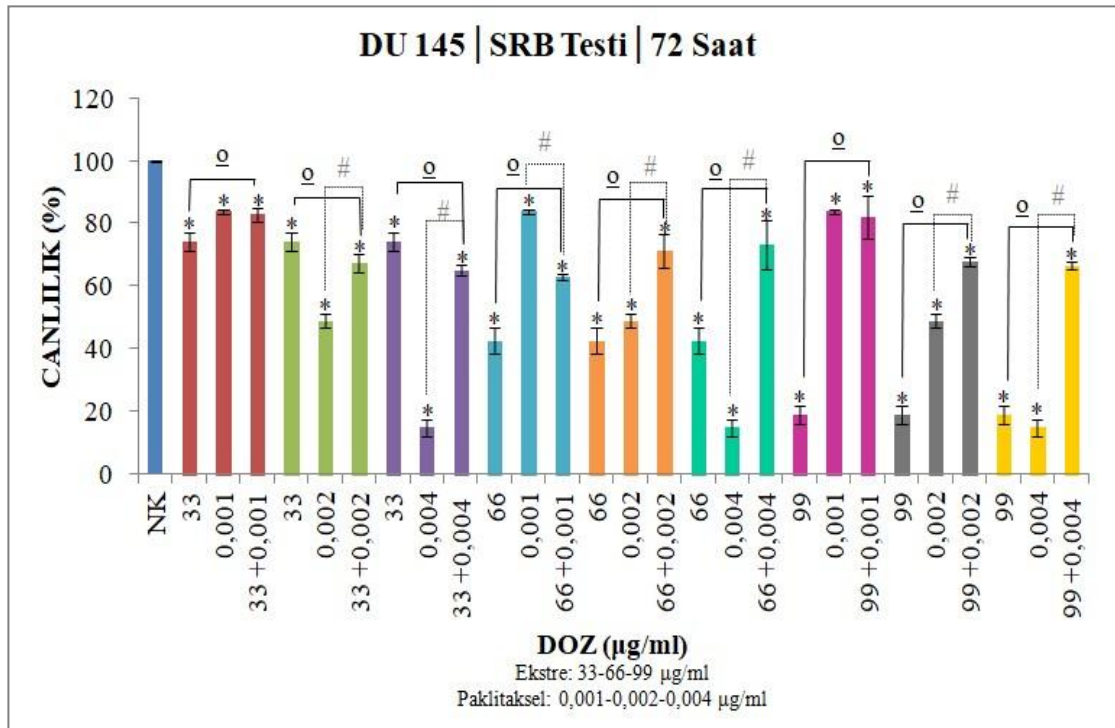
Şekil 4.14. DU 145 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

48 saatlik tedaviyi takiben, ekstrenin ve paklitakselin birbirinden ayrı şekilde DU 145 hücre canlılıklarında, negatif kontrole kıyasla, doza bağlı anlamlı düşüişlere neden olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.15). 66+0,002 $\mu\text{g/ml}$ ve 99+0,002 $\mu\text{g/ml}$ kombinasyonlarının hücre canlılıklarında neden olduğu farklılıkların negatif kontrole göre anlamlı olmadığı bulundu ($p>0,05$). Bu tedavi süresinde, sadece 33+0,001 $\mu\text{g/ml}$ kombinasyonunun uygulandığı DU 145 hücrelerinde canlılık oranının kısmen azaldığı görüldü ($p<0,05$). Diğer kombinasyon gruplarında ise; ekstrenin ve paklitakselin, DU 145 hücrelerine karşı birlikte gösterdikleri etkinin, tek başına sergiledikleri etkiden daha zayıf olduğu saptandı. 48 saat sonunda, DU 145 hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerin gözlendiği 99 $\mu\text{g/ml}$ ekstre ile 0,004 $\mu\text{g/ml}$ paklitakselin kombine edildiklerinde sitotoksik etkinin kaybolduğu ve canlılık oranın %77,38 olduğu görüldü.



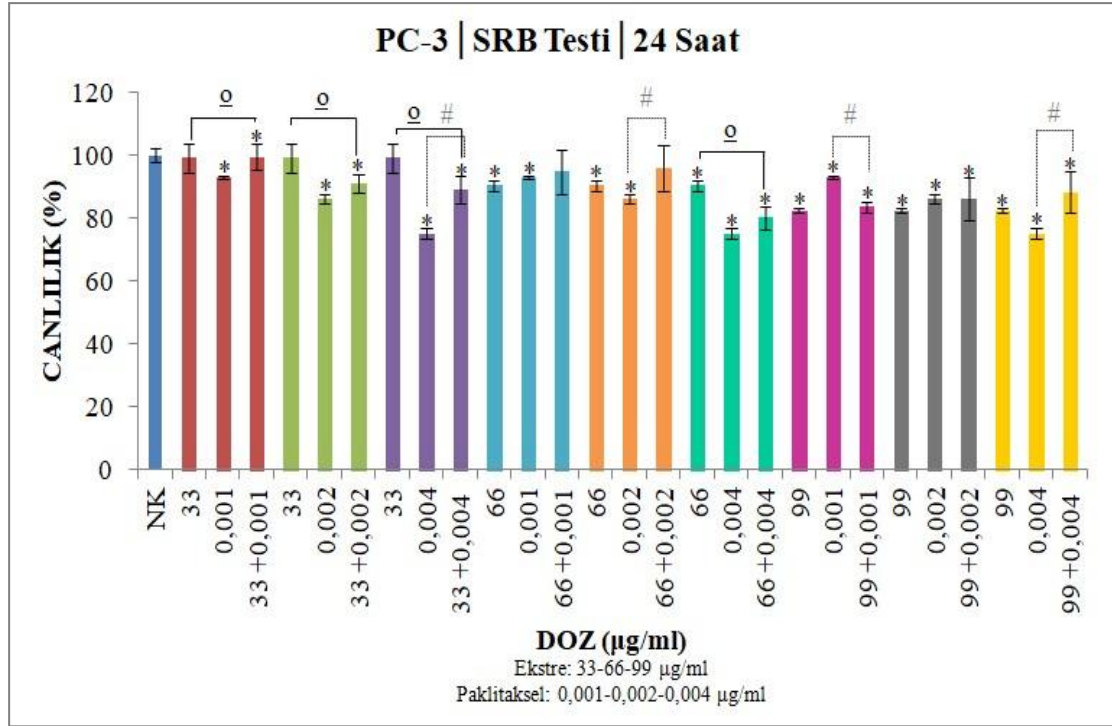
Şekil 4.15. DU 145 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 $\mu\text{g/ml}$) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

72 saatlik sonuçlar incelendiğinde; ekstrenin ve paklitakselin tek başına ve kombine olarak, DU 145 hücre canlılıklarında, negatif kontrole kıyasla, konsantrasyona bağımlı anlamlı azalışlara sebep olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4.16). Özellikle, ekstrenin 66 ve 99 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarında, paklitakselin ise 0,002 ve 0,004 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarında dikkate değer sitotoksik etkiler gözlemlendi. Bunun aksine; kombinasyon gruplarının, ekstrenin veya paklitakselin DU 145 hücrelerinde tek başına neden olduğu sitotoksik etkinliği belirgin şekilde azalttığı tespit edildi. 33+0,002 $\mu\text{g/ml}$ ve 33+0,004 $\mu\text{g/ml}$ kombinasyon gruplarında, ekstrenin paklitakselin etkisini zayıflattığı bulundu. Benzer şekilde; sitotoksik 66 ve 99 $\mu\text{g/ml}$ 'lik ekstre dozları ve sitotoksik etkisi bulunmayan 0,001 $\mu\text{g/ml}$ 'lik paklitaksel dozu ile oluşturulan kombinasyon gruplarında, ilacın, ekstrenin aktivitesini baskıladığı belirlendi. Tek başlarına sitotoksik etki oluşturan diğer ekstre ve paklitaksel dozlarının DU 145 hücrelerine birlikte uygulandığında bu etkinin kaybolduğu gözlemlendi.



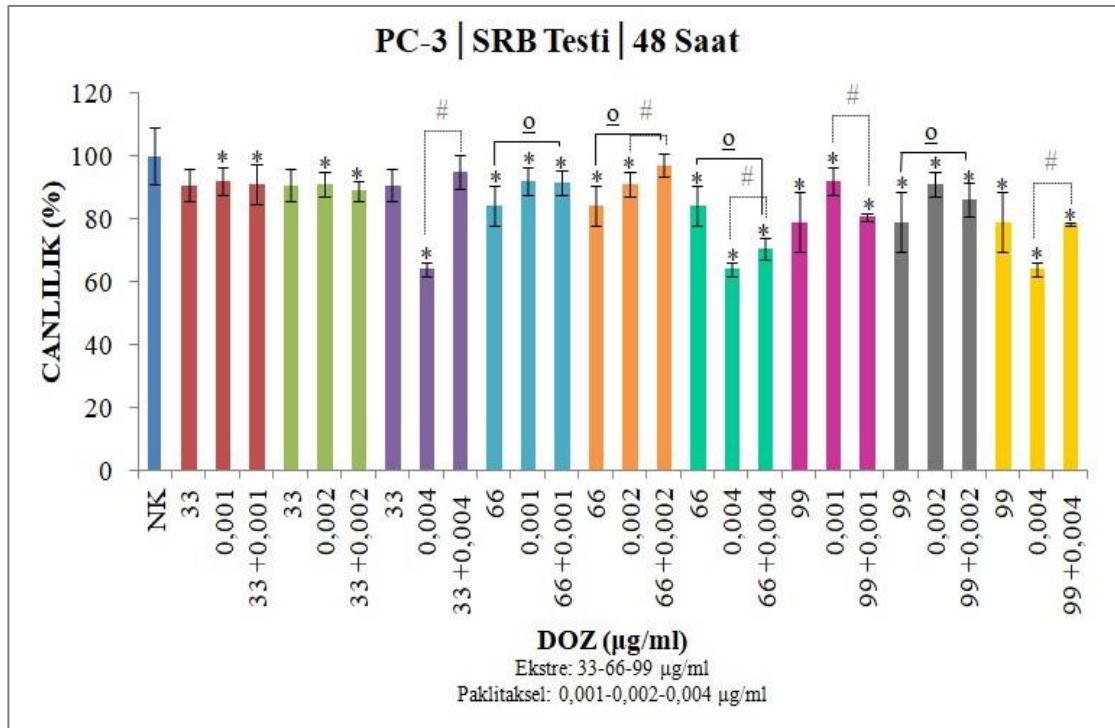
Şekil 4.16. DU 145 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 $\mu\text{g/ml}$) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitakसेle göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

PC-3 hücre hattı için SRB hücre canlılık testiyle elde edilen sonuçlar incelendiğinde, DU 145 hücrelerindeki etkilere benzer bulgular tespit edildi. 24 saatlik test sonucuna göre, ekstrenin ve paklitakselin ayrı olarak uygulandığı hücrelerde canlılık oranlarının çok düşük derecelerde değişim gösterdiği belirlenirken ($p<0,05$), kombinasyon tedavisi sonrasında hücre canlılıklarının (ekstre veya paklitaksel uygulanan hücrelere kıyasla) nispeten arttığı gözlemlendi (Şekil 4.17). 66+0,001 $\mu\text{g/ml}$ ve 66+0,002 $\mu\text{g/ml}$ kombinasyon tedavileri dışında tüm gruplarda, hücre canlılıklarındaki azalışların negatif kontrole göre anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). Fakat, kombinasyon gruplarındaki bu değişimin genel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p<0,05$).



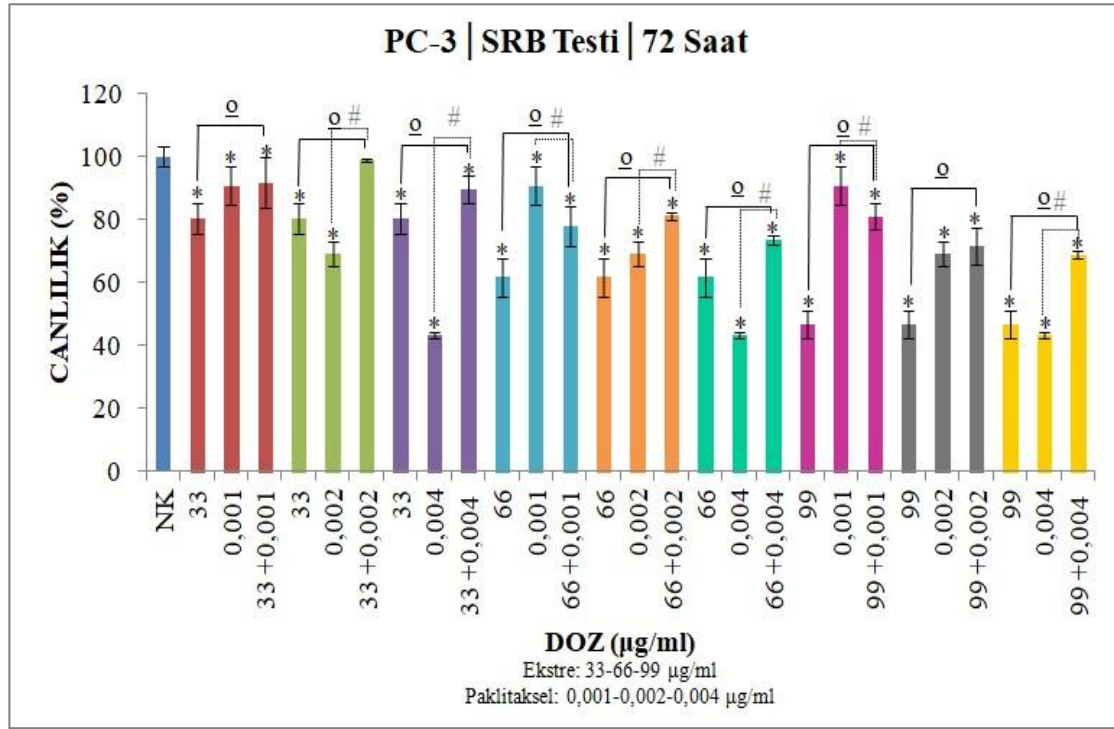
Şekil 4.17. PC-3 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 $\mu\text{g/ml}$) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o_ ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

48 saat sonra, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, sadece ekstre veya sadece paklitaksel ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılıklarında doza bağlı anlamlı azalmalar saptanmasına karşın ($p<0,05$) sitotoksik etki varlığı belirlenemedi (Şekil 4.18). Bu süre zarfında, yalnızca 33+0,002 $\mu\text{g/ml}$ kombinasyonunda hücre canlılığının kısmen düştüğü ve zayıf bir sinerjik etkinin söz konusu olduğu görüldü. Ekstrenin ve paklitakselin birarada kullanıldığı diğer kombinasyon gruplarında ise, bileşiklerin tek başlarına sergiledikleri etkilerinin kaybolduğu ve hücrelerin canlılıklarını korudukları tespit edildi.



Şekil 4.18. PC-3 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 $\mu\text{g/ml}$) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; $\underline{0}$ ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

Ekstre, paklitaksel ve bu bileşiklerin kombinasyonları ile 72 saat boyunca muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılık değerlerindeki etkiler incelendiğinde, daha önceki sonuçlara benzer verilerin elde edildiği görüldü. Ekstrenin, paklitakselin ve bu bileşiklerin kombinasyonlarının, PC-3 hücre canlılıklarında, negatif kontrole kıyasla, anlamlı azalışlara neden olduğu bulundu ($p<0,05$). Bu tedavi süresi sonunda, ekstre için 99 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda; paklitaksel için ise 0,004 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda dikkate değer sitotoksik etkiler gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.19). Ekstrenin ve paklitakselin, farklı dozlar ile oluşturulan kombinasyon gruplarında, hücre canlılıklarının yükseldiği ve hücrelerin kombinasyon tedavisine daha dirençli hale geldikleri belirlendi.



Şekil 4.19. PC-3 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının SRB testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 $\mu\text{g/ml}$) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

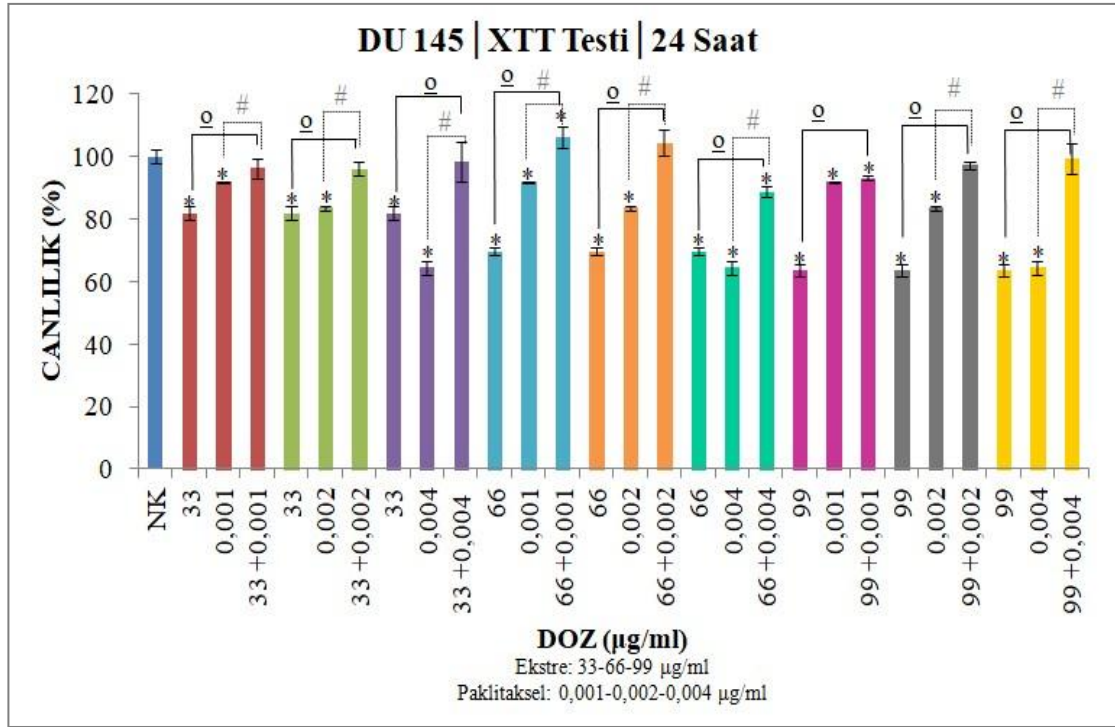
Kombinasyon tedavisine maruz bırakılan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin SRB hücre canlılık testi sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.10'da sunuldu. Sitotoksik (>IC₅₀) ve sitotoksik olmayan (<IC₅₀) ekstre (E kodlu) ve paklitaksel dozları ile oluşturulan kombinasyon gruplarının hiçbirinde sitotoksik aktiviteye dair bulgular elde edilmedi. Bu sebeple; 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde kombinasyon tedavisi için IC₅₀ dozu hesaplanmadı (>99+0,004 µg/ml).

Çizelge 4.10. Kombinasyon tedavisinin SRB testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
DU 145	>99+0,004	>99+0,004	>99+0,004
PC-3	>99+0,004	>99+0,004	>99+0,004

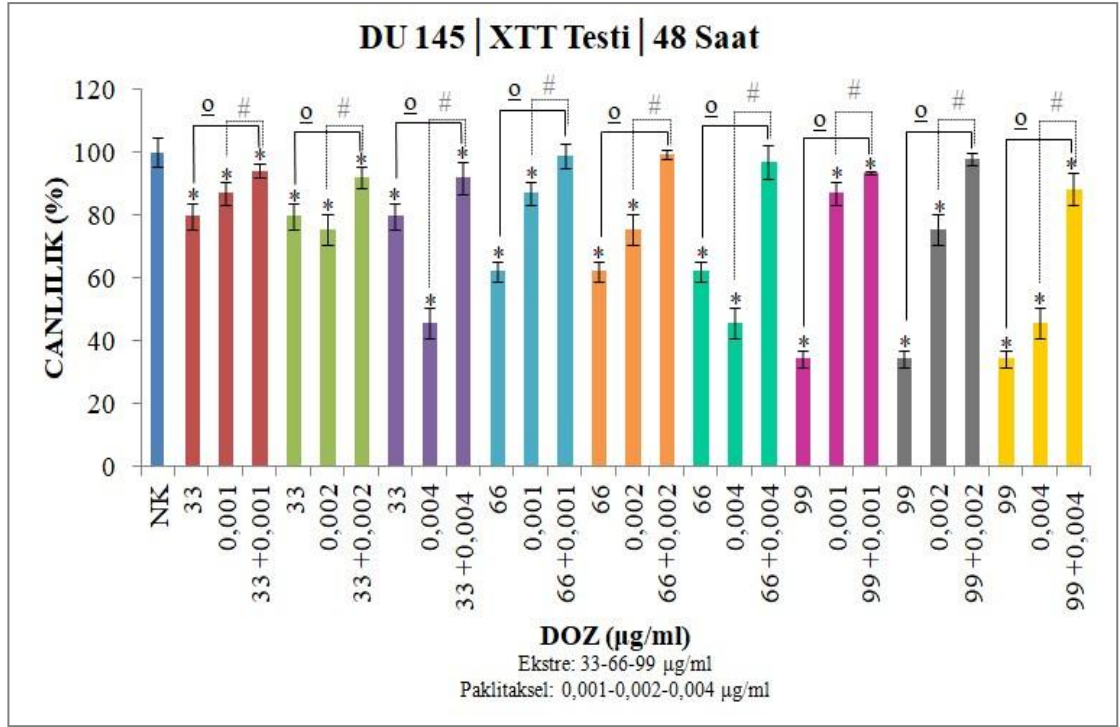
XTT hücre canlılık testi bulguları

DU 145 ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde, ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik etkileri XTT hücre canlılık yöntemiyle doğrulandı. 24 saatlik tedavi sonrası, ekstrenin ve paklitakselin tek başlarına uygulandığı DU 145 hücrelerinde canlılıkların, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.20). 66+0,001 µg/ml, 66+0,004 µg/ml ve 99+0,001 µg/ml kombinasyon grupları ile muamele edilen hücrelerin canlılıklarındaki düşüşler, negatif kontrole göre anlamlı olarak kabul edildi ($p<0,05$). Bu iki bileşiğin farklı dozlarla oluşturulan kombine etkileri analiz edildiğinde; ekstreya veya paklitaksele göre, hücre canlılıklarında artışa dayalı bir etki saptandı. Bu sebeple, ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının hücre canlılıkları üzerinde sitotoksik açıdan zayıf etkilere yol açtığı açıkça söylenebilmektedir.



Şekil 4.20. DU 145 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

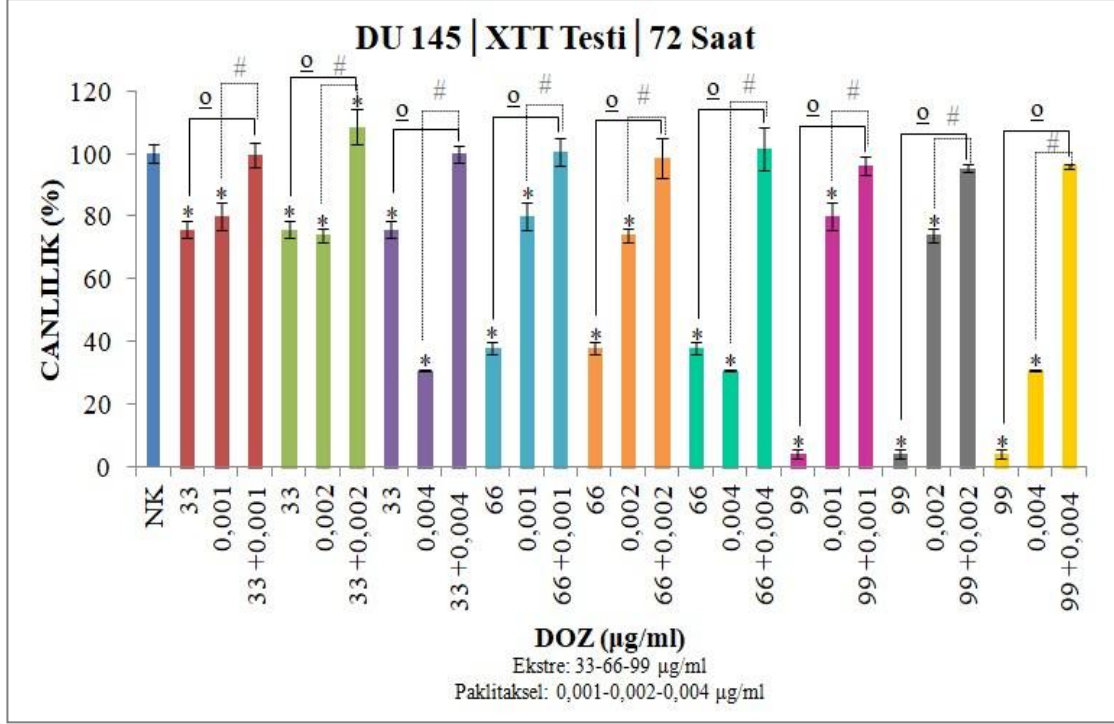
48 saat süren tedavi sonrası, hem ekstrenin hem de paklitakselin ayrı olarak, hücre canlılıklarını, negatif kontrole kıyasla, doza bağlı anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p < 0,05$). Şekil 4.21’de verildiği gibi, ekstrenin 99 µg/ml konsantrasyonunda, paklitakselin ise 0,004 µg/ml konsantrasyonunda DU 145 hücrelerine karşı sitotoksik aktivitelerin söz konusu olduğu görülmektedir. Ancak DU 145 hücreleri, bu bileşiklerin farklı dozlardaki kombinasyonları ile 48 saat boyunca tedaviye bırakıldıktan sonra, tek başlarına olan etkinliklerinin yok olduğu belirlendi. Bütün kombinasyon gruplarında, hücre canlılık oranlarının %50’nin altına düşmediği saptandı. Dolayısıyla, ekstre-paklitaksel kombinasyonlarının, DU 145 hücre hattı üzerinde sitotoksik bakımdan etkisiz kaldığı görüldü.



Şekil 4.21. DU 145 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; 0 ekstreye göre; # paklitakसेle göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

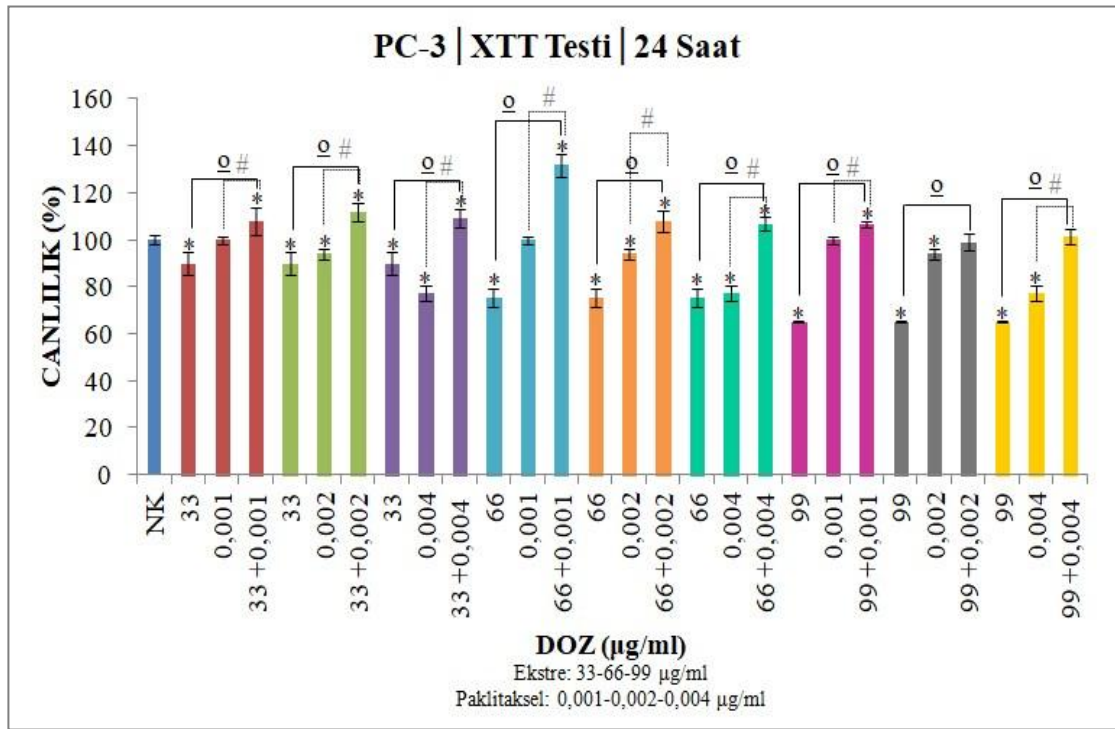
72 saatlik tedavinin ardından; ekstrenin, DU 145 hücre canlılıklarında negatif kontrole göre, doza bağımlı şekilde anlamlı azalmalar gösterdiği tespit edilirken ($p<0,05$), sadece en yüksek iki konsantrasyonda (66 ve 99 µg/ml) sitotoksik etki saptandı (Şekil 4.22). Benzer olarak, paklitakselin DU 145 hücre canlılıklarını, negatif kontrole kıyasla, doza bağımlı olarak ve anlamlı şekilde azalttığı ve test edilen dozlar arasında sadece 0,004 µg/ml’lik en yüksek dozun sitotoksik olduğu incelendi. Kombinasyon tedavisi sonrası, ekstre ve paklitaksel için ayrı olarak elde edilen canlılık değerlerinden daha yüksek canlılık yüzdeleri elde edildi. DU 145 hücrelerine ait canlılık oranları; 99 µg/ml ekstrede %4,28 olarak, 0,004 µg/ml paklitakselde %30,76 olarak hesaplanmasına karşın, bu dozların kombinasyonunda hücre canlılığının %95,91 olarak ölçülmesi, bu çalışma için dikkat çekici bir bulgudur. Bu veriler doğrultusunda; DU 145 hücrelerinin, ekstreye

ve paklitaksele karşı kombinasyon durumundaki duyarlılıklarının azaldığı ve tedaviye daha dirençli hale geldikleri söylenebilmektedir.



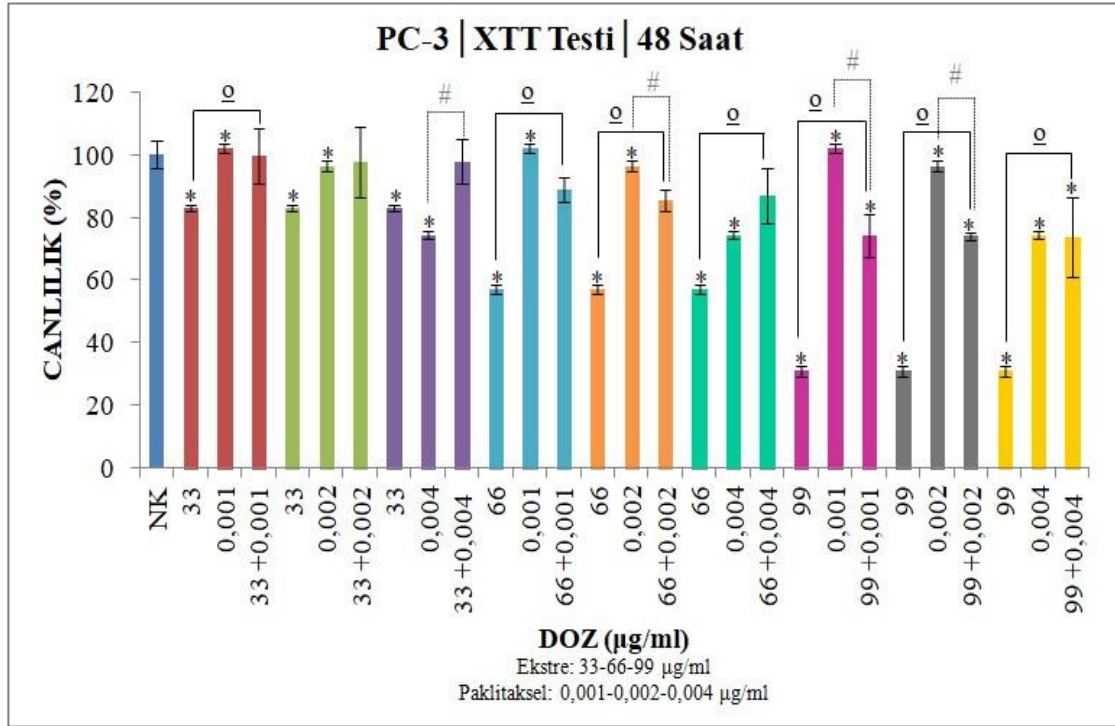
Şekil 4.22. DU 145 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

Ekstre, paklitaksel ve bu bileşiklerin kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası XTT testiyle elde edilen sonuçlara göre, DU 145 hücrelerinde incelenen etkilerin PC-3 hücreleri için de geçerli olduğu görüldü. Şekil 4.23’de özetlendiği gibi, 24 saat sonra, ekstrenin ve paklitakselin ayrı olarak, PC-3 hücre canlılıklarını doza bağlı şekilde azalttığı ancak bu tedavi süresinde sitotoksik anlamda etkinlik gösteremedikleri belirlendi ($p<0,05$). Ekstrenin ve paklitakselin kombine etkileri analiz edildiğinde; hücre canlılık oranlarının, negatif kontrol canlılığına (%100) yakın hatta bu değerin üzerinde olduğu görüldü. Daha önce elde edilen sonuçlara paralel olarak, bu iki bileşiğin kombine halde PC-3 hücrelerine uygulanmasının potansiyel etkilerde kayıplara yol açtığı söylenebilmektedir.



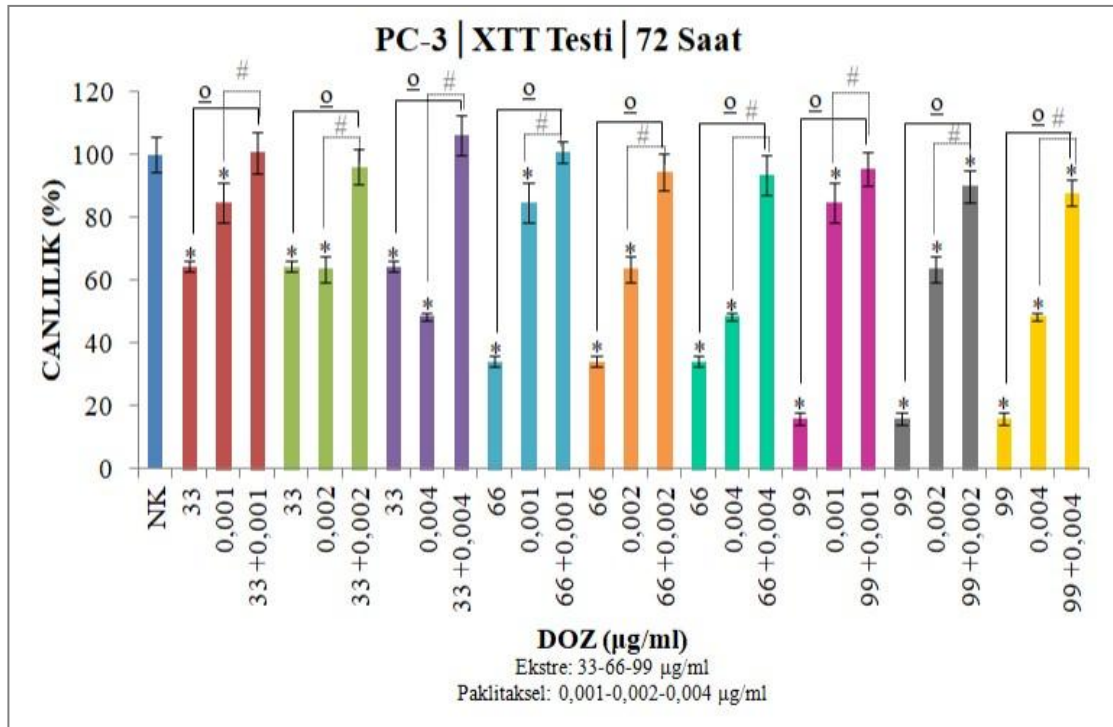
Şekil 4.23. PC-3 hücrelerine 24 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

48 saatlik tedaviyi takiben negatif kontrol ile kıyaslandığında, hem ekstrenin hem de paklitakselin PC-3 hücre canlılıklarında doza bağlı olarak anlamlı azalışlara neden olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.24). Ekstrenin ve paklitakselin 48 saat boyunca tek başlarına gösterdikleri etkiler incelendiğinde, sadece ekstrenin 99 µg/ml'lik konsantrasyonunun sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. PC-3 hücrelerinde, farklı dozlarla oluşturulan bütün kombinasyon gruplarında, ekstrenin veya paklitakselin aktivitesini azaltıcı yönde etkileşimler belirlendi. 48 saat boyunca, sadece 99 µg/ml ekstre ile tedaviye bırakılan hücrelerde gözlemlenen sitotoksik aktivitenin, toksik olmayan paklitaksel dozlarıyla kombinasyonun da baskılanması, bu çalışmada elde edilen şaşırtıcı bir sonuçtur.



Şekil 4.24. PC-3 hücrelerine 48 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 µg/ml) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitaksele göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

XTT hücre canlılık testiyle analiz edilen 72 saatlik sonuçlar, benzer olarak önceki bulguları işaret etmektedir. Ekstre veya paklitaksel tedavisine bağlı olarak, konsantrasyon arttıkça PC-3 hücre canlılıklarının anlamlı ölçüde azaldığı bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.25). Ekstre için 66 ve 99 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda sitotoksik etki gözlenirken, paklitaksel için yalnızca en yüksek doz olan 0,004 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda sitotoksik etki elde edildi. Bu verilerin aksine; ekstrenin ve paklitakselin kombine edildikleri zaman PC-3 hücrelerine karşı tek başlarına olan etkilerinden farklı etkiler sergiledikleri ve hücrelerin kombinasyon tedavisine direnç kazandıkları tespit edildi. Özellikle, tek başlarına sitotoksik etki gösteren ekstre ve ilaç dozlarının kombinasyonları (66+0,004 $\mu\text{g/ml}$ ve 99+0,004 $\mu\text{g/ml}$) için elde edilen bulgular daha ilgi çekicidir. Bu dozlarda kurulan kombinasyonların, PC-3 hücrelerinin canlılık oranlarını azaltma yerine arttırmaya yönelik bir etki göstermesi önemli bir bulgudur.



Şekil 4.25. PC-3 hücrelerine 72 saat boyunca ekstre ve paklitaksel kombinasyonlarının uygulanması sonrasında hücre canlılığının XTT testiyle elde edilen doza bağlı olarak değişimi. NK, ekstre ve paklitaksel uygulanmayan (0 $\mu\text{g/ml}$) negatif kontrol grubunu ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyucuğun ortalamasını temsil etmektedir. * Aynı zaman dilimi içinde negatif kontrole göre; o ekstreye göre; # paklitakसे göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

Kombinasyon tedavisine maruz bırakılan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin XTT hücre canlılık testi sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.11’de sunuldu. Sitotoksik (>IC₅₀) ve sitotoksik olmayan (<IC₅₀) ekstre (E kodlu) ve paklitaksel dozları ile oluşturulan kombinasyon gruplarının hiçbirinde sitotoksik aktiviteye dair bulgular elde edilmedi. Bu sebeple; 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde kombinasyon tedavisi için IC₅₀ dozu hesaplanmadı (>99+0,004 µg/ml).

Çizelge 4.11. Kombinasyon tedavisinin XTT testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları

	IC ₅₀ Dozları (µg/ml)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
DU 145	>99+0,004	>99+0,004	>99+0,004
PC-3	>99+0,004	>99+0,004	>99+0,004

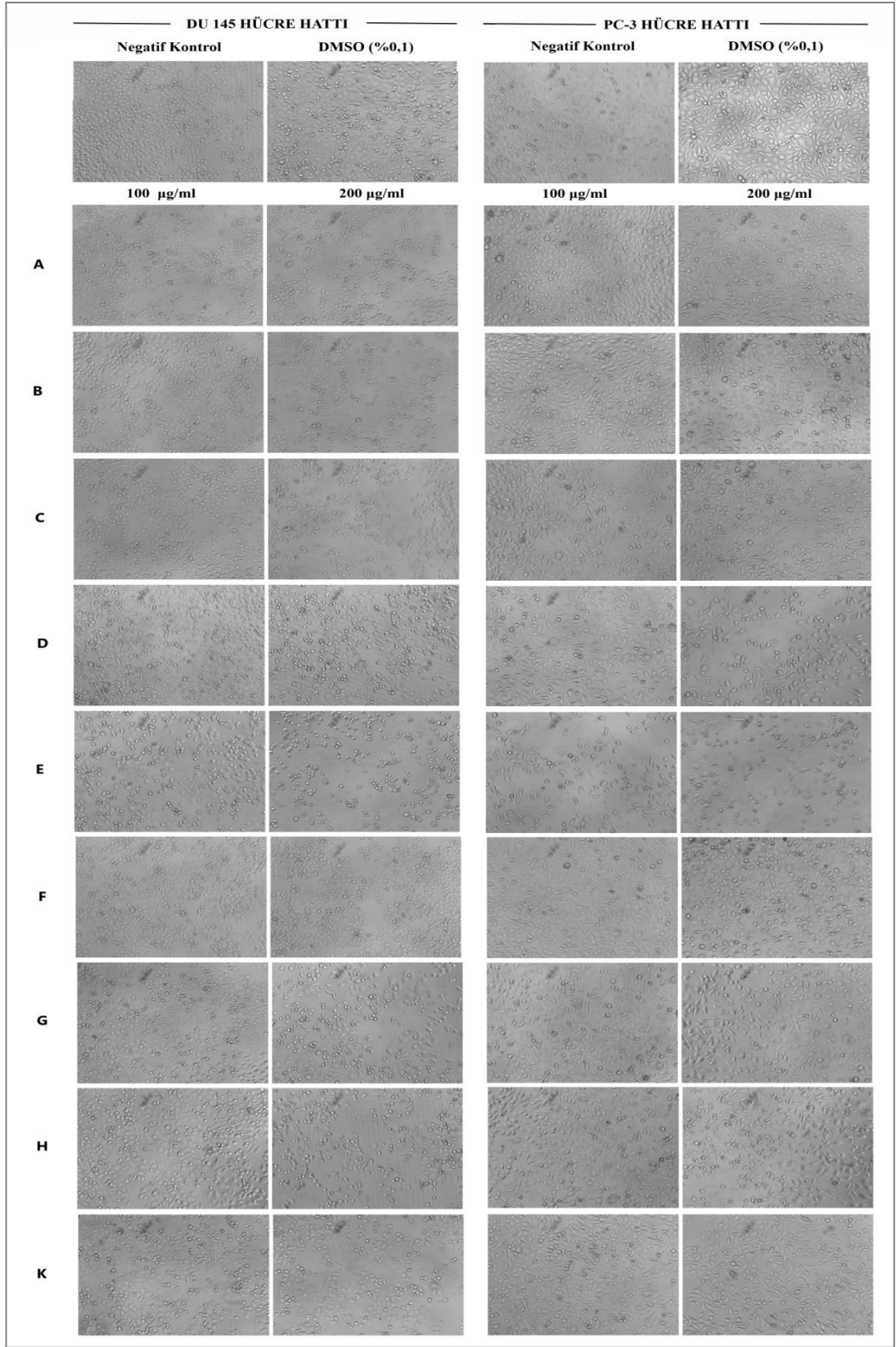
Özetlemek gerekirse; tez çalışmasının bu aşamasında, en güçlü sitotoksik aktiviteyi sergileyen E kodlu ekstre, prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan paklitaksel ile kombinasyonunun, DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki olası sinerjik etkisi araştırıldı. Kombinasyon analizi, DU 145 ve PC-3 hücrelerinin canlılık oranlarındaki değişimler temel alınarak yürütüldü. Bu amaçla; 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süreleri sonunda SRB hücre canlılık testiyle belirlenen sonuçlar, XTT hücre canlılık testiyle doğrulandı. Bu testlerden elde edilen verilerin birbiriyle uyumlu olduğu görüldü. Ancak, ulaşılmak istenen sonuçtan farklı olarak, kombinasyon gruplarının tümünde her iki hücre hattı için de sinerjik etki belirlenemedi. Buna karşılık; kombine edilen ekstre ve paklitaksel arasında, ‘antagonistik etki’ olarak adlandırılacak etkileşim sonucu sözü edilen bileşiklerin aktivitelerinde azalma tespit edildi. Bu etkinin bir sonucu olarak, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde kombinasyon tedavisi için IC₅₀ değerleri hesaplanamadı.

4.2.6. Hücre morfolojilerindeki değişikliklere ilişkin bulgular

Ham ekstrelerin, kaba fraksiyonların, unotein B'nin, paklitakselin ve kombinasyon gruplarının 24, 48 ve 72 saat süreyle DU 145 ve PC-3 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişiklikler, inverted mikroskop altında (x10'luk büyütmede) analiz edildi. Hücrelerin adezyon ve konfluensi durumlarındaki değişiklikler, şekillerindeki ve boyutlarındaki farklılıklar, negatif kontrol hücreleri ve %0,1 konsantrasyonda DMSO uygulanmış hücreler ile karşılaştırıldı.

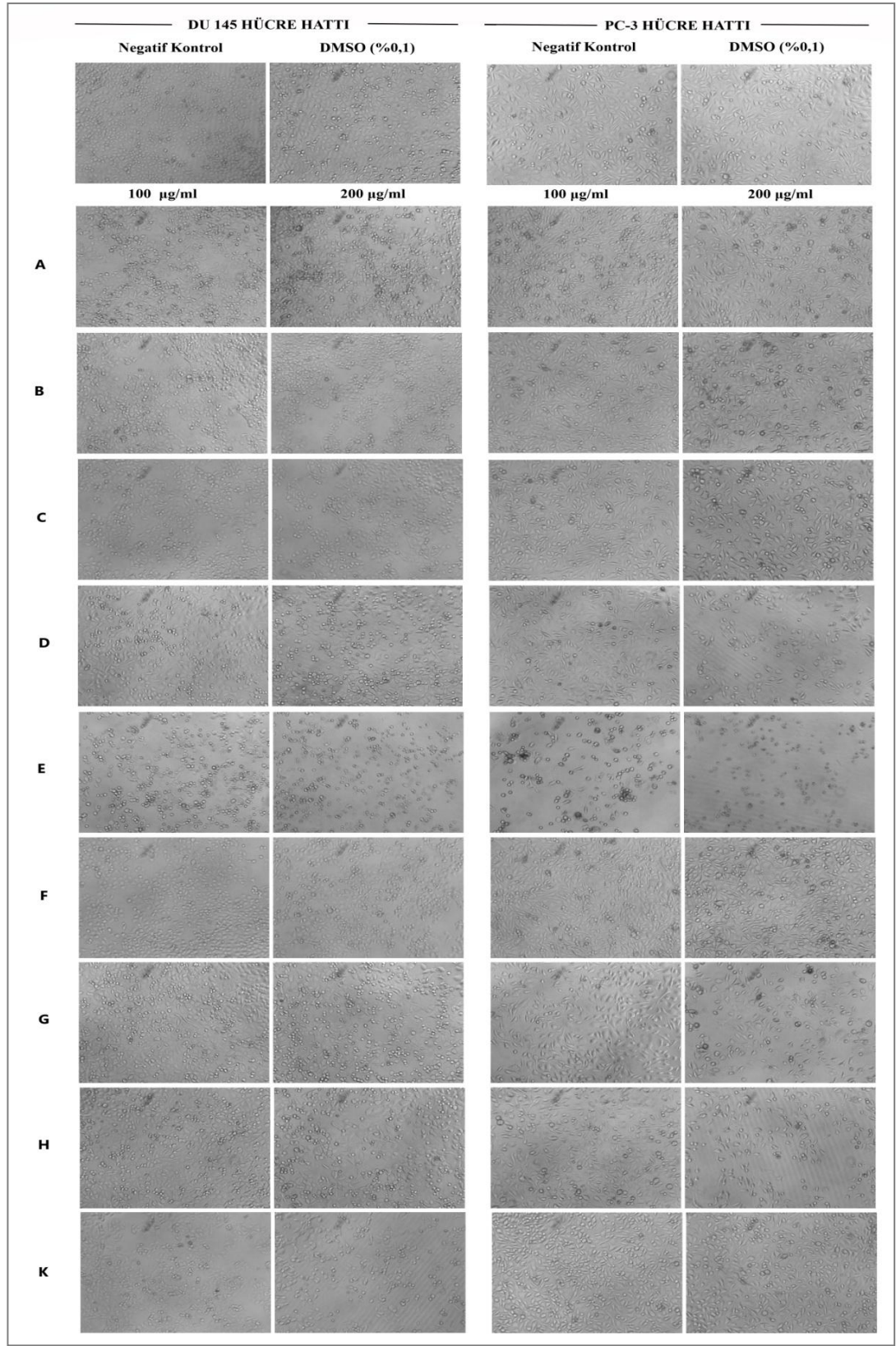
Ham ekstrelerin DU 145 ve PC-3 hücre hatları üzerine etkileri

Ham ekstreler (A, B, C, D, E, F, G, H ve K kodlu) ile 24 saatlik tedaviden sonra, özellikle 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde önemli değişiklikler analiz edildi (Şekil 4.26). Ekstrelerin daha düşük konsantrasyonlarında, sitotoksiteyi işaret eden önemli morfolojik değişimler incelenmedi. DU 145 ve PC-3 hücrelerinde E kodlu ekstrenin, taranan tüm ekstreler arasında en güçlü sitotoksik aktiviteyi sergileyen ekstre olduğu mikroskopik analizle de doğrulandı. E kodlu ekstre ile 24 saatlik tedaviden sonra, negatif kontrol hücreleri ve DMSO (%0,1) uygulanmış hücelere kıyasla, proliferasyonun büyük ölçüde azaldığı ve ölü hücre sayılarının arttığı görüldü. E kodlu ekstrenin 100 µg/ml'lik dozunda, hücre adezyonlarının zayıfladığı ve hücrelerin epitelyal morfolojilerini kaybetmeye başladıkları görüldü. E kodlu ekstrenin 200 µg/ml'lik dozunda ise, hücre boyutlarının küçüldüğü ve hücrelerin yuvarlak şekil aldıkları görüldü. Diğer ekstrelerin, özellikle 200 µg/ml'lik dozlarında, hücre morfolojilerinin kısmen değiştiği gözlemlendi. Negatif kontrol ve DMSO (%0,1) ile muamele edilmiş hücrelerin ise, şekil ve büyüklük bakımından normal oldukları ve canlılıklarını korudukları incelendi.



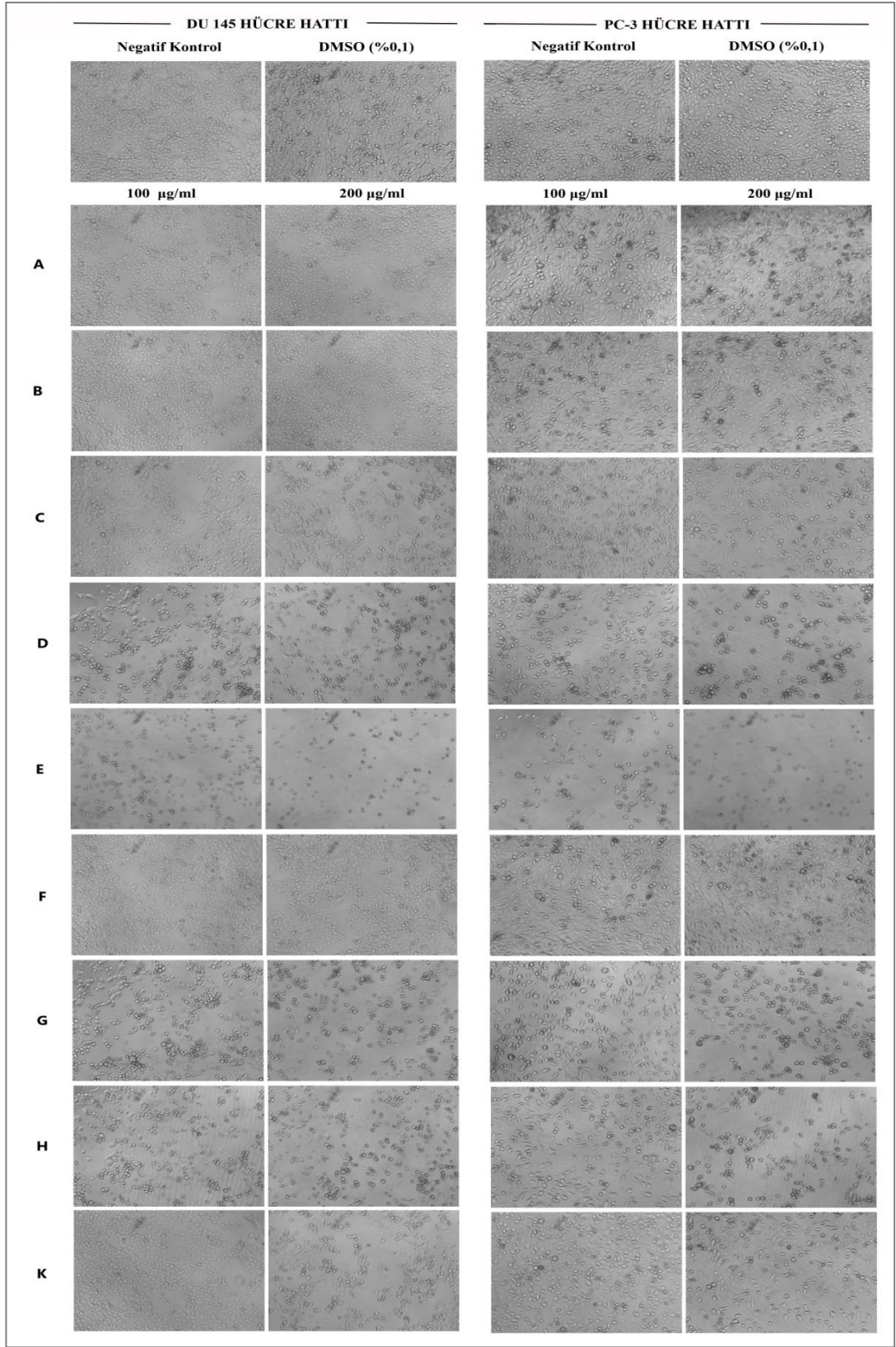
Şekil 4.26. Ham ekstrelerin farklı konsantrasyonları (100 ve 200 µg/ml) ile 24 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

48 saatlik tedaviden sonra, E kodlu ekstrenin, DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerinde önemli ölçüde sitotoksik olduğu mikroskopik olarak değerlendirildi (Şekil 4.27). E kodlu ekstrenin hem 200 µg/ml'lik hem de 100 µg/ml'lik dozunda, DU 145 ve PC-3 hücre yoğunluklarının, negatif kontrole ve DMSO (%0,1) ile muamele edilmiş hücelere göre oldukça azaldığı gözlemlendi. Hücrelerin adezyon yeteneklerini kaybetmelerine bağlı olarak yuvarlaklaştıkları ve küçüldükleri incelendi. DU 145 ve PC-3 hücre yapılarındaki bu değişiklikler, E kodlu ekstrenin 200 µg/ml'lik dozunda daha belirgindir. D, G, H ve K kodlu ekstreler, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda DU 145 ve PC-3 hücre morfolojilerinde dikkate değer değişimler gösterdi. Negatif kontrol ve DMSO (%0,1) kontrolü ile karşılaştırıldığında; hücre sayılarının azaldığı, epitelyal morfolojilerin kaybolmaya başladığı ve bu ekstrelerin, özellikle 200 µg/ml'lik dozlarında, hücrelerin küçük ve yuvarlak yapıda oldukları incelendi. A, B, C ve F kodlu ekstrelerin, DU 145 ve PC-3 hücre proliferasyonlarını baskıladığı gözlemlense de, hücre ölümlerinin diğer ekstrelerin uygulandığı hücelere nazaran daha az olduğu belirlendi. Negatif kontrol ve DMSO (%0,1) uygulanmış hücrelerin ise, şekil ve büyüklük bakımından düzenli oldukları ve canlılıklarını kaybetmeden çoğalmaya devam ettikleri görüldü.



Şekil 4.27. Ham ekstrelerin farklı konsantrasyonları (100 ve 200 µg/ml) ile 48 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

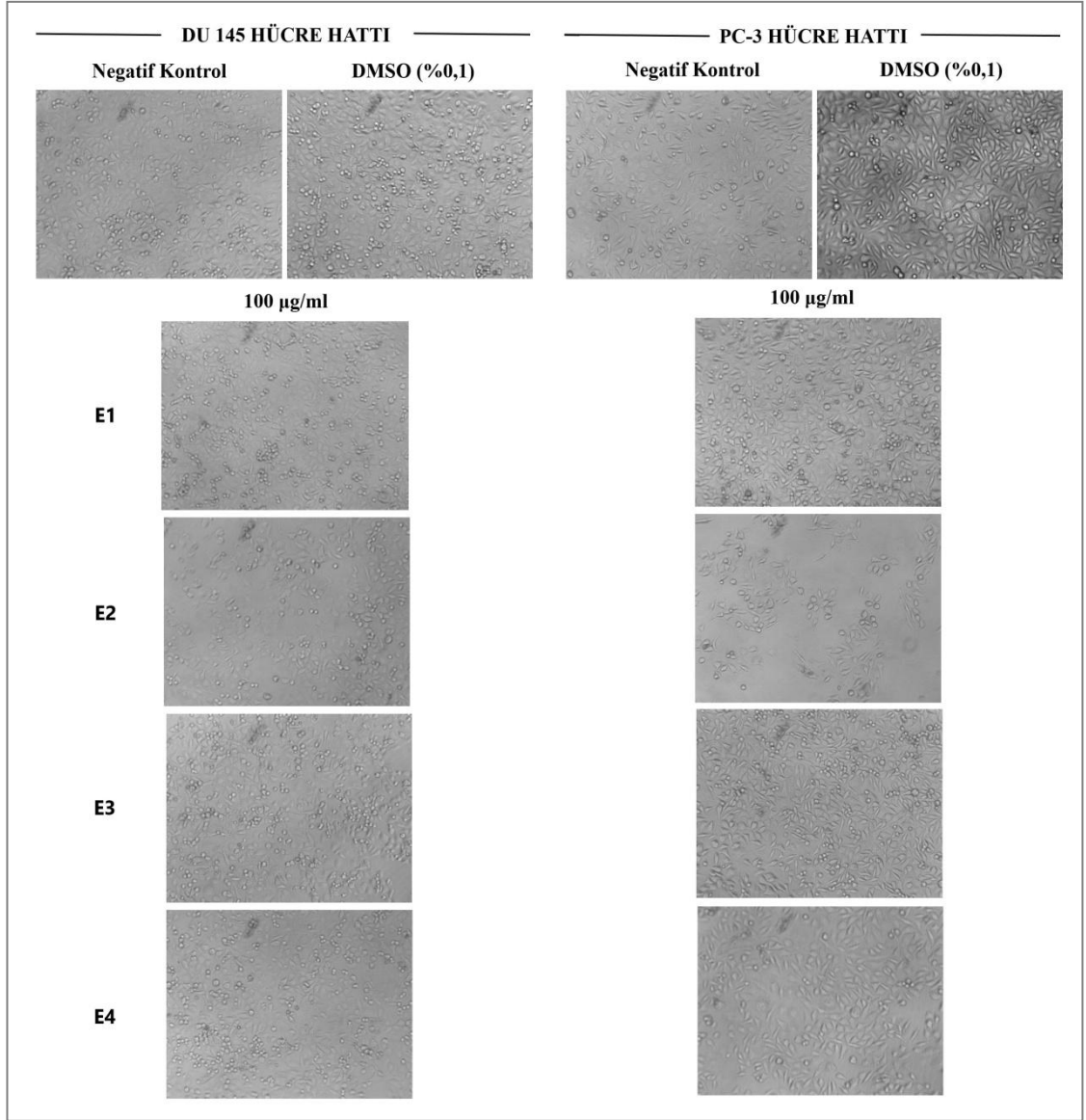
Daha uzun süreli tedavinin sonucu olarak; 72 saat sonra, ham ekstrelerin DU 145 ve PC-3 hücrelerinde gözle görülür farklılaşmalara neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.28). Hücre fotoğraflarından da anlaşıldığı üzere; E kodlu ekstre, tedavi süresince en güçlü sitotoksik aktiviteyi sergileyen ekstre oldu. Bu ekstrenin 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarında, tüm hücrelerin canlılıklarını kaybettiği ve kültür yüzeyinden ayrıldıkları, bundan dolayı küçük, yuvarlak yapılı hücrelerin besiyeri içinde yüzdüğü gözlemlendi. Bu etkinin, iki hücre hattında da geçerli olduğu görüldü. DU 145 ve PC-3 hücrelerinde, E kodlu ekstrelerden sonra güçlü sitotoksik etkinlik gösteren ekstrelerin D, G, H ve K kodlu ekstreler olduğunu hücresel yapılarda gözlenen değişimler kanıtlar niteliktedir. A, B, C ve F kodlu ekstreler ile muamele edilen DU 145 ve PC-3 hücreleri mikroskopik olarak analiz edildiğinde; hücre yoğunluğunun negatif kontrole veya DMSO (%0,1) kontrolüne göre azaldığı, hücrelerin epitelyal morfolojilerinin bozulmaya başladığı ve kimi hücrelerin küçük, yuvarlak yapı kazandıkları görüldü. Sözü edilen ekstreler arasında en iyi etkiyi C kodlu ekstrenin gösterdiği belirlendi. Tüm ham ekstrelerin diğer dozlarında (<100 µg/ml), DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojileri için bariz sitotoksik belirtileri gözlenmedi. Negatif kontrol hücrelerinin ve DMSO (%0,1) uygulanmış hücrelerin ise 72 saat boyunca normal şekillerini ve boyutlarını korudukları incelendi. Bu bulgu, DU 145 ve PC-3 hücrelerinin nispeten uzun bir süre gibi görünen 72 saat sonunda dahi canlılıklarını koruduklarını ve yüksek oranda çoğalmaya devam ettiklerini gözler önüne sermektedir.



Şekil 4.28. Ham ekstrelerin farklı konsantrasyonları (100 ve 200 µg/ml) ile 72 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

Kaba fraksiyonların DU 145 ve PC-3 hücre hatları üzerine etkileri

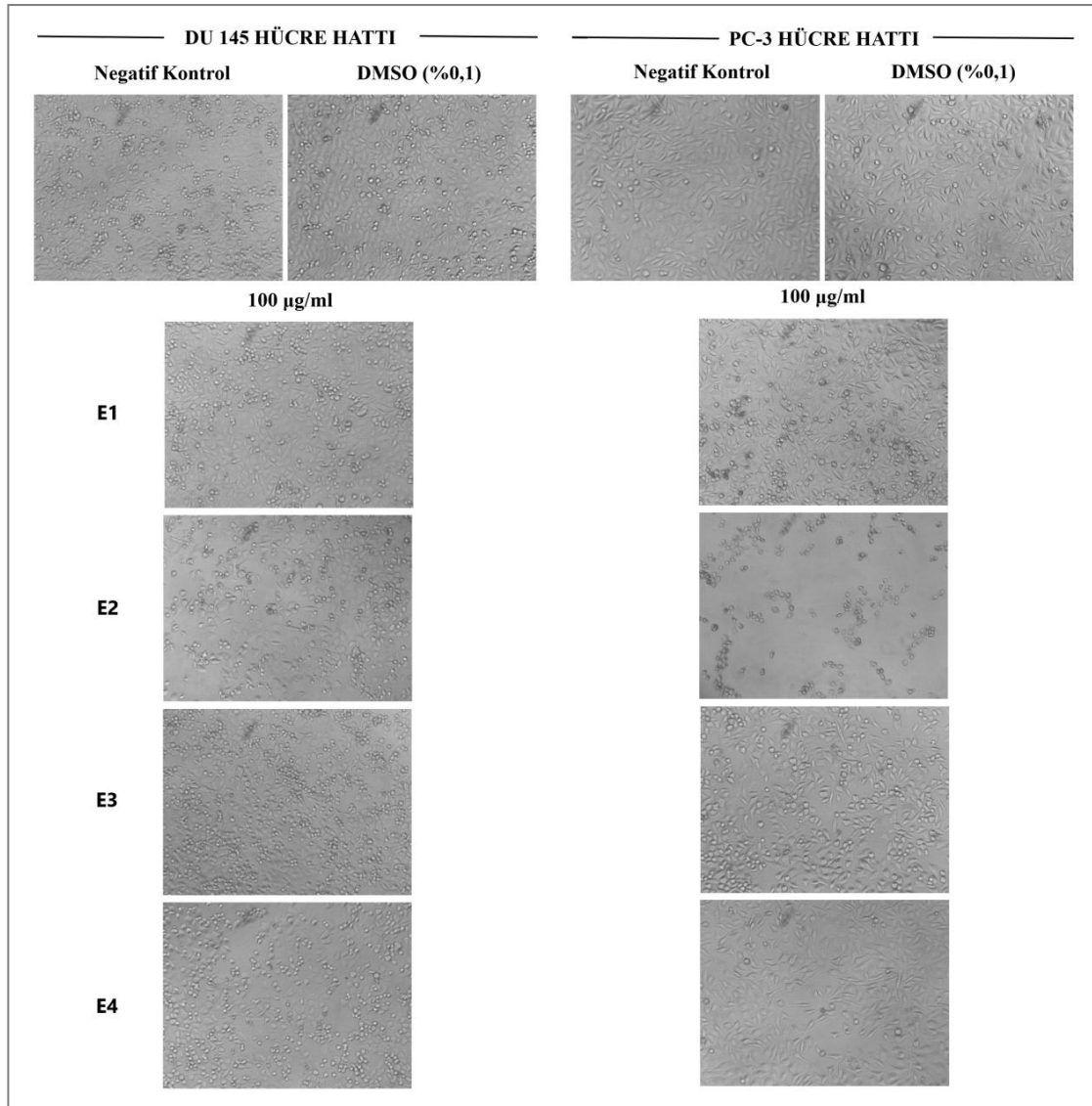
Kaba fraksiyonlar (E1, E2, E3 ve E4 kodlu) ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilen DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik değişikliklerini analiz etmek üzere, inverted mikroskop (x10'luk büyütmede) kullanılarak temsili fotoğraflar çekildi. Hücrelerdeki değişimler, negatif kontrol hücreleri ve %0,1 konsantrasyonda DMSO uygulanmış hücreler ile kıyaslandı. 100 µg/ml konsantrasyondaki E2 kodlu fraksiyon ile 24 saatlik tedaviden sonra, DU 145 hücrelerinin konfluensi düzeyinin büyük oranda azaldığı ve hücrelerin adezyon yeteneklerini kaybederek yuvarlaklaşmaya başladıkları görüldü. Diğer fraksiyonların (E1, E3 ve E4) uygulandığı DU 145 hücrelerinde belirgin morfolojik değişimler saptanmadı. PC-3 hücreleri için çekilen fotoğraflar analiz edildiğinde, benzer etkilerin söz konusu olduğu belirlendi. 24 saatlik tedaviyi takiben, E2 kodlu fraksiyonun (100 µg/ml), PC-3 hücre yoğunluğunu ciddi bir şekilde düşürdüğü incelendi. Kalan fraksiyonların (E1, E3 ve E4), PC-3 hücrelerine karşı 24 saatte etkili olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Kaba fraksiyonlar (100 µg/ml) ile 24 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

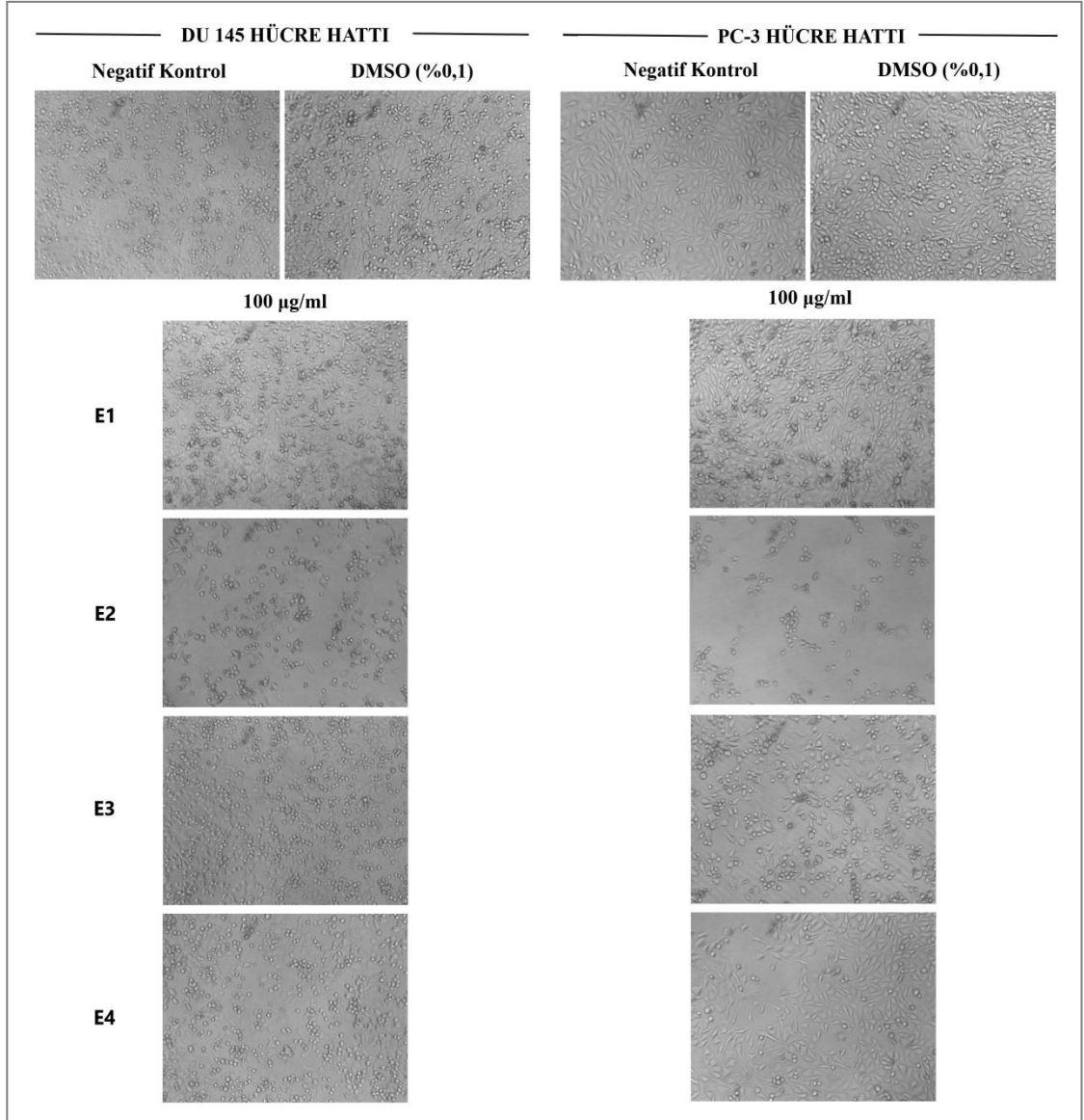
48 saatlik tedaviyi takiben, E2 kodlu fraksiyonun 100 µg/ml'lik konsantrasyonunda, DU 145 hücrelerinin yoğunluklarının düştüğü ve bazı hücrelerin, adezyonlarının azalması sonucu küçük ve yuvarlak morfoloji kazandıkları görüldü. E4 kodlu fraksiyon (100 µg/ml) ile muamele edilen DU 145 hücrelerinin bir kısmının 24. saate göre daha yuvarlak ve küçük yapıda olduğu tespit edildi. DU 145 hücrelerinde, sitotoksik etkiyi gösteren bu tür morfolojik değişikliklerin E1 ve E3 kodlu fraksiyonların varlığında daha zayıf olduğu gözlemlendi. 48 saatlik tedavi sonrası, E2 kodlu fraksiyonun 100 µg/ml'lik dozda, PC-3 hücre sayısını kayda değer oranda düşürdüğü analiz edildi. Hücrelerin

nerdeyse tamamının epitelyal morfolojilerinin bozularak küçük ve yuvarlak yapı kazandıkları incelendi. PC-3 hücrelerinde, E2 kodlu fraksiyona en yakın etkiyi E3 kodlu fraksiyonun sergilediği görüldü. E3 kodlu fraksiyon (100 µg/ml) varlığında, hücre adezyonlarının zayıfladığı ve kimi hücrelerin yuvarlaklaşmaya başladıkları görüldü. E4 kodlu fraksiyonun (100 µg/ml) ise, konfluensi derecesinde dikkate değer azalmaya neden olduğu bulundu. Bahsedilen morfolojik etkiler, E1 kodlu fraksiyon için 48. saatte gözlenmedi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Kaba fraksiyonlar (100 µg/ml) ile 48 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

72 saatlik tedavi sonrası; E2 kodlu fraksiyonun (100 µg/ml), DU 145 hücre yoğunluğunda zamana bağlı olarak belirgin azalışlara yol açtığı gözlemlendi. Hücrelerin çoğunluğunun yuvarlak şekilli ve küçük boyutlu morfolojide olması sitotoksik aktiviteyi doğrulamaktadır. E3 ve E4 kodlu fraksiyon (100 µg/ml) ile 72 saatlik tedaviden sonra, 48. saate oranla daha fazla yuvarlak morfolojide hücrelerin incelenmesi nedeniyle güçlü sitotoksik etki söz konusudur. E1 kodlu fraksiyon (100 µg/ml) uygulanan DU 145 hücrelerinde sitotoksisiteyi işaret eden morfolojik özellikler tespit edilmedi ve hücre durumlarının negatif kontrol hücrelerine ve DMSO (%0,1) kontrol hücrelerine benzer olduğu görüldü. 72 saat sonra, E2 kodlu fraksiyonun (100 µg/ml) PC-3 hücreleri üzerinde daha belirgin morfolojik farklılıklara neden olduğu incelendi. Hücre yoğunluğundaki ciddi azalışlara ilave olarak hücrelerin küçük ve yuvarlak yapıda olmaları güçlü sitotoksik aktiviteyi kanıtlar niteliktedir. E3 ve E4 kodlu fraksiyonların 100 µg/ml’lik dozlarında, 48. saate kıyasla daha belirgin morfolojik değişikliklerin gözlenmesiyle birlikte, E3 kodlu fraksiyonun uygulandığı grupta daha fazla yuvarlak, küçük yapılu hücre bulunması daha iyi sitotoksik etkinin var olduğunu göstermektedir. E1 kodlu fraksiyon (100 µg/ml) ile 72 saat boyunca tedavi edilen PC-3 hücrelerinin morfolojik olarak, negatif kontrol hücrelerinden ve DMSO (%0,1) kontrol hücrelerinden farklılık göstermediği incelendi. Tüm kaba fraksiyonların diğer dozlarında (<100 µg/ml), DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojileri için bariz sitotoksik belirtileri gözlenmedi. Negatif kontrol hücrelerinin ve DMSO (%0,1) uygulanmış hücrelerin ise 72 saat boyunca normal şekillerini ve boyutlarını korudukları incelendi (Şekil 4.31).

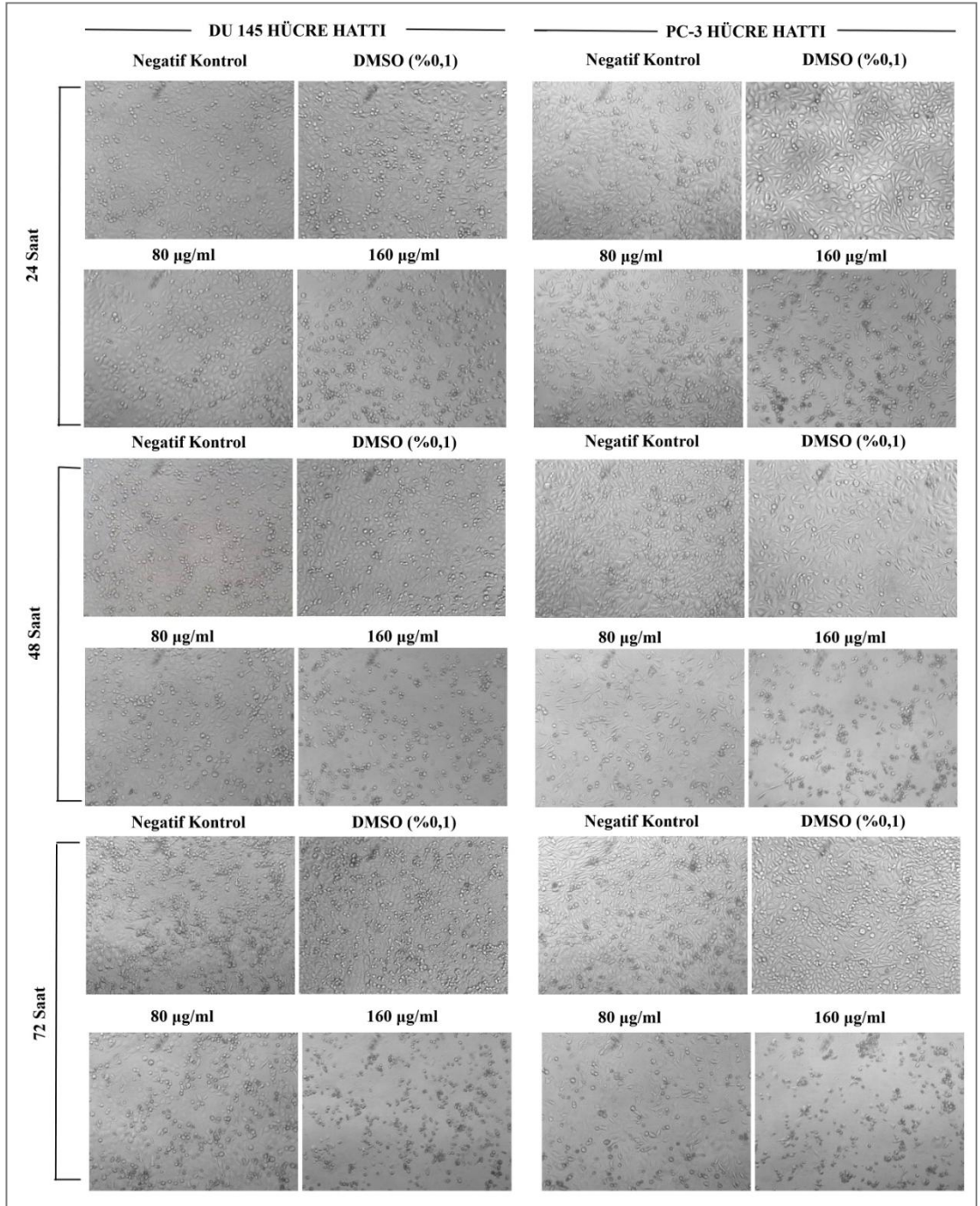


Şekil 4.31. Kaba fraksiyonlar (100 µg/ml) ile 72 saatlik tedaviden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

Unotein B'nin DU 145 ve PC-3 hücre hatları üzerine etkileri

Çalışma kapsamında kullanılan unotein B'nin, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişiklikler inverted mikroskop (x10'luk büyütmede) altında analiz edildi. Unotein B'nin 80 µg/ml konsantrasyonda, DU 145 ve PC-3 hücre sayılarının, negatif kontrol ve DMSO (%0,1) kontrol hücrelerine kıyasla, önemli ölçüde azaldığı incelendi. Hücre adezyonlarının zayıflaması ve hücrelerin yuvarlak morfoloji kazanması ile karakterize olan hücre ölümünün zamana bağlı olarak arttığı görüldü.

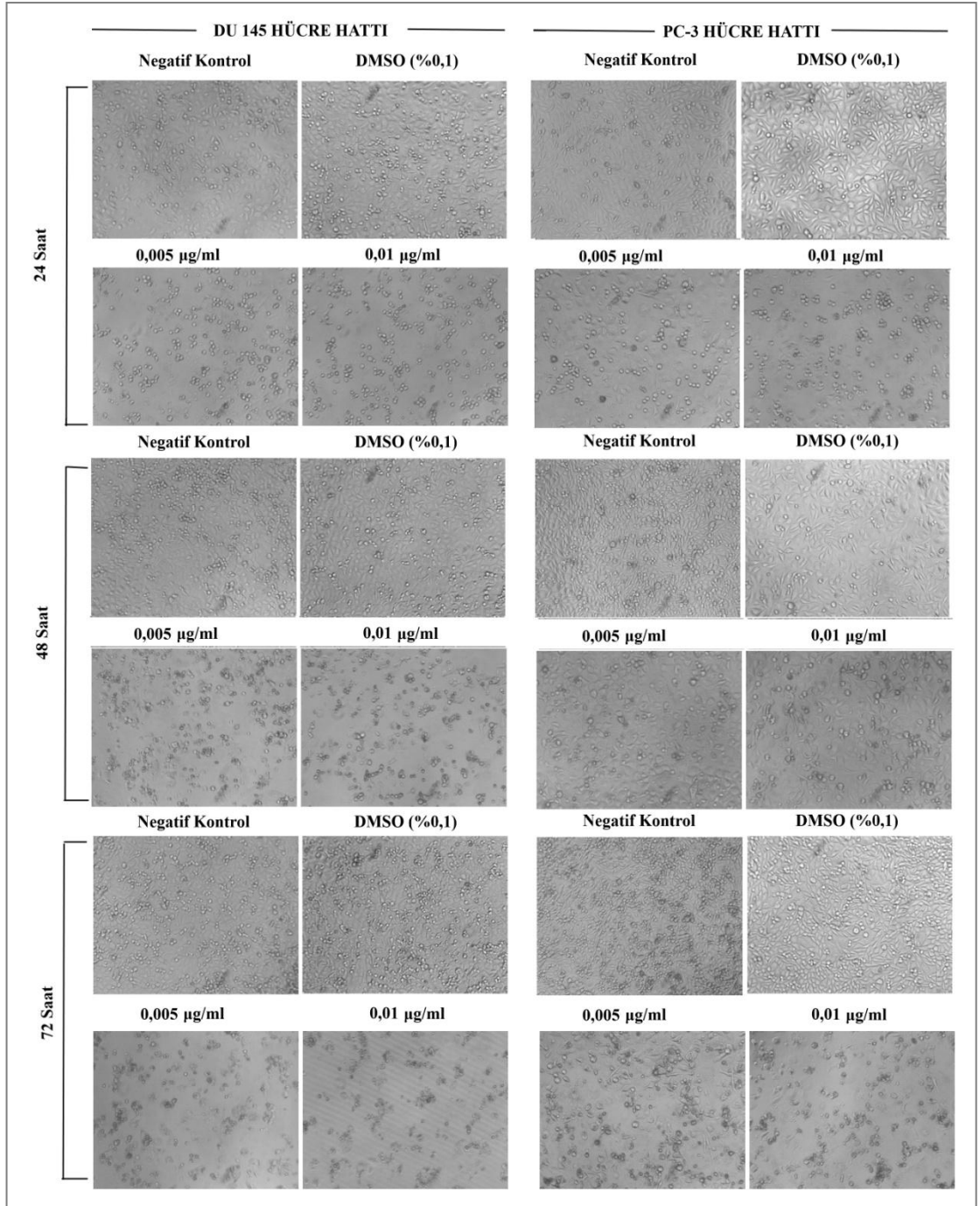
Unotein B'nin 160 µg/ml konsantrasyonunda daha güçlü sitotoksik etkilere neden olduğu, DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojilerinde incelenen belirgin değişikliklerden anlaşılmaktadır. Unotein B ile 24 saatlik tedavi sonrası, hem DU 145 hem de PC-3 hücrelerinin kültürlerdeki yoğunluklarının oldukça azaldığı gözlemlendi. Bu sürede, hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybetmeye başladıkları ve bazı hücrelerin küçük, yuvarlak morfolojiye sahip oldukları belirlendi. 72. saatte daha güçlü etkiler gözlenmekle birlikte; 48 ve 72 saatlik tedavileri takiben, DU 145 ve PC-3 hücrelerinin adherent (yapışma) yeteneklerini kaybetmesinin bir sonucu olarak neredeyse tüm hücrelerin yuvarlaklaştığı görüldü. Hücre fotoğraflarından da görüldüğü üzere, 24-72 saatlik tedavi aralığında; PC-3 hücreleri, unotein B maddesine DU 145 hücrelerinden daha duyarlıdır. Unotein B'nin daha düşük dozlarında, iki hücre hattı için sitotoksositeye dair belirgin morfolojik değişiklikler gözlenmedi. Negatif kontrol hücrelerinin ve DMSO (%0,1) ile tedaviye bırakılmış hücrelerin ise, inkübasyon periyodu boyunca canlılıklarını yitirmeden proliferasyonlarına devam ettikleri görüldü (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Unotein B'nin farklı konsantrasyonları (80 ve 160 µg/ml) ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

Paklitaksel'in DU 145 ve PC-3 hücre hatları üzerine etkileri

Çalışma kapsamında pozitif kontrol olarak kullanılan paklitakselin, DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojileri üzerindeki etkileri, inverted mikroskop (x10'luk büyütmede) kullanılarak değerlendirildi. Hücelere ait mikroskopik görüntüler Şekil 4.33'de verildi. Paklitaksel ile 24 saatlik inkübasyon sonrası, konsantrasyon 0,005 µg/ml'ye ulaştığında, hücre hatlarının canlılıklarını büyük oranda kaybettiği küçük ve yuvarlak yapılu hücrelerin varlığından açıkça anlaşılmaktadır. Bu konsantrasyondaki morfolojik değişimler, DU 145 hücrelerinde daha belirgindir. 0,01 µg/ml'lik konsantrasyonda, her iki hücre hattına karşı sitotoksiteyi işaret eden belirtiler daha kayda değerdir. 48 saat sonra, DU 145 hücre hattında doza bağlı hücre ölümlerinin artış gösterdiği incelendi. Bu süre zarfında, PC-3 hücrelerinde DU 145 hücrelerine kıyasla daha zayıf etkiler tespit edildi. 0,005 µg/ml'lik paklitaksel dozunda hücrelerin epitelyal karakterlerini kaybetmeye başladıkları; 0,01 µg/ml'lik paklitaksel dozunda ise hücre yoğunluğunun nispeten daha az olduğu ve hücrelerin yaklaşık yarısının kültür yüzeyinden ayrılması sonucu yuvarlak yapı aldığı görüldü. Paklitakselin farklı dozları ile 72 saatlik tedavi sonrası, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde tespit edilen en iyi sitotoksik aktiviteler mikroskopik olarak da doğrulandı. İki paklitaksel dozunda da, adhezyon yeteneklerinin yok olmasından dolayı kültürdeki tüm DU 145 hücrelerinin besiyeri içinde yüzdüğü belirlendi. PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkiyi gösteren morfolojik değişiklikler; 0,005 µg/ml'lik dozda zayıf iken, 0,01 µg/ml'lik dozda daha belirgindir. Paklitakselin artan dozlara rağmen, hem DU 145 hem de PC-3 hücrelerinin morfolojilerinde dikkate değer değişikliklere neden olmadığı mikroskopik olarak da teyit edildi. Ayrıca, paklitakselin, PC-3 hücrelerine kıyasla, DU 145 hücrelerinde daha iyi etkinlik gösterdiği analiz edildi. Negatif kontrol hücrelerinin ve DMSO (%0,1) ile tedaviye bırakılmış hücrelerin ise, inkübasyon periyodu boyunca canlılıklarını koruyarak çoğalmalarını sürdürdükleri görüldü (Şekil 4.33).

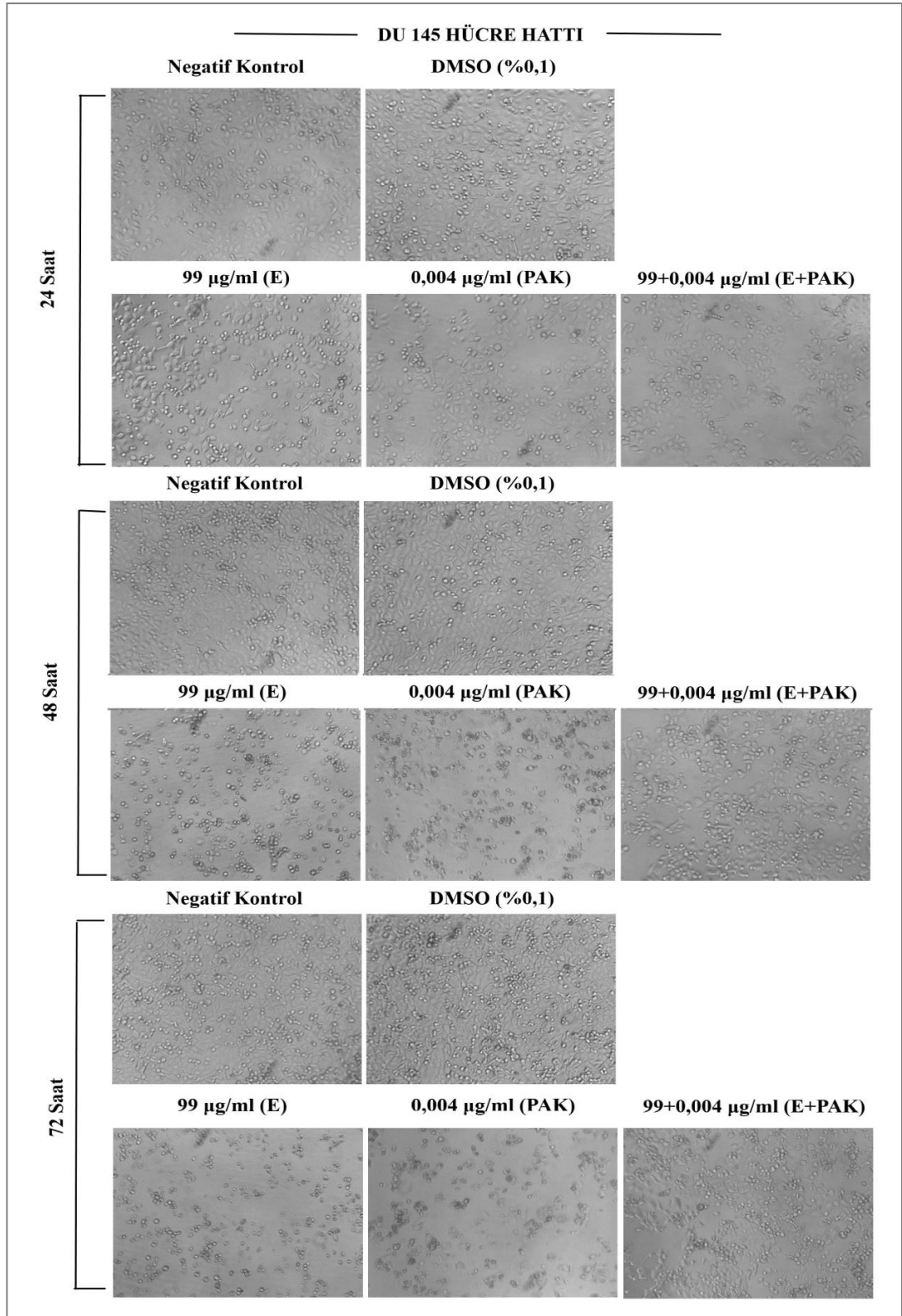


Şekil 4.33. Paklitaxelin farklı konsantrasyonları (0,005 ve 0,01 µg/ml) ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra DU 145 ve PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10)

Kombinasyon tedavisinin DU 145 ve PC-3 hücre hatları üzerine etkileri

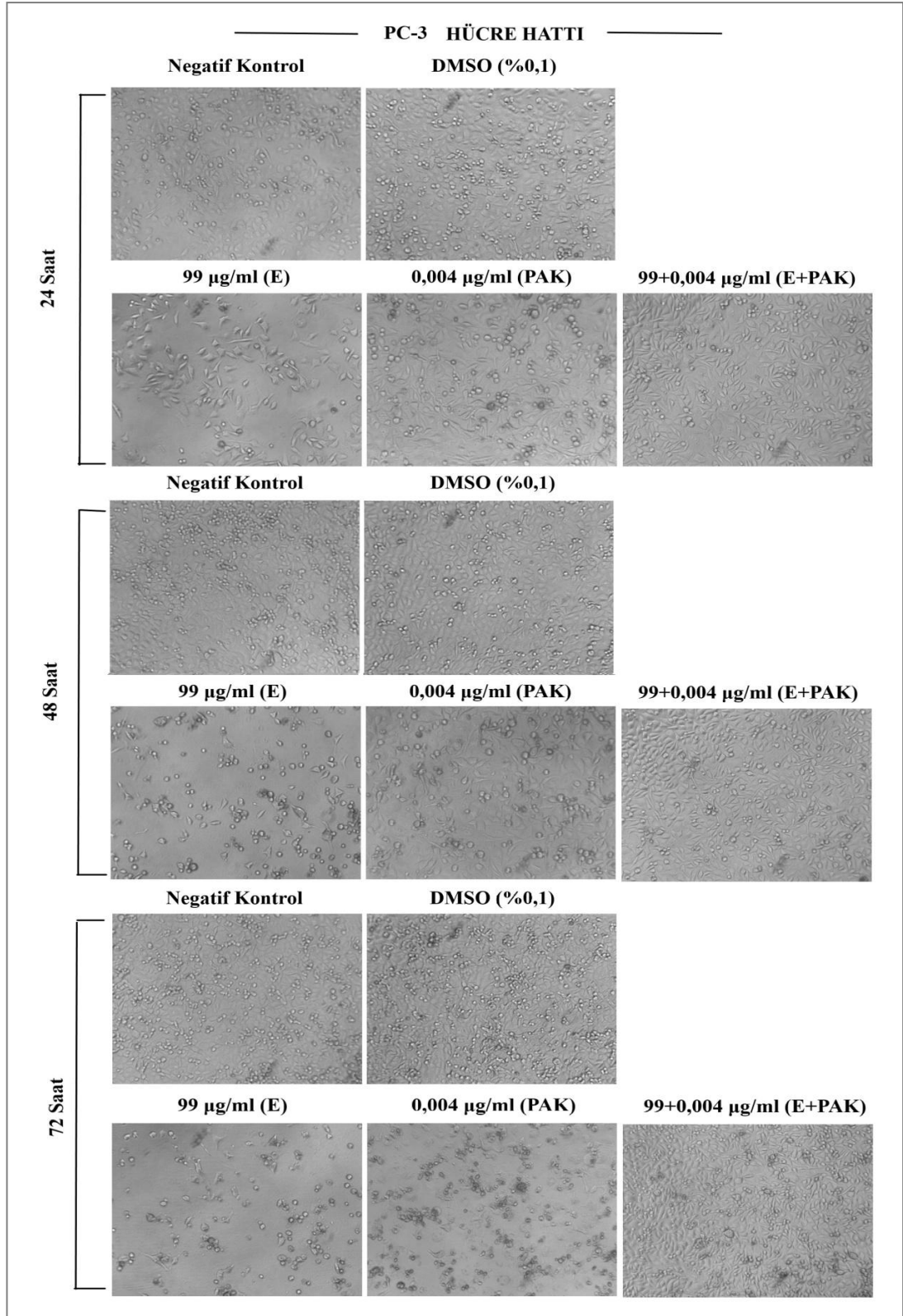
Ham ekstreler arasında sitotoksik olarak en güçlü aktiviteyi sergileyen E kodlu ekstre ile paklitakselin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki kombine etkileri inverted mikroskop (x10'luk büyütmede) kullanılarak analiz edildi. Bu bölümde yalnızca, E kodlu ekstre ve paklitaksel için her iki hücre hattında da en iyi sitotoksik etkilerin gözlemlendiği 99 µg/ml (ekstre) ve 0,004 µg/ml (paklitaksel) konsantrasyonların kombinasyon etkileri verildi.

E kodlu ekstrenin, paklitakselin ve bu iki bileşiğin kombinasyonlarınının 24, 48 ve 72 saatlik mikroskopik sonuçları incelendiğinde; bileşiklerin DU 145 hücrelerinde tek başlarına neden olduğu morfolojik değişikliklerin zamanla arttığı, ancak kombinasyon gruplarında hücre ölümüne bağlı bu değişimlerin ortadan kalktığı incelendi. Özellikle, ekstrenin ve ilacın en etkin olduğu 72. saatte DU 145 hücrelerinin konfluensi durumlarının önemli oranda azaldığı ve besiyeri içinde yüzen yuvarlak yapılı ölü hücrelerin var olduğu görüldü. Buna karşılık, kombinasyon grubundaki hücrelerinin tamamen farklı morfolojide oldukları ve epitelyal karakterlerini korudukları gözlemlendi. Bu tespitlerin, diğer kombinasyon gruplarında da söz konusu olduğu belirtilebilir. Negatif kontrol hücrelerinin ve DMSO (%0,1)'e maruz bırakılmış hücrelerin ise 24, 48 ve 72 saat boyunca sağlıklı oldukları ve proliferasyonlarına devam ettikleri görüldü (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Ekstre ve paklitaksel kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra DU 145 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10). E, ekstre; PAK, paklitakseli ifade etmektedir.

Kombinasyon tedavisi sonrası, DU 145 hücrelerinde elde edilen mikroskopik bulgular, PC-3 hücrelerinde de geçerlidir. E kodlu ekstrenin, paklitakselin ve bu iki bileşimin kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik mikroskopik sonuçları ele alındığında; bileşiklerin, ayrı olarak PC-3 hücre canlılıklarında zamana bağlı önemli azalışlara neden olduğu görüldü. Bu etkinin sonucu olarak, hücre morfolojilerinde belirgin değişiklikler incelendi. Bunun aksine; kombinasyon gruplarındaki hücrelerin morfoloji bakımından negatif kontrol ve DMSO (%0,1) kontrol gruplarından farklılık göstermediği mikroskopik olarak analiz edildi. Ekstrenin ve ilacın en aktif olduğu 72 saatlik tedavi sonrası, PC-3 hücre yoğunluklarının önemli oranda azaldığı ve besiyeri içinde yüzen yuvarlak yapılı ölü hücrelerin bulunduğu görüldü. Buna karşılık, kombinasyon grubundaki hücrelerinin epitelyal karakterlerini koruyarak tüm kültür yüzeyini kapladıkları gözlemlendi. Bu tespitlerin, diğer kombinasyon gruplarında da söz konusu olduğu ifade edilebilir. Negatif kontrol hücrelerinin ve DMSO (%0,1)'e maruz bırakılmış hücrelerin ise 24, 48 ve 72 saat boyunca canlılıklarını korudukları görüldü (Şekil 4.35).

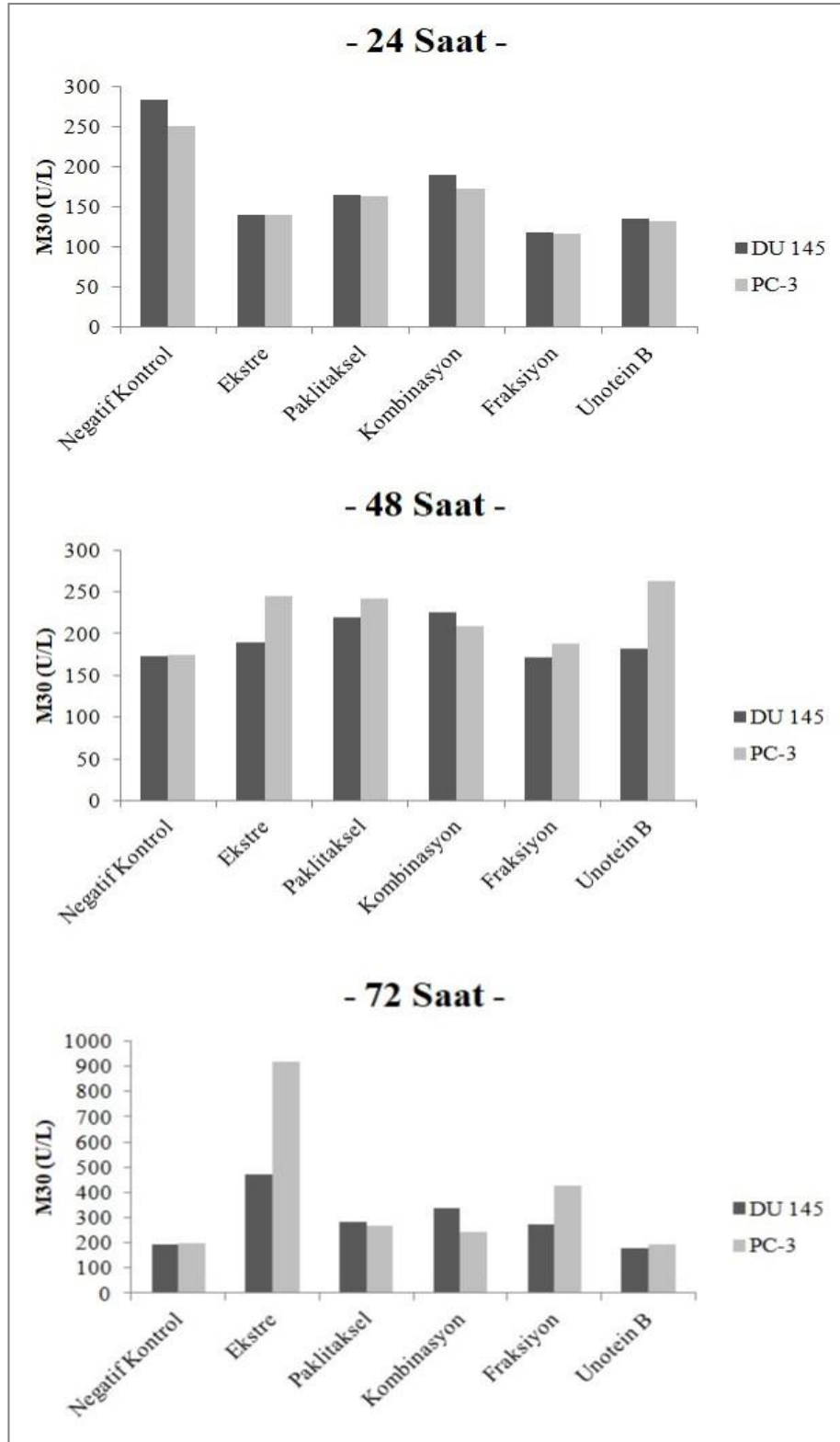


Şekil 4.35. Ekstre ve paklitaksel kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri (x10). E, ekstre; PAK, paklitakseli ifade etmektedir.

Özetle; ham ekstrelerin, kaba fraksiyonların, unotein B'nin, paklitakselin ve kombinasyon gruplarının (E kodlu ekstre+paklitaksel) hücre morfolojileri ve canlılıkları üzerindeki etkileri, 24, 48 ve 72 saat sonunda inverted mikroskop kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçların doğruluğunu teyit etmek için hücre canlılık testleriyle eş zamanlı olarak mikroskop fotoğrafları alındı. Sonuç olarak; DU 145 ve PC-3 hücrelerinin mikroskopik analizleri, SRB ve XTT hücre canlılık testlerinden elde edilen bulguları desteklediği görülmektedir.

4.2.7. Kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerine ilişkin bulgular

Test bileşiklerinin DU 145 ve PC-3 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edildikten sonra, hücrelerdeki apoptoz miktarını belirlemek amacıyla kaspazla kırılmış CK 18 fragmentlerinin (M30) seviyeleri ölçüldü. Ekstre (E), fraksiyon (E2), unotein B, paklitaksel ve kombinasyon (E+paklitaksel) için belirlenen IC₅₀ dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra elde edilen M30 ELISA testi sonuçları Şekil 4.36'da verildi. 24 saatlik tedavi sonucu, uygulanan tüm test bileşikleri için DU 145 ve PC-3 hücrelerinin M30 antijen düzeylerinde anlamlı bir değişim saptanmadı. 48 saat sonunda; DU 145 hücrelerinde fraksiyon dışındaki tüm test bileşiklerinin, PC-3 hücrelerinde ise tüm test gruplarının, negatif kontrole kıyasla, M30 antijen seviyelerinde artışlara neden olduğu, ancak bu artışların bariz bir artış şeklinde olmadığı belirlendi. 72 saatlik tedavi sonrası, unotein B haricinde test edilen tüm bileşenlerin, her iki hücre hattının M30 antijen düzeylerinde de önemli artışlara sebep olduğu görüldü. Özellikle, E kodlu ekstrenin, M30 antijen miktarları üzerindeki etkileri dikkat çekicidir. DU 145 hücrelerinde, ekstrenin M30 antijen konsantrasyonlarını negatif kontrole göre yaklaşık 3 kat arttırdığı gözlenirken, PC-3 hücrelerindeki değişimin yaklaşık 5 kat olduğu belirlendi. 72 saatlik kombinasyon uygulamasının ardından, DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki M30 antijen seviyelerinin, ekstre ve/veya paklitaksele göre düşük olduğunun belirlenmesi, önceki bulguların doğruluğunu güçlendirmektedir. Sonuç olarak; test bileşikleriyle tedavi sonrası, negatif kontrole göre M30 antijen düzeyleri önemli değişimler gösteren DU 145 ve PC-3 hücrelerinde, kaspazların aktivasyonuna bağlı apoptotik sürecin etkin olduğu söylenebilir.



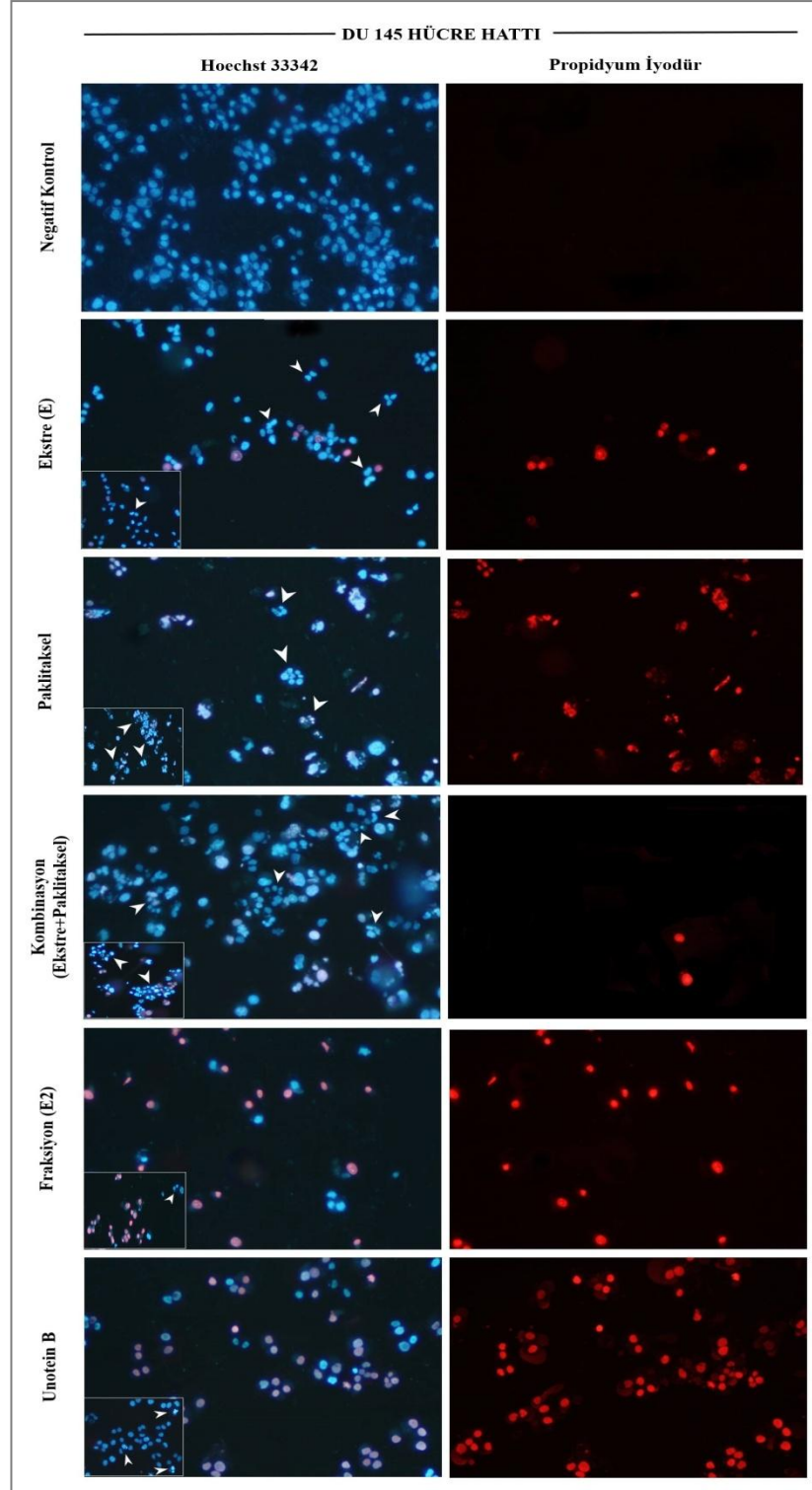
Şekil 4.36. 24, 48 ve 72 saat boyunca ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B uygulanan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeyleri

4.2.8. Floresan mikroskobunda ikili boyama yöntemine ilişkin bulgular

Hücre canlılık testi (SRB ve XTT) sonuçlarından hareketle; hücre ölüm modunu değerlendirmek için floresan mikroskobu kullanılarak ikili boyama yöntemi (Hoechst 33342 ve propidyum iyodür) yürütüldü. Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B için tespit edilen IC₅₀ dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen DU 145 ve PC-3 hücrelerinin nükleus morfolojileri ve membran bütünlükleri, negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldı.

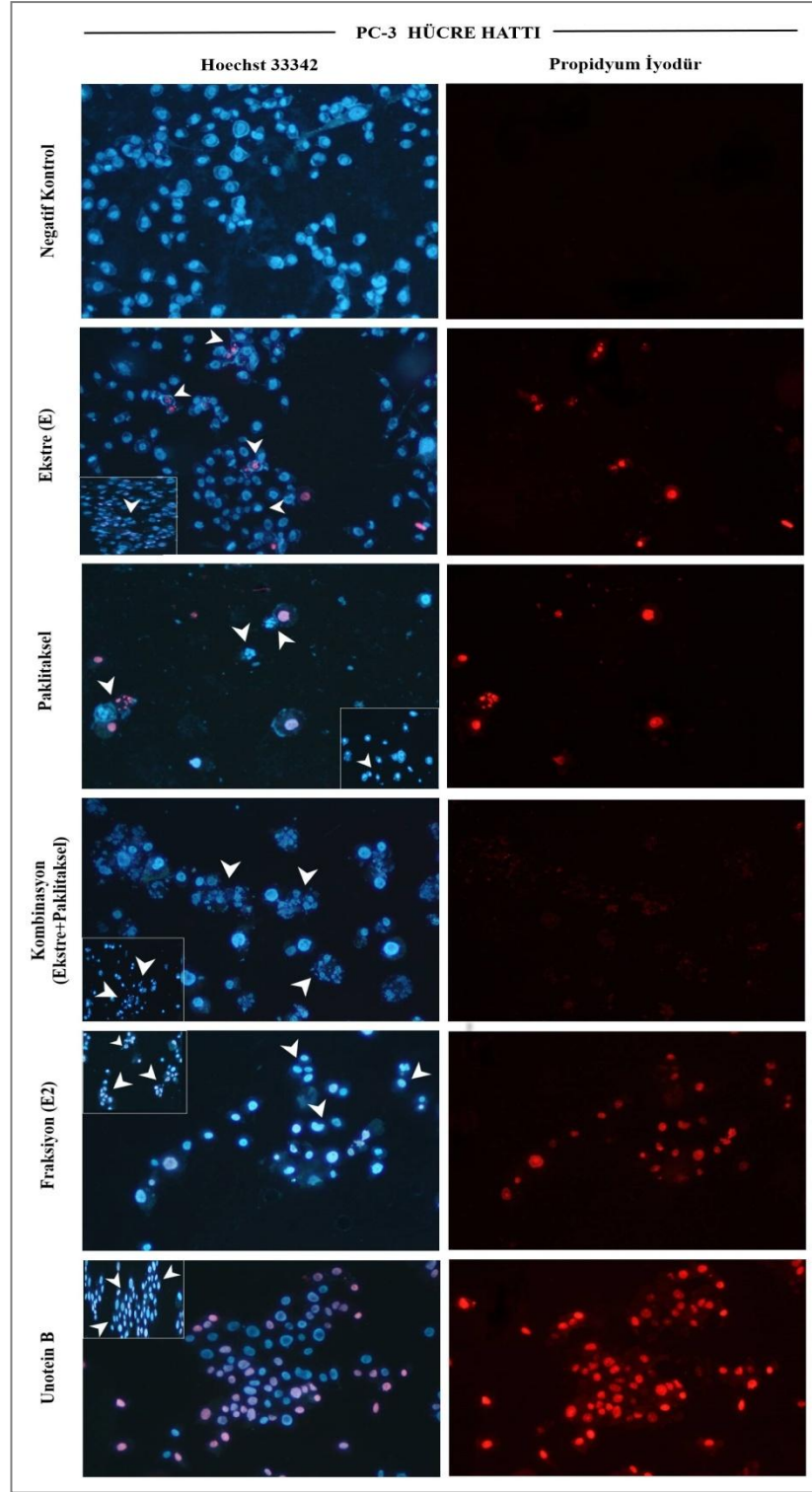
Şekil 4.37’de gösterildiği gibi, DU 145 negatif kontrol hücrelerinin normal ve yuvarlak nükleus morfolojisine sahip olduğu belirlendi. Ekstre, paklitaksel, kombinasyon, fraksiyon ve unotein B ile tedavi edilen DU 145 hücrelerinde ise, piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon gibi apoptoza özgü morfolojik özellikler gözlemlendi. Özellikle ekstre, fraksiyon ve unotein B’ye maruz bırakılan DU 145 hücrelerinde, Hoechst 33342 boyaması sonrası bazı hücre nükleuslarının kırmızımsı renkte oldukları görüldü. Nükleusları kırmızı renkte gözlenen hücreler, membran bütünlüklerini kaybeden hücreler olup propidyum iyodür boyasının hücre içine girmesi sonucu hücre nükleuslarının kırmızı renkte boyandığı incelendi. Bu sebeple, geç apoptotik/sekonder nekrotik hücre ölüm modunun etkin olduğu anlaşılmaktadır. Paklitaksel ile muamele edilmiş DU 145 hücrelerinin, apoptozun karakteristik özelliklerini (piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon gibi) gösterdiği belirlendi. Ayrıca, bu hücrelerin propidyum iyodür için büyük oranda pozitif olduğu saptandı. Bundan dolayı, paklitakselin DU 145 hücrelerinde geç apoptotik/sekonder nekrotik hücre ölümüne neden olduğu tespit edildi. Ekstre ve paklitakselin kombine edilerek uygulandığı DU 145 hücrelerinde, piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon ile nitelendirilen erken apoptotik hücelere rastlanıldı. Ekstre ve paklitakselin tek başlarına sergiledikleri etki ile karşılaştırıldığında; kombinasyon grubunda, daha az hücrenin propidyum iyodür ile boyandığı görüldü. Bu sonuca göre, kombinasyon grubundaki hücrelerin ağırlıklı olarak erken apoptoza gittiği söylenebilmektedir. Özetle; tüm test bileşikleri ile tedavi sonrası DU 145 hücrelerinde gözlenen hücre ölüm şeklinin, genel olarak geç apoptotik/sekonder nekrotik olduğu belirtilebilmektedir. Bununla birlikte; apoptotik morfolojiye sahip olan, ancak propidyum iyodür ile boyanmayan erken apoptoz

döneminde hücrelerin varlığı da söz konusudur. Bu verilere ek olarak; ekstre, paklitaksel, fraksiyon ve unotein B uygulanan DU 145 hücrelerinde hücre yoğunluğunun, negatif kontrole kıyasla, yüksek oranda azaldığı; fakat, kombinasyon grubundaki hücre yoğunluklarında kayda değer azalış olmadığı görüldü (Şekil 4.37). Bu sonuçlar, hücre canlılık testlerinden elde edilen sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir.



Şekil 4.37. Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B uygulanan DU 145 hücrelerinin floresan mikroskopundaki ikili boyama görüntüleri. Negatif kontrol, test bileşikleri uygulanmayan (0 µg/ml) DU 145 hücrelerini ifade etmektedir. → Piknotik nükleus ve/veya nükleer fragmentasyon varlığını göstermektedir.

PC-3 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde; negatif kontrol hücrelerinin, normal ve yuvarlak nükleus morfolojisi sergilediği belirlendi. Ekstre uygulaması sonrası, PC-3 hücrelerinde piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon gibi apoptoz ile ilişkili morfolojik değişimler saptandı. Bununla beraber, bazı hücrelerin membran bütünlüklerini kaybetmeleri nedeniyle nükleuslarının propidyum iyodür boyası ile boyandıkları gözlemlendi. Bu bağlamda; hücrelerin bir kısmı geç apoptotik/sekonder nekrotik olarak, bir kısmı ise erken apoptotik olarak (propidyum iyodür negatif olduğu için) değerlendirildi. Benzer durum, paklitaksel tedavisi sonrasında da gözlemlendi. Ekstre ve paklitaksel kombinasyonuna maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin büyük bir kısmında, piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon gözlemlendi. Ancak, propidyum iyodür için hücrelerin zayıf sinyal gösterdiği incelendi. Bu sebeple, kombinasyon tedavisiyle muamele edilen hücrelerde aktif olan hücre modunun erken apoptoz olduğu söylenebilmektedir. Fraksiyon ve unotein B ile tedavi sonrası, PC-3 hücrelerinde apoptoz göstergesi olarak piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon varlığı gözlemlendi. Ayrıca, bu nükleus morfolojisine sahip hücrelerin büyük bir çoğunluğunun propidyum iyodür için pozitif olduğu saptandı. Bu kapsamda, hem fraksiyonun hem de unotein B'nin PC-3 hücrelerinde geç apoptoz/sekonder nekroza neden olduğu açıkça belirtilebilmektedir. Bu bulguların yanı sıra; test bileşikleriyle tedavi sonrası PC-3 hücre yoğunluklarının, negatif kontrole göre, önemli ölçüde azalış gösterdikleri belirlendi. Kombinasyon grubundaki hücre yoğunluklarının azalışı nispeten daha az olduğu görüldü (Şekil 4.38). Ulaşılan sonuçlar, hücre canlılık testlerinden elde edilen bulgular ile tutarlı bir eğilim sergilemektedir. Floresan mikroskopunda ikili boyama yöntemiyle yapılan analiz sonucu, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde etkin olan hücre modunun, genel olarak geç dönem apoptoz/sekonder nekroz olduğu söylenebilmektedir. Ancak, her iki hücre hattına ait mikroskop görüntülerinde erken dönem apoptotik hücrelerin varlığı da söz konusudur. Bu durum, hücrelerin test bileşiklerine karşı duyarlılık derecelerinin farklı olduğunu göstermektedir. Ekstre veya paklitaksel ile ayrı olarak kıyaslandığında, kombinasyon gruplarındaki propidyum iyodür için pozitif olan hücre sayısının daha az olması, hücrelerin kombinasyona direnç kazanmalarına ve tedaviye daha geç yanıt oluşturmalarına yol açmış olabilir.



Şekil 4.38. Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B uygulanan PC-3 hücrelerinin floresan mikroskopundaki ikili boyama görüntüleri. Negatif kontrol, test bileşikleri uygulanmayan (0 µg/ml) PC-3 hücrelerini ifade etmektedir. → Piknotik nükleus ve/veya nükleer fragmentasyon varlığını göstermektedir.

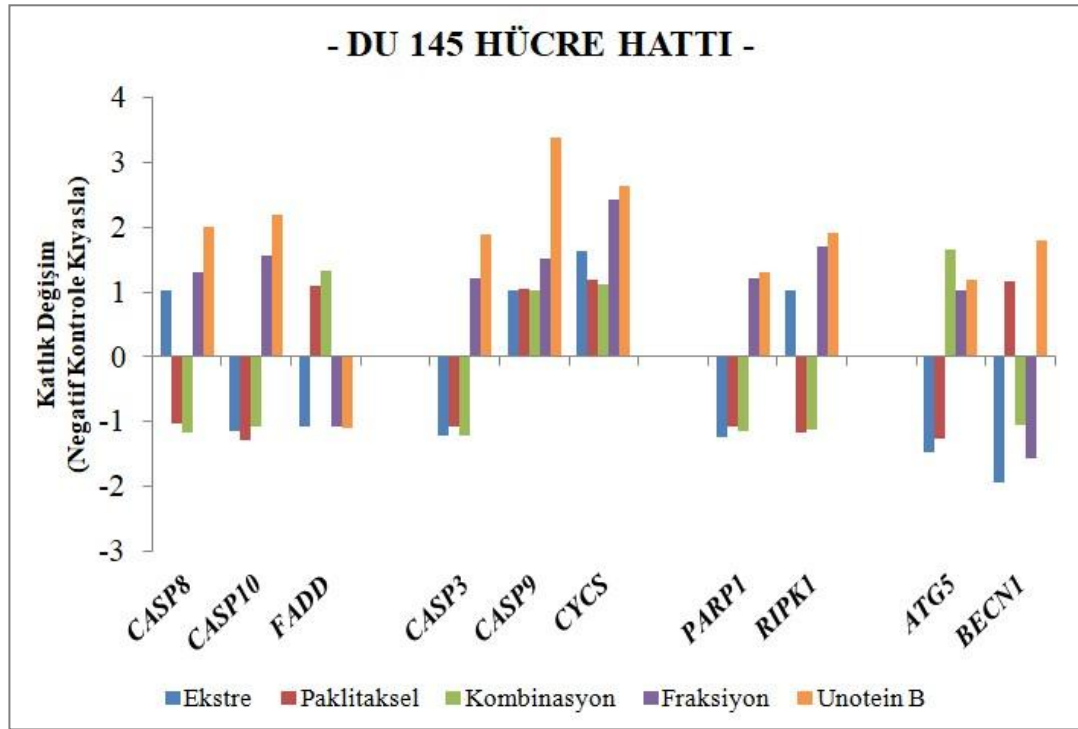
4.2.9. Gen ekspresyon analizine ilişkin bulgular

Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (ekstre+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile 18 saatlik tedavi sonrası, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde aktive olan hücre ölüm modunu (apoptoz, nekroz ve otofaji) mRNA düzeyinde belirlemek amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirildi. Bu bağlamda; hücre ölüm yollarında kilit rol üstlenen *CASP8*, *CASP10*, *FADD* (apoptoz, ekstrinsik), *CASP3*, *CASP9*, *CYCS* (apoptoz, intrinsik), *PARP1*, *RIPK1* (nekroz), *ATG5*, *BECN1* (otofaji) genlerinin ekspresyon profilleri incelendi. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılmak üzere izole edilen RNA'ların miktarları (ng/μl) ve saflıkları (260/280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri) Çizelge 4.12'de gösterildi.

Çizelge 4.12. RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları

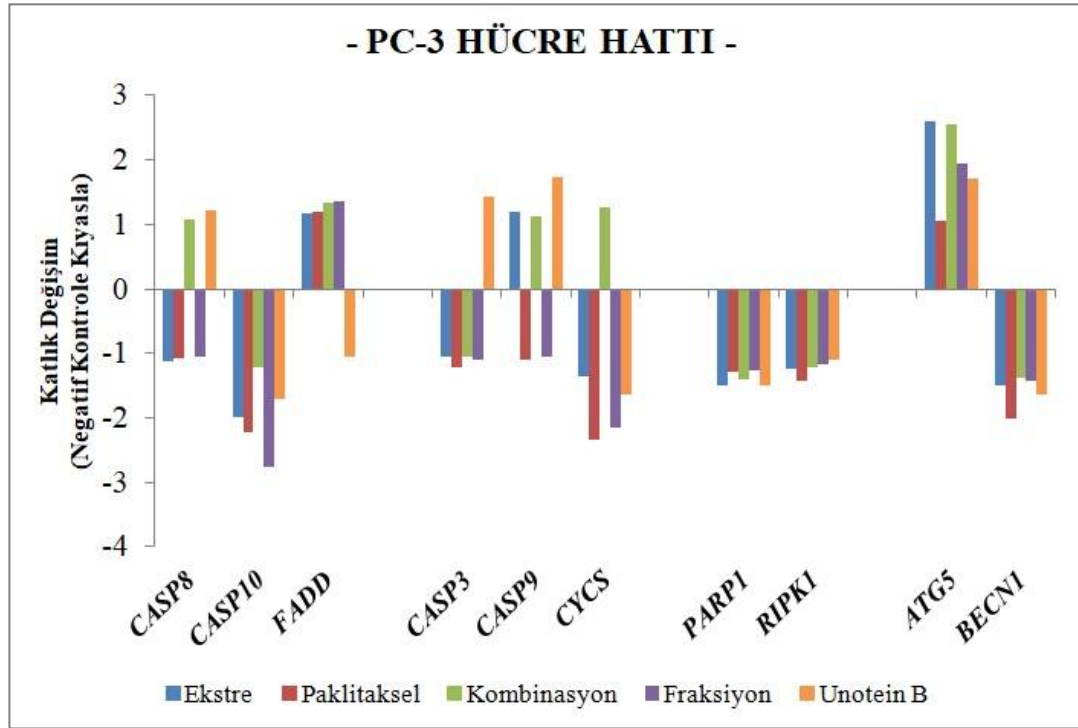
Test Bileşikleri	Konsantrasyon (ng/μl)	Saflık (260/280)
DU 145 Hücre Hattı		
Negatif Kontrol	1161,2	2,11
Ekstre (E)	1181,5	2,11
Paklitaksel	984,8	2,13
Kombinasyon (Ekstre+Paklitaksel)	1230,6	2,12
Fraksiyon (E2)	768,5	2,11
Unotein B	798,2	2,11
PC-3 Hücre Hattı		
Negatif Kontrol	1160,6	2,09
Ekstre (E)	1486,7	2,11
Paklitaksel	1506,9	2,11
Kombinasyon (Ekstre+Paklitaksel)	1266,6	2,11
Fraksiyon (E2)	1745,4	2,12
Unotein B	1529,2	2,13

Ekstre, paklitaksel ve kombinasyon grubu ile tedaviye bırakılan DU 145 hücrelerinde, ölüm yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişim saptanmadı. Buna karşılık; fraksiyon uygulamasının, sadece apoptozun intrinsik yolağında görevli olan *CYCS* geninin ekspresyonunu yaklaşık 2,5 kat arttırdığı ('up regülasyon') tespit edildi. Bununla birlikte; unotein B ile muamele edilen DU 145 hücrelerinde, *CASP8* ve *CASP10* genlerinin (apoptozun ekstrinsik yolağında görevli) ekspresyonları, sırasıyla 2 ve 2,2 katlık anlamlı artış; *CASP9* ve *CYCS* genlerinin (apoptozun intrinsik yolağında görevli) ekspresyonları ise, sırasıyla 3,4 ve 2,6 katlık anlamlı artış gösterdi (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. DU 145 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri

PC-3 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (ekstre+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile 18 saatlik tedavinin, hücre ölüm yollarında (apoptoz, nekroz ve otofaji) görevli genlerin ekspresyonları üzerine etkisi değerlendirildiğinde, DU 145 hücrelerinden farklı bulgulara ulaşıldığı görüldü. Ekstre ve kombinasyon tedavisi sonrası, otofajik hücre ölümü ile ilişkilendirilen *ATG5* geninin ekspresyon düzeylerinde, yaklaşık 3 katlık değişim ('up regülasyon') tespit edildi. Paklitaksel için *CASP10* (apoptoz, ekstrinsik), *CYCS* (apoptoz, intrinsik) ve *BECN1* (otofaji) genlerinin; fraksiyon için ise *CASP10* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişim gözlenmekle birlikte, bu değişimin beklenenin aksine 'down regülasyon' (azalış) şeklinde olduğu incelendi. Unotein B'nin, PC-3 hücrelerinde incelenen genlerin ekspresyonları üzerine anlamlı bir etkisi belirlenmedi (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. PC-3 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri

4.2.10. Western blot analizine ilişkin bulgular

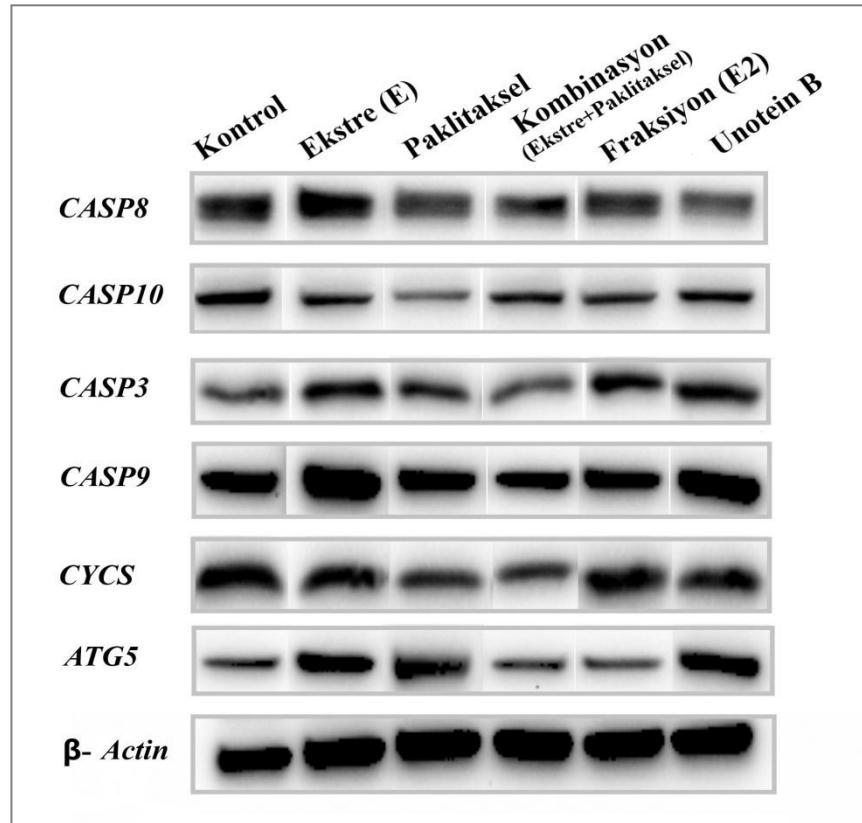
Ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (ekstre+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile 18 saatlik tedavi sonrası, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde aktive olan hücre ölüm modunu (apoptoz ve otofaji) protein düzeyinde belirlemek amacıyla western blot analizi gerçekleştirildi. Bu kapsamda; kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi sonuçlarına göre, ekspresyon profilleri iki hücre hattında anlamlı değişiklik gösteren *CASP8*, *CASP10* (apoptoz, ekstrinsik); *CASP3*, *CASP9*, *CYCS* (apoptoz, intrinsik); *ATG5* (otofaji) genlerinin protein ifadelerindeki değişimler araştırıldı. Western blotlama kullanılmak üzere izole edilen total proteinlerin konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$), Çizelge 4.13'de gösterildi.

Çizelge 4.13. Protein örneklerinin konsantrasyonları

Test Bileşikleri	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)
DU 145 Hücre Hattı	
Negatif Kontrol	7,86
Ekstre (E)	8,14
Paklitaksel	7,66
Kombinasyon (Ekstre+Paklitaksel)	8,47
Fraksiyon (E2)	6,14
Unotein B	6,60
PC-3 Hücre Hattı	
Negatif Kontrol	7,05
Ekstre (E)	5,56
Paklitaksel	6,69
Kombinasyon (Ekstre+Paklitaksel)	6,72
Fraksiyon (E2)	5,75
Unotein B	6,05

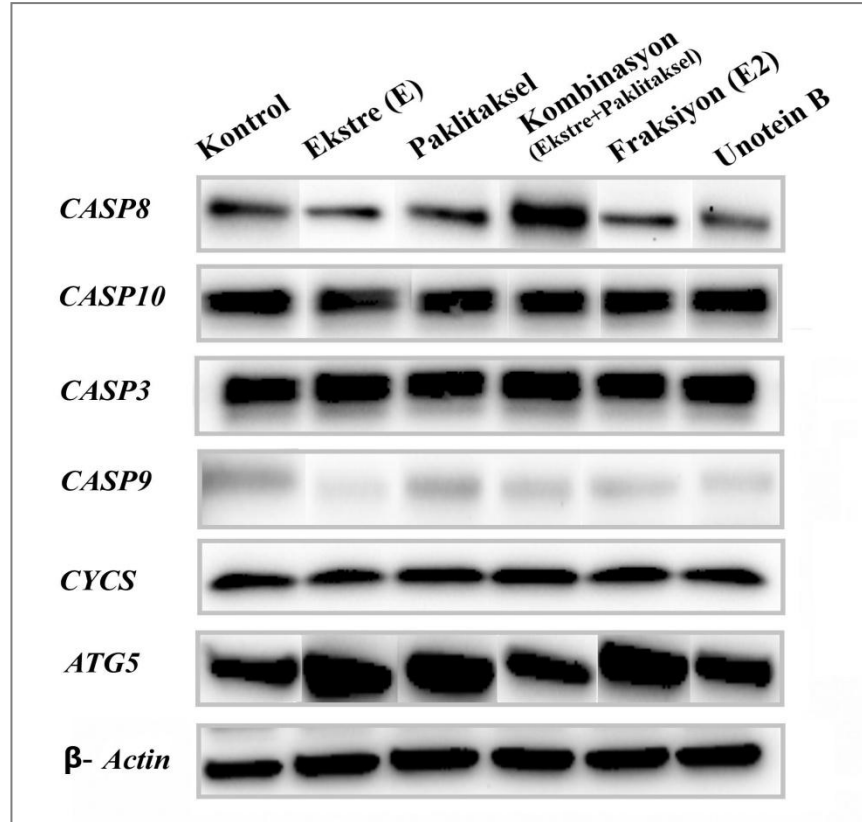
Test bileşiklerinin, DU 145 hücrelerinde apoptoz ve otofaji ile ilgili proteinlerin ekspresyonları üzerine etkisi Şekil 4.41'de gösterildi. Ekstre ile tedaviyi takiben; *CASP3*, *CASP9* ve *ATG5* protein ekspresyonlarında, kontrole kıyasla, anlamlı artışlar tespit edildi. Bu bulgular; ekstreinin, DU 145 hücrelerinde hem apoptozun intrinsik yolağını hem de otofajiyi aktive ettiğini göstermektedir. Paklitakselin *ATG5* protein düzeyinde artışa yol açtığı gözlenirken, *CASP10* ve *CYCS* protein ekspresyonlarında kısmi azalışlara neden olduğu saptandı. Bu verilere dayanarak; paklitakselin, DU 145 hücrelerinde etkinleştirdiği ölüm modunun otofaji olduğu söylenebilmektedir. Ekstre ile

paklitakselin kombine edildiği hücre grubunda ise; *CASP8*, *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* ifade seviyelerinde, ekstreye kıyasla, azalışlar gözlemlendi. Bunun yanı sıra, ekstrenin ve paklitakselin ayrı olarak uygulanması sonucu *ATG5* ekspresyonunda incelenen artışın, kombinasyon durumunda azaldığı görüldü. Elde edilen bu sonuçlar, kombinasyon durumunda sitotoksik etkinin kaybolduğunu ortaya koyan SRB ve XTT testi bulgularını destekler niteliktedir. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi sonuçlarından farklı olarak, fraksiyonun yalnızca *CASP3* protein ifadesinde artışa neden olduğu belirlendi. Bununla birlikte, unotein B ile tedavi sonucu *CASP3*, *CASP9* ve *ATG5* proteinlerine ait ekspresyon düzeylerinde, kontrole oranla, anlamlı artışlar incelendi. Unotein B için western blotlama ile tespit edilen bu bulguların, gen ekspresyon sonuçları ile kısmen benzerlik taşıdığı görülmektedir.



Şekil 4.41. DU 145 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili proteinlerin ekspresyon profilleri. Yükleme kontrolü olarak β -Actin kullanıldı.

PC-3 hücrelerinde, apoptoz ve otofaji ile ilişkili proteinlerin ekspresyon profillerindeki değişiklikler Şekil 4.42'de gösterildi. Ekstre ile tedavi edilen PC-3 hücrelerinde, apoptozun intrinsik yolağında görevli *CASP9* proteini için sinyal gözlenmezken, *ATG5* protein ifadesinde kontrole kıyasla önemli artış tespit edildi. Bu bulgu, hücrelerde otofajik ölümün gerçekleştiğini göstermektedir ve gen ekspresyon analizi sonuçlarını desteklemektedir. Paklitaksel tedavisi sonrası, ekspresyon profilinde gözlenen dikkate değer tek değişimin, *ATG5* protein ekspresyonundaki artış olduğu incelendi. Kombinasyon grubu için elde edilen protein bantları incelendiğinde, ekstre ve paklitakselin tek başlarına uygulanmasında artan *ATG5* protein ifadesinin önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Bu veri, SRB ve XTT testlerinin sonuçlarını doğrulamaktayken; mRNA (gen) ekspresyon analizi sonuçları ile tutarsız bir eğilim göstermektedir. Buna karşılık; kombinasyon grubu için *CASP8* proteininde, ekstreya veya paklitaksele oranla, ekspresyon artışı olduğu saptandı. Bu veri, floresan boyama çalışmasıyla yüksek oranda tespit edilen erken apoptotik hücreleri işaret etmektedir. Fraksiyon tedavisine maruz bırakılan hücrelerin *ATG5* protein ifadesinde artış gözlenmesi, otofajik hücre ölüm şeklinin varlığına dayandırılabilir. Unotein B ile muamelenin, protein ekspresyon seviyeleri üzerine anlamlı bir etkisinin bulunmadığı, gen ekspresyon sonuçlarında olduğu gibi western blot bulgularında da incelendi.



Şekil 4.42. PC-3 hücrelerinde; ekstre (E), paklitaksel, kombinasyon (E+paklitaksel), fraksiyon (E2) ve unotein B ile tedavi sonrası hücre ölüm yolları ile ilişkili proteinlerin ekspresyon profilleri. Yükleme kontrolü olarak β -Actin kullanıldı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser çağımızın en önemli sağlık sorunudur. Her yıl milyonlarca insan kanser hastalığına yakalanmakta ve kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Anonim 2019a, Anonim 2020a). Günümüzde, kanser insidansı ve mortalite oranlarında görülen artışa paralel olarak kanser alanındaki araştırmalar da giderek hız kazanmaktadır. Bu araştırmaların odaklandığı temel noktalar, tedavi esnasında karşılaşılan problemleri çözüme ulaştıracak ve tedavide tam başarı sağlayacak etkili tedavi seçenekleri geliştirmektir.

Prostat kanseri, ülkemizde ve dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür (Anonim 2019a, Anonim 2020a). Multifaktöriyel bir hastalık olan prostat kanserinde, yaş almanın ve aile öyküsünün en önemli risk faktörleri oldukları bildirilmiştir (Schulz ve ark. 2003, Kral ve ark. 2011, Anonim 2013). Prostat kanserinde, hastalığın evresine ve yayılımına ek olarak hastanın durumu da değerlendirilerek uygun bir tedavi yöntemi planlanmaktadır. Metastaz olgusu bulunmayan ve lokalize haldeki prostat kanserlerinde radikal prostatektomi olarak da adlandırılan cerrahi müdahale veya radyoterapi yöntemleri kullanılırken, ileri evredeki ve metastaz saptanmış prostat kanserlerinde, kemoterapi ve hormon tedavisi tek başlarına ya da kombine halde uygulanabilmektedir (Gilligan ve Kantoff 2002, Schulz ve ark. 2003, Anonim 2019c). Bu tedavi seçenekleri sayesinde, prostat kanserinde sağ kalım süreleri uzatılabilmekte ve uygulanan tedavilerden başarı elde edilebilmektedir. Buna karşılık; tedaviye cevap vermeme, direnç kazanma gibi etkinliği sınırlandıran durumlar ile karşılaşmak, prostat kanseri tedavisinin başarı oranını ciddi ölçüde düşürmektedir. Bundan dolayı, günümüzde uygulanan tedavi protokollerinde, tam etkinlik gösterebilecek ve prostat kanserine özgü aktif kemoterapötik ajanlara gereksinim vardır.

Bitkiler âlemi, kanser alanındaki çalışmalar için her zaman mükemmel bir kaynak olmuştur. Günümüzde, klinikte kullanılan bitkisel kökenli ilaçların yaklaşık dörtte üçünün geleneksel bitki ilaçlarından türev alması, ilaç geliştirme sürecinde bitkilerin ne kadar değerli olduğunun altını çizmektedir (Eid ve ark. 2015). Bu bağlamda, belirli hastalıklara iyi geldiği düşünülerek, tecrübeye dayalı olarak yıllar boyunca kullanılan tıbbi bitkilerin, etnobotanik veriler doğrultusunda bilimsel olarak değerlendirilmesi

büyük önem taşımaktadır. Böylelikle, etnobotanik bilgi birikimleri yeni antikanser ilaçların ve etken bileşiklerin keşfedilme sürecine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, geleneksel tıpta kullanılan bitkiler hakkında elde edilen verilerin bilimsel olarak ispatlanmasına da olanak tanımaktadır (Başer 1995, Sadıkoğlu 1998).

Etnobotanik veriler ışığında, hücre ölüm yollarının (apoptoz, nekroz ve otofaji) aktivasyonunda etkili olabilecek ve prostat kanserinin tedavisine yeni ilaçlar sağlama potansiyeli gösterebilecek tıbbi bitkiler tarafımızca araştırılmıştır ve Onagraceae familyasına ait *Epilobium hirsutum* L. (tüylü yakı otu) bitkisinin, tez kapsamında incelemeye değer bir bitki olduğu kanaatine varılmıştır. *E. hirsutum* bitkisinin, halk tıbbında başta prostat kanseri olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanımına ilişkin bilgiler mevcuttur (Hiemann 1983, Hiemann ve ark. 1986, Pogrel ve ark. 1993, Hostettmann 1995, Gruenwald 1998, Gruenwald ve ark. 2000, Tita ve ark. 2001, Everest ve Öztürk 2005). Bununla birlikte; yapılan literatür taramasında, sözü edilen bitkinin prostat kanseri ve diğer kanser türlerindeki biyolojik aktivitelerini araştıran çok az sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Ayrıca, *Epilobium* cinsine ait diğer türler ile ilgili yapılan araştırmaların da kısıtlı olduğu gözlenmiştir. Literatürde, *E. hirsutum* bitkisinin DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Üstelik söz konusu bitkiden ‘biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı’na göre hazırlanan ekstraktların ve fraksiyonların *in vitro* sitotoksik etkisini moleküler kapsamda analiz eden herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Bu açıdan ele alındığında; mevcut tez çalışması, bu bitkinin DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki sitotoksik etkilerini moleküler seviyede ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu bağlamda, tez çalışmasının yeni bilgiler ile literatüre katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

E. hirsutum bitkisinin DU 145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini belirleyebilmek, bitkideki etken maddeleri izole edebilmek ve tanımlayabilmek için ‘biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımı’ temel alınmıştır. Biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi, bitkisel materyallerde karışım halinde bulunan fitokimyasallar arasındaki aktif bileşiklerin konsantre olarak elde edilmesine ve tanımlanmasına fayda sağlayan modern bir yöntemdir (Hook ve ark.

1997). Tez kapsamında çalışma materyalini oluşturan *E. hirsutum* bitkisinin etnobotanik/etnofarmakolojik öneme sahip olması nedeniyle, biyolojik aktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımına göre kapsamlı bir ön ekstraksiyon çalışması gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla, bitkinin toprak üstü kısımlarından değişen polaritelerde çözücüler ve farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ham ekstratlar hazırlanmıştır. Ekstrelerin ve fraksiyonların DU 145 ve PC-3 hücre hatları üzerindeki *in vitro* aktiviteleri sitotoksik olarak taranmıştır.

E. hirsutum bitkisinden elde edilen 9 farklı ham ekstrenin etkileri, ilk olarak SRB hücre canlılık testiyle değerlendirilmiştir. SRB testi, Ulusal Kanser Enstitüsünün 1985 yılında başlattığı büyük ölçekli antikanser ilaç keşfi programında kullanılan bir test olması sebebiyle seçilmiştir (Aslantürk 2018). Ham ekstratlar (3,13-200 µg/ml) ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonunda SRB testiyle elde edilen sonuçlara göre; E (su ile maserasyona tabi tutulan) ve H (%80 metanol ekstresi ile geri çeviren soğutucuda ekstre edilen) kodlu ekstratlar, analiz edilen tüm ham ekstratlar arasında iki hücre hattına karşı da en güçlü sitotoksik aktiviteleri sergileyen ekstratlardır.

Bitkisel kökenli materyallerin sitotoksitesisi çalışılırken, farklı bir parametreye bağlı olarak hücre canlılığı ölçen bir test ile sonuçların doğrulanması gerekmektedir (Keepers ve ark. 1991, Patel ve ark. 2009, Patel ve Patel 2011, Vajrabhaya ve Korsuwannawong 2018). Bu sebeple; tez çalışmasında SRB testine ilave olarak, XTT testi ile de sitotoksitesite araştırılmıştır.

XTT hücre canlılık testi, SRB testinde olduğu gibi aynı deneysel şartlar altında gerçekleştirilmiştir. 24, 48 ve 72 saat boyunca ham ekstratlar (3,13-200 µg/ml) ile tedavi sonrası, XTT testiyle elde edilen sonuçlara göre; E kodlu ekstrenin, tüm ekstratlar arasında iki hücre hattına karşı da en güçlü sitotoksik aktiviteyi gösteren ekstre olduğu tespit edilmiştir. SRB ve XTT hücre canlılık testleriyle en güçlü sitotoksik etkiler, en düşük IC₅₀ değerlerinin hesaplandığı 72 saatlik tedavi süresi sonunda elde edilmiştir. SRB ve XTT testi sonuçlarına hesaplanan IC₅₀ değerleri kıyaslanarak en güçlü sitotoksitesiteye (= en düşük IC₅₀ değerlerine yol açarak) neden olan ekstre ve/veya ekstratlar belirlenmeye çalışılmıştır. SRB testi sonuçlarına göre; iki hücre hattına karşı

en iyi sitotoksik etkiyi sergileyen E ve H kodlu ekstrelerin, 72 saat sonunda hesaplanan IC₅₀ değerleri sırasıyla; DU 145 hücreleri için 67,14 µg/ml ve 55,96 µg/ml iken, PC-3 hücreleri için 94,50 µg/ml ve 87,17 µg/ml'dir. XTT testi bulguları incelendiğinde; her iki hücre hattı üzerinde, en güçlü sitotoksik aktivitenin tespit edildiği E kodlu ekstrenin, DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri ise, sırasıyla 64,58 µg/ml ve 53,23 µg/ml'dir. H kodlu ekstre için XTT testiyle hesaplanan IC₅₀ dozları; DU 145 hücrelerinde 99,02 µg/ml, PC-3 hücrelerinde 100,46 µg/ml olup SRB testiyle elde edilen değerlerden nispeten daha yüksek olarak bulunmuştur. Stolarczyk ve ark. (2013a, 2013b), *E. hirsutum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan su ekstresinin farklı dozlarının (20, 50 ve 70 µg/ml) LNCaP androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisini değerlendirmiş olup 72 saatlik tedavi sonrasında su ekstresinin IC₅₀ değerini 37,3 µg/ml olarak belirlemiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, E kodlu ekstre için mevcut tez çalışmasında elde edilen IC₅₀ değerleri nispeten daha yüksek olsa da, sonuçların birbirine yakın ve bizim çalışmamızı destekleyici özellikte olduğu görülmektedir. Stolarczyk ve ark. (2013a, 2013b); *E. hirsutum* su ekstresinin sitotoksik etkisini, bizim çalışmamızdan farklı olarak, androjen bağımlı bir prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP'de analiz etmiştir. Ayrıca, uygulanan ekstraksiyon yöntemi de bizim çalışmamızdan farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, bitkilerin yetiştikleri lokasyonlar farklıdır ve buna bağlı olarak, sahip oldukları fitokimyasal kompozisyonlar da farklılık göstermiş olabilir Tüm bunlar göz önüne alındığında, IC₅₀ değerlerindeki kısmi farklılıklar beklenen bir durumdur.

Epilobium cinsine ait diğer türler olan *E. angustifolium* ve *E. parviflorum* bitkilerinden hazırlanan su ekstralarının LNCaP hücrelerinde sitotoksik etkilere neden olduğu gösteren *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur (Stolarczyk ve ark. 2013a, 2013b, Piwowarski ve ark. 2017). Kiss ve ark. (2006a, 2006b) tarafından yürütülen çalışmalarda, *E. angustifolium* su ekstresinin SK-N-SK nöroblastoma hücreleri ve PC-3 androjen bağımsız prostat kanseri hücreleri karşısında, sırasıyla 50 µg/ml ve 100 µg/ml IC₅₀ dozları ile yüksek sitotoksik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Daha erken tarihli bir araştırma, farklı *E. parviflorum* ekstraları arasından, sadece su ekstresinin antiBPH etki sergilediğini göstermiştir (Lesuisse ve ark. 1996, Ducrey ve ark. 1997). Başka bir çalışmada ise, *E. rosmarinifolium*, *E. angustifolium*, *E. tetragonum*, *E. palustre* ve *E.*

hirsutum bitkilerinin farklı ekstralarının; PZ-HPV-7 (transforme epitelyal prostat hücreleri), HMEC (primer mem epitel hücreleri), 1321N1 (beyin hücreleri) ve LNCaP hücreleri gibi farklı birçok insan hücre hattı karşısında antiproliferatif aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada, ilgili bitki türleri için 100-780 µg/ml arasında değişen IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Çalışmada etanol ekstralarının kullanılması, yüksek IC₅₀ değerlerinin elde edilmesinin sebebi olarak açıklanmıştır (Vitalone ve ark. 2003a, Vitalone ve ark. 2003b). Tez çalışmasında elde edilen bulgular, literatür bilgileriyle karşılaştırıldığında; *E. hirsutum* ve diğer *Epilobium* türlerinden hazırlanan su ekstralarının, prostat kanseri hücre hatları karşısında daha güçlü sitotoksositeye yol açtığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda da en iyi sitotoksik etkiyi gösteren ekstrenin su ekstresi olduğu bulunmuştur. Yapılan morfolojik analiz ile elde edilen mikroskop görüntüleri de bu bulguları desteklemektedir. Bu bağlamda; ulaşılan sonuçlar, literatürdeki diğer çalışma sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

Bu veriler ışığında; biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yaklaşımına göre, farklı polaritedeki çözücüler ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak E kodlu su ekstresinden kaba fraksiyonlama yapılmıştır. Kaba fraksiyonların DU 145 ve PC-3 hücreleri üzerindeki etkileri, 1,56-100 µg/ml doz aralığındaki 24, 48 ve 72 saatlik tedavilerden sonra SRB ve XTT testleriyle incelenmiştir. İki testin analiziyle ulaşılan sonuçlar; DU 145 ve PC-3 hücrelerinde en aktif fraksiyonun E2 kodlu etil asetat fraksiyonunun olduğunu göstermiştir. Bu fraksiyon için en güçlü sitotoksik etkiler, 72 saatlik tedavi sonunda saptanmış olup DU 145 ve PC-3 hücrelerinin IC₅₀ değerleri; SRB testi için 67,80 µg/ml ve 52,24 µg/ml iken XTT testi için >100 µg/ml ve 73,22 µg/ml'dir. Literatürde, *E. angustifolium* etil asetat ve *n*-butanol ekstralarının, benign prostat hiperplazisi epitel-1 (BPH-1) hücrelerinde *in vitro* antiBPH etkiler gösterdiği bildirilmesine (Deng ve ark. 2019) karşılık, etil asetat ve *n*-butanol ekstralarının prostat kanseri hücrelerindeki sitotoksik aktivitelerine dair herhangi bir araştırma yoktur. Bu tez çalışmasında; fraksiyonlar için elde edilen IC₅₀ sonuçları, E kodlu ekstre için hesaplanan IC₅₀ değerleri ile karşılaştırıldığında, E2 kodlu fraksiyonunun ve diğer fraksiyonların DU 145 ve PC-3 hücrelerinde E kodlu ekstre kadar etkili olmadığı görülmüştür. Ayrıca, mikroskop görüntüleri de, ulaşılan sonuçları destekleyici niteliktedir. Bu bulgular, E kodlu ham ekstrede bulunan etken maddelerin veya bileşiklerin birlikte bulunmaları

durumunda sinerjik etki gösterdiklerini açıklamaktadır. Stolarczyk ve ark. (2013b), *E. hirsutum* su ekstresinde tüm bileşiklerin bir arada bulunmasının ve bu bileşiklerin aditif ve/veya sinerjik etkilerinin bir sonucu olarak, *E. hirsutum* bitkisinin LNCaP hücrelerinde önemli biyolojik aktiviteler gösterdiğini ifade etmiştir.

Birçok çalışmada, *Epilobium* türlerinden hazırlanan polar ekstrelerde dominant olarak bulunan dimerik makrosiklik ellajitanen bileşiği olan unotein B'nin ekstrelerin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu ve özellikle antikanser etki gösterdiği ifade edilmiştir (Ducrey ve ark. 1997, Kiss ve ark. 2006b, Kiss ve ark. 2011, Stolarczyk ve ark. 2013a, 2013b, Granica ve ark. 2014). Mevcut tez çalışmasında, farklı polaritedeki ekstrelerin sitotoksik aktivitelerinin taranması sonucu, polar özellikteki su ekstresinde en güçlü etkiler gözlenmiştir. Bu sonuçtan hareketle, su ekstresinin biyolojik aktivitesinde unotein B bileşiğinin de önemli bir katkısı olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, unotein B'nin (2,5-160 µg/ml) DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saat boyunca SRB ve XTT testleriyle analiz edilmiştir. Unotein B'nin en güçlü etkisi, her iki hücre hattında da 72 saatlik tedaviyi takiben belirlenmiştir ve mikroskop görüntüleri elde edilen sonuçları kanıtlamaktadır. Bu maddenin, DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ dozları, SRB testiyle 61,74 µg/ml ve 51,43 µg/ml olarak, XTT testiyle 117,26 µg/ml ve 72,06 µg/ml olarak tespit edilmiştir. *E. hirsutum* bitkisinden izole edilen unotein B'nin LNCaP hücrelerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, unotein B'nin IC₅₀ değeri 7,8 µg/ml olarak bulunmuştur (Stolarczyk ve ark. 2013b). Tez çalışmasında, belirlenen IC₅₀ değerlerinin yüksek olması, ticari olarak firmadan temin edilen hazır unotein B maddesinin kullanılmasından kaynaklanabilir. Bizim çalışmamıza benzer olarak, ticari unotein B bileşiğinin A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanserindeki antiproliferatif etkisinin araştırıldığı çalışmada IC₅₀ değeri 25,49 µM (= 40 µg/ml) olarak bulunmuştur (Pei ve ark. 2019). Lythraceae familyasına ait *Cuphea hyssopifolia* bitkisinden izole edilen unotein B bileşiğinin 36 saat boyunca; KB (epidermoid karsinoma), HeLa (servikal karsinoma), DU 145 (androjen bağımsız prostat karsinoma) ve Hep 3B (hepatoselüler karsinoma) insan karsinoma hücre hatlarındaki büyüme baskılayıcı etkileri analiz edilmiştir ve 11,4-54,5 µg/ml aralığında değişiklik gösteren IC₅₀ dozları hesaplanmıştır (Wang ve ark. 1999). Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermekte olup, unotein B'nin

önemli bir antikanser bileşik olduğunu gözler önüne sererek bulgularımızı desteklemektedir.

Söz konusu tez çalışmasının her deneysel aşamasında, pozitif kontrol olarak paklitaksel kullanılmıştır. Paklitakselin prostat kanseri hücre hatlarındaki IC₅₀ dozları, çalışmalarda geniş bir aralıkta değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmalarda, IC₅₀ dozları nM, µM veya µg/ml olarak ifade edilmektedir. Tez çalışmasında, paklitakselin IC₅₀ dozları, kıyaslamada kolaylık sağlaması adına test edilen diğer bileşiklerin IC₅₀ dozları ile birlikte µg/ml biriminde verilmiştir. SRB ve XTT testleriyle, paklitaksel için DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki en düşük IC₅₀ değerleri, 72 saatlik inkübasyon sonunda hesaplanmıştır. DU 145 ve PC-3 hücre hatlarında, SRB testiyle elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla, 0,0029 µg/ml (= 3,08 nM) ve 0,0045 µg/ml (= 5,44 nM) iken, XTT testiyle elde edilen IC₅₀ değerleri ise sırasıyla, 0,0041 µg/ml (= 4,86 nM) ve 0,0048 µg/ml (= 5,94 nM)'dir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, firmadan ticari olarak hazır temin edilen paklitaksel ile yapılan çalışmalarda paklitakselin sitotoksik etkinlikleri araştırılmıştır. Kreis ve ark. (2001), paklitakselin 72. saatteki IC₅₀ dozlarını DU 145 hücrelerinde 15,73 µM, PC-3 hücrelerinde ise 12,35 µM olarak bulmuştur. Dogan Sigva ve ark. (2019) ise, DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki paklitaksel IC₅₀ dozlarını sırasıyla, 8,85 µM ve 3,08 µM olarak hesaplamıştır. Bu verilerden hareketle, tez çalışmasında analiz edilen paklitakselin, DU 145 ve PC-3 hücreleri karşısında daha iyi sitotoksik etki gösterdiği söylenebilmektedir.

Ham ekstreler, kaba fraksiyonlar ve unotein B ile tedavi sonrası, en düşük IC₅₀ değerleri, başka bir ifadeyle; en güçlü sitotoksik etkiler 72 saatlik tedavide sonunda gözlenmiştir. 72 saatin uzun bir tedavi süresi olduğu düşünülse de, farklı dozlar kullanılarak birçok ekstrenin sitotoksik aktivitelerinin tarandığı çalışmalar için bu tedavi aralığı yararlı olmaktadır (Ulukaya ve ark. 2008). Ayrıca, bu çalışmada kullanılan DU 145 ve PC-3 hücrelerinin en az 96 saate kadar canlılıklarını koruduğu gözlenmiştir. Ham ekstreler, kaba fraksiyonlar, unotein B ve paklitaksel ile 72 saatlik tedavi süresi sonunda bile az sayıda hücrenin canlılıklarını koruduğu çekilen mikroskop fotoğraflarında da görülmüştür.

Çalışma kapsamında, E kodlu ekstrenin DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki dikkate değer sitotoksik etkileri göz önüne alındığında, sözü edilen ekstrenin, prostat kanseri tedavisinde kullanılan bir ilaç olan paklitaksel ile kombine etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır. SRB ve XTT testleri ile yapılan analiz sonuçlarında, tüm kombinasyon gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süresi boyunca sinerjik etkiye ilişkin bir belirtiye rastlanılmamıştır. Sitotoksik olmayan ($<IC_{50}$) bitki ekstresi ile paklitakselin kombine edildiği hücre gruplarının yanı sıra, sitotoksik ($>IC_{50}$) ekstre ve paklitaksel ile kombine edilen hücre gruplarında dahi canlılık oranlarının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Mikroskopta yapılan morfolojik gözlemler de bu sonuçları desteklemektedir. Bu veriler ışığında, ekstre ile paklitakselin aynı hücre kültüründe bulduklarında, etkileşime girerek antagonistik bir etki yarattıkları ve sitotoksik aktivitelerin inhibe olduğu söylenebilir. Ulaştığımız bu bulguları kıyaslayabileceğimiz, *E. hirsutum* bitkisi veya yakın akraba türler ile paklitaksel kombinasyonunun antagonistik etkilerini gösteren benzer bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ancak, farklı zamanlarda gerçekleştirilen iki benzer çalışma, bizim çalışmamızda olduğu gibi *E. hirsutum* bitkisinin ilaç mekanizması üzerine etkileri ile ilgili bilgiler sunmaktadır. Bu çalışmalarda, *E. hirsutum* su ekstresinin, ilaç metabolizmasında görevli enzimlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki olası etkileri *in vivo* olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, enzimlerin ekspresyon seviyelerindeki azalmanın sonucu olarak, ilaç metabolizmasının baskılandığı ve ilaç toksisitesinin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Her iki çalışmada da araştırmacılar, geleneksel ve tamamlayıcı tedavi rutinlerinde *E. hirsutum* bitkisini kullanan kişileri, bu sonuçlar ile karşılaşma ihtimalleri konusunda uyarılmıştır (Karakurt ve ark. 2013, Celik ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda, *E. hirsutum* bitkisi, paklitaksel ile farklı bir mekanizma aracılığıyla sitotoksik aktivitelerin baskılanmasıyla sonuçlanan etkileşim göstermiş olabilir. Literatürde, prostat kanseri dâhil olmak üzere birçok kanser türünde, bitki ekstrelerinin paklitakselin etkinliğini sinerjik olarak arttırdığına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lee ve ark. 2013, Zhou ve ark. 2015, Dogan Sigva ve ark. 2019, Xie ve ark. 2019). Bunun aksine, bitki ve paklitaksel kombinasyonlarının antagonistik aktivite gösterdiğine dair çalışma sayısı çok nadirdir. Tai ve ark. (2006), *Oplopanax horridus* bitkisinden hazırlanan %70 etanol ekstresi ile paklitaksel veya kamptotesin ilaçlarının kombine etkilerini kanser hücre hatlarında (K562, HL60, MCF7 ve MDA-MB-468) araştırmıştır ve test edilen 19

kombinasyon grubundan 10 tanesinde antagonistik etki saptamıştır. Başka bir çalışmada, *Saposhnikovia divaricata* bitkisinin köklerinden hazırlanan %70 etanol ekstresinin paklitaksel veya kamptotesin ilaçlarıyla kombinasyonunun MDA-MB-468 hücrelerinde antagonistik etkiye yol açtığı gösterilmiştir (Tai ve Cheung 2007). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların, bizim bulgularımızla örtüştüğü görülmektedir. Bu bilgiler ışığında, *E. hirsutum* su ekstresinin güvenilirliğini ispatlamak ve etki mekanizmasını aydınlatabilmek için daha fazla ilaç-etkileşim deneylerinin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır (Vitalone ve Allkanjari 2018).

Sitotoksik aktiviteler değerlendirildikten sonra; çalışmanın bir sonraki kısmında, 24, 48 ve 72 saat boyunca E kodlu ekstre, E2 kodlu fraksiyon, unotein B, paklitaksel ve kombinasyon tedavisine maruz bırakılan DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki apoptoz miktarları, kaspazla kırılmış CK 18 fragmentlerinin (M30) seviyelerine göre belirlenmiştir. 24 saatlik tedavi sonrası, hiçbir test bileşiğinin DU 145 ve PC-3 hücrelerinin M30 antijen düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmadığı görülmüştür. Test bileşikleriyle 48 saatlik tedavi sonrası, iki hücre hattının M30 antijen seviyelerinde kısmi artışlar görülse de bu değişimlerin önemli kabul edilebilecek bir seviyede olmadığı gözlenmiştir. 24 ve 48 saatlik tedavilerde, M30 antijen seviyelerinde gözle görülür farklılıklar gözlenmemesinin sebebi, test bileşiklerinin bu süre boyunca DU 145 ve PC-3 hücreleri karşısında, 72. saate nazaran daha zayıf sitotoksik aktivite göstermesi olarak açıklanabilir. Hücre canlılık testleri ile en güçlü sitotoksik aktivitelerin 72. saatte tespit edilmesi, bu bulguları doğrulamakta olup 72 saatlik tedavi sonuçlarının daha değerli bilgiler vereceği düşünülmüştür. 72 saatlik sonuçlar incelendiğinde; E kodlu ekstre, hem DU 145 hem de PC-3 hücrelerinin M30 antijen seviyelerinde dikkate değer artışlara yol açtığı görülmüştür. M30 ELISA testi, erken dönemdeki apoptotik etkinliklerin tespitine olanak sağlayan güvenilir bir testtir (McPartland ve ark. 2005). Bu sonuç, E kodlu ekstre, hem DU 145 ve PC-3 hücrelerinde ölüm şekli olarak erken apoptozu indüklediğini göstermektedir. Bu sonuçları karşılaştırabilmek adına yapılan literatür taramasında, *E. hirsutum* bitkisinin veya yakın türlerin, kanser hücrelerinin M30 antijen seviyelerindeki etkisini araştıran herhangi bir kaynağa ulaşılamamıştır. *E. hirsutum* su ekstresi (20, 50 ve 70 µg/ml) ile 72 saat boyunca tedaviye bırakılan LNCaP hücrelerinin kaspaz-3 aktivitesinin ELISA kiti kullanılarak ölçüldüğü bir araştırmada,

kaspaz-3 aktivitesinde doza bağılı olarak önemli artışlar tespit edilmiştir (Stolarczyk ve ark. 2013a). Erken apoptotik hücrelerde; CK18, kaspaz-9 tarafından kırılarak kaspazla kırılmış sitokeratin 18 olarak adlandırılan M30 antijeni oluşmaktadır ve bu apoptoz süreci kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitesi ile sürdürülmektedir (Schutte ve ark. 2004). Bu bilgi göz önüne alındığında, Stolarczyk ve ark. (2013a)'nın çalışması, bizim çalışma sonuçlarımızı büyük ölçüde desteklemektedir. Kombinasyon grubu için elde edilen sonuçlar incelendiğinde; M30 antijen seviyelerinde negatif kontrole kıyasla kısmi artış belirlenmesine karşın, ekstre ve/veya paklitaksele göre M30 antijen seviyelerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuç, sitotoksikite çalışmalarında ve morfolojik analizde ulaşılan bulgular ile uyum göstermektedir. 72 saatlik tedavi periyodunda; E2 kodlu fraksiyonun ve paklitakselin DU 145 ve PC-3 hücrelerinde M30 antijen seviyelerini az da olsa arttırdığı gözlenirken, unotein B'nin iki hücre hattının M30 antijen seviyelerinde değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar; sözü edilen test bileşikleriyle tedavi sonrası, kültürde erken apoptotik hücrelerin bulunmadığını veya az miktarda bulunduğunu ya da bu bileşiklerin sergiledikleri sitotoksik etkilerin, farklı bir ölüm şeklinden kaynaklandığını düşündürmüştür. Bu bulgudan hareketle; test bileşiklerine maruz kalmış DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki ölüm modları, ikili floresan boyama (Hoechst 33342 ve propidyum iyodür) yöntemiyle nükleus morfolojileri de dikkate alınarak daha detaylı olarak incelenmiştir.

DU 145 ve PC-3 hücrelerinin test bileşikleriyle 48 saatlik tedavisi sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde; E kodlu ekstre, E2 kodlu fraksiyon, unotein B, paklitaksel ve kombinasyon tedavisinin propidyum iyodür boyası için pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu sonuç; tüm test bileşiklerinin, hücrelerin membran bütünlüğünü bozarak primer nekroza (nekroz) veya geç apoptoza (sekonder nekroz) yol açtığını göstermektedir. Bu ayrımı yapabilmek için DU 145 ve PC-3 hücreleri, eş zamanlı olarak propidyum iyodür ve Hoechst 33342 ile boyanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; test bileşiklerinin uygulandığı her iki hücre hattında da, piknotik nükleus ve/veya nükleer kondenzasyon-fragmentasyon ile karakterize olan apoptoza özgü morfoloji saptanmıştır. E kodlu ekstre, hücrelerde neden olduğu sitotoksik etkinin geç apoptoz/sekonder nekroz olduğu gözlenmekle birlikte çok sayıda erken apoptotik hücrelerin varlığı da söz konusudur. Ekstrenin erken apoptoza neden olduğu,

daha önceden M30 antijen seviyelerindeki artışlardan tespit edilmiştir. Kombinasyon grubunda, propidyum iyodür ile boyanan hücre sayısının ekstreye ve/veya paklitaksele göre daha az olduğu, hatta propidyum iyodür için PC-3 hücrelerinden zayıf sinyal alındığı görülmüştür. Ayrıca her iki hücre hattında da erken apoptotik hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuç; kombinasyon uygulamasının, hücrelerin apoptoza veya nekroza gitmesini tamamen baskılamadığı ancak bu süreci ciddi ölçüde yavaşlattığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu veriler, hücre canlılık testi sonuçlarının ve mikroskop görüntülerinin doğruluklarını göstermektedir. Ayrıca, kombinasyon grubunda M30 antijen seviyelerinde gözlenen kısmi artışın da erken apoptotik hücrelerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen mikroskop görüntülerine göre; unotein B ile tedavi, çoğu hücrenin propidyum iyodür ile boyanmasına neden olmuştur ve erken dönem apoptotik hücre sayısı azdır. Bu veri, unotein B'nin DU 145 ve PC-3 hücrelerinde geç apoptoz/sekonder nekroze indüklediğini göstermektedir. Hücrelerin M30 antijen seviyelerinde bu bileşik için kayda değer bir değişim saptanmaması bu bulguyu kanıtlar niteliktedir.

Bu bulgular doğrultusunda, çalışmanın bir sonraki kısmında, test bileşikleriyle tedaviyi takiben DU 145 ve PC-3 hücrelerinde aktive olan hücre ölüm modunu (apoptoz, nekroz ve otofaji) belirleyebilmek amacıyla, hem kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi hem de western blot analizi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 3 temel hücre ölüm yolağında kilit rol üstlenen genlerin (*CASP8*, *CASP10*, *FADD*, *CASP3*, *CASP9*, *CYCS*, *PARP1*, *RIPK1*, *ATG5*, *BECN1*) ekspresyon profilleri mRNA düzeyinde analiz edilmiştir. Elde edilen gen ekspresyon sonuçlarına göre anlamlı değişim gösteren genlerin ekspresyon düzeylerinin western blot analiziyle protein seviyesinde belirlenmesi hedeflenmiştir. Western blot analizi sonuçları, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde hücre ölümü ile ilişkili genlerin protein ifadelerindeki değişimler hakkında daha detaylı bilgiler sunmuştur. Ulaşılan sonuçlar incelendiğinde; DU 145 hücrelerinde ekstre, paklitaksel ve kombinasyon uygulamaları sonucu, kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi ile mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık; Western blot analizi aracılığıyla, E kodlu ekstreinin, DU 145 hücrelerinde *CASP3*, *CASP9* ve *ATG5* protein seviyelerinde artışlara yol açtığı ve hem apoptozun intrinsik yolağını hem de otofajiyi aktive ettiği gösterilmiştir. Stolarczyk ve ark. (2013a), bizim verilerimizle uyumlu

olarak, *E. hirsutum* su ekstresinin, LNCaP hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasıyla ilişkili olarak apoptozun mitokondriyal (intrinsik) yolağını indüklediğini göstermiştir. Tez çalışması kapsamında; ekstrenin, intrinsik apoptoz yolağına ilave olarak otofajiyi de tetiklediği gözlenmiştir. Apoptoz ve otofaji farklı işleyiş mekanizmalarına sahip olmakla birlikte, bu iki ölüm şekli arasında karmaşık ve ilginç ilişkilerin bulunduğu ifade edilmiştir. Dahası, otofaji ve apoptozun birlikte aktive olarak hücre ölümüne neden oldukları bildirilmiştir (Gozuacik ve Kimchi 2004, Gozuacik ve ark. 2008). Çalışmamızda, DU 145 hücre hattında, paklitakselin *ATG5* protein düzeyinde artışa yol açması şaşırtıcı bir sonuçtur. Birkaç çalışmada, paklitakselin DU 145 ve PC-3 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kreis ve ark. 2001, Jiang ve ark. 2008). Bununla birlikte; yeni yapılan bir çalışmada, *ATG5* ekspresyonunun susturulduğu Ras-NIH 3T3 hücrelerinin *ATG5* eksprese edememesi sebebiyle paklitaksele direnç kazandığı bildirilmiştir (Eom ve ark. 2019). Bu çalışma, bulgularımızı destekleyerek paklitaksel tedavisinin *ATG5* gen ifadesindeki etkisini ortaya koymaktadır. Kombinasyon tedavisine bırakılan DU 145 hücrelerinde, *CASP8*, *CASP3*, *CASP9*, *CYCS* ve *ATG5* protein seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu veriler, kombinasyon tedavisi için elde edilen önceki çalışma sonuçlarımızı kanıtlamaktadır. E2 kodlu fraksiyonun, *CASP3* ifadesini protein düzeyinde, *CYCS* ifadesini ise mRNA seviyesinde arttırarak DU 145 hücrelerinde intrinsik apoptoz yolağını aktivite ettiği görülmüştür. Unotein B'nin ise, hem ekstrinsik apoptoz yolağıyla ilişkili *CASP8* ve *CASP10* genlerinin hem de intrinsik apoptoz yolağıyla ilişkili *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı artışlara neden olduğu kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi ile gözlenmiştir. Western Blot analizi ise, *CASP3* ve *CASP9*'a ek olarak *ATG5* protein seviyelerinde de anlamlı artışları ortaya çıkarmıştır. Unotein B tedavisi, E kodlu ekstrede olduğu gibi hem apoptozis hem de otofaji yollarını tetiklemiş olabilir. Ayrıca, unotein B'nin A549 hücrelerinde apoptozu neden olduğunu gösteren çalışma sonuçları bizim sonuçlarımızla büyük ölçüde örtüşmektedir (Pei ve ark. 2019).

PC-3 hücrelerinde, ekstre ile tedavi sonrası otofaji ile ilişkili *ATG5* gen ve protein ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Apoptozun engellendiği koşullarda, otofajinin programlı bir hücre ölüm mekanizması olarak görev yapabildiği ifade

edilmiştir ve bu durum, otofaji ile apoptoz arasındaki iletişimin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Gozuacik 2008). Çalışmamızda, ekstrenin apoptozu indüklediği farklı yöntemler aracılığıyla gösterilmiştir ve bu sonuçlar, ekspresyon sonuçları ile bir bütün olarak ele alındığında, böyle bir mekanizmanın söz konusu olabileceğini belirtmektedir. Paklitaksel tedavi sonrası DU 145 hücrelerinde gözlemlendiği gibi, PC-3 hücrelerinde de *ATG5* protein ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, çalışmada beklenilenin dışında bir sonuç olmakla birlikte, yeni yayınlanmış bir makalede *ATG5* ile paklitaksel arasında incelenen ilişki, bizim çalışmamız ile uyum göstermektedir (Eom ve ark. 2019). Kombinasyon tedavisine maruz bırakılan hücrelerde, *ATG5* protein ifadesi azalış gösterirken, *CASP8* proteininde artışı olduğu saptanmıştır. *CASP8* protein ifadesindeki artış, M30 antijen testi ve floresan boyama çalışmasında incelendiği üzere erken apoptotik hücrelerin varlığından kaynaklanıyor olabilir. E2 kodlu fraksiyonun, *ATG5* protein ifadesini arttırdığı ve DU 145 hücrelerinden farklı olarak PC-3 hücrelerinde otofaji indüklediği gözlemlenmiştir. PC-3 hücrelerinde, unotein B'nin hücre ölüm yolları ile ilgili genlerin ekspresyonlarında mRNA veya protein seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.

Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi ile western blot analizi sonuçları ve daha önceki çalışmalardan elde edilen bulgular bir bütün olarak değerlendirilecek olursa; çalışma kapsamında araştırılan ekstrenin, fraksiyonun, paklitakselin, unotein B'nin ve kombinasyon uygulamasının, farklı genlerin aktivasyon gösterdiği mekanizmalar sayesinde DU 145 ve PC-3 hücrelerinde sitotoksik/apoptotik etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Kombinasyon grubu dışındaki test bileşiklerinin, bu hücrelerde, otofajinin katkı sağladığı bir program aracılığıyla apoptoza yol açtığı söylenebilmektedir. Kombinasyon tedavisinin ise daha önceki bulgularla uyumlu olarak, iki hücre hattında erken apoptozu aktive ettiği, ancak bu dönemde apoptotik etkiyi durdurduğu veya apoptoz sürecini yavaşlattığı tahmin edilmektedir. Bu mekanizmanın daha kapsamlı bir şekilde aydınlatılmasına ve *E. hirsutum* bitkisi ile paklitaksel ilacı arasındaki etkileşimin toksisite açısından ortaya konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak; tez kapsamında araştırılan ve ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren *Epilobium hirsutum* L. (tüylü yakı otu) bitkisinin ve bitkinin dominant ellajitanen bileşiği olan unotein B'nin, androjen bağımsız insan prostat kanseri hücreleri (DU 145 ve PC-3) üzerindeki sitotoksik etkileri moleküler düzeyde ortaya konmuştur. Sitotoksik aktivitenin, otofajinin katkı sağladığı apoptoz süreciyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu doğrultuda, ulaştığımız sonuçlar otofaji ile apoptoz arasındaki etkileşimin varlığını desteklemektedir. İnvaziv karakterli DU 145 ve PC-3 hücreleri dikkate alındığında, tez çalışmasının literatüre değerli bilgiler sunacağı düşünülmektedir. Mevcut tez çalışması, halk tıbbında uzun süredir kullanılan etnobotanik öneme sahip tıbbi bitkinin tedavi edici etkilerinin bilimsel olarak kanıtlanmasına olanak sağlamıştır. Bununla birlikte; *E. hirsutum* ekstresi ve paklitaksel ile oluşturulan kombinasyon tedavisi, öngörülenin aksine, sitotoksik etkilerin baskılandığı antagonistik bir etkiyle sonuçlanmıştır. Söz konusu tez çalışması, *E. hirsutum* bitkisinin paklitaksel ile birlikte gösterdiği antagonistik etkiyi ortaya koyan ilk çalışma olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle; *E. hirsutum* bitkisinin, paklitaksel ve benzeri diğer kemoterapötik ilaçlar ile etkileşim mekanizması aydınlatılana dek bitkinin geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanımını konusunda tıbbi tavsiyelere uyulması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Söz konusu bitkinin sitotoksik/apoptotik etkilerinin, ilk kez DU 145 ve PC-3 androjen bağımsız prostat kanseri hücreleri üzerinde çalışılmasıyla literatür bilgisine katkıda bulunulduğu düşünülmektedir. Bu veriler ışığında; güçlü aktivite sergileyen test bileşiklerinin fitokimyasal bileşimlerinin aydınlatılması ve *in vivo* etkilerin değerlendirilmesi adına ileri analizlerin gerçekleştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abate-Shen, C., Shen, M.M. 2000.** Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.*, 14: 2410-2434.
- Abate-Shen, C., Shen, M.M. 2002.** Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.*, 18: S1-S5.
- Abo, K.A., Adeyemi, A.A. Adeite, D.A. 2000.** Ethnobotanical survey of plants used in the treatment of infertility and sexually transmitted diseases in southwest Nigeria. *Afr. J. Med. Med. Sci.*, 29: 325-327.
- Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F. 1998.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J. Ethnopharmacol*, 62: 183-193.
- Alimirah, F., Chen, J., Basrawala, Z., Xin, H., Choubey, D. 2006.** DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters*, 580(9): 2294-2300.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. 1988.** Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48(3): 589-601.
- Ang-Lee, M.K., Moss, J., Yuan, C.S. 2001.** Herbal medicines and perioperative care. *JAMA*, 286(2): 208-216.
- Anonim, 2005.** Trade in Medicinal Plants. FAO, Rome.
- Anonim, 2008.** Real-time PCR: from theory to practice. İnvitrogen, <http://corelabs.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Real%20Time%20PCR.From%20Theory%20to%20Practice.pdf>-(Erişim tarihi: 09 Mart 2018).
- Anonim, 2011.** The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges. World Health Organization (WHO), yayın no: 3, Geneva.
- Anonim, 2013.** Dünyada prostat kanseri. <http://www.prostatkanseridernegi.org/prostat-kanseri/dunyada-prostat-kanseri> (Erişim tarihi: 28.06.2020).
- Anonim, 2018.** LightCycler® 480 Probes Master. https://www.lifescience.roche.com/en_tr/products/lightcycler14301-480-probes-master.html#details-(Erişim tarihi: 10 Mart 2018).
- Anonim, 2019a.** World Fact Sheets, Source: Globocan 2018. World Health Organization, Lyon.

Anonim, 2019b. Population Fact Sheets, Turkey, Source: Globocan 2018. World Health Organization, Lyon.

Anonim, 2019c. Chemotherapy for Prostate Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating/chemotherapy.html>-(Erişim tarihi: 21.12.2019).

Anonim, 2020a. WHO outlines steps to save 7 million lives from cancer. World Health Organization, Lyon.

Anonim, 2020b. Onagraceae. TÜBİVES, http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=hizli_ara-(Erişim tarihi: 12.02.2020).

Aoki, K., Maruta, H., Uchiumi, F., Hatano, T., Yoshida, T., Tanuma, S.I. 1995. A macrocircular ellagitannin, oenothetin b, suppresses mouse mammary tumor gene expression via inhibition of Poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 210(2): 329–337.

Aslan, R., Karakuş, Z. 2019. Gelenekten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkiler. *Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi*, 6: 73.

Aslantürk, Ö.S. 2018. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages: Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Ed.: Larramendy, M.L., Soloneski, S., InTech, London, United Kingdom, pp: 1-17.

Averett, J.E., Kerr, B.J., Raven, P.H. 1978. The flavonoids of Onagraceae, tribe Epilobieae: *Epilobium* sect. *epilobium*. *American Journal of Botany*, 65, 567-570.

Averett, J.E., Raven, P.H., Becker, H. 1979. The flavonoids of Onagraceae: tribe Epilobieae. *American Journal of Botany*, 66, 1151-1155.

Averett, J.E., Raven, P.H., 1984. Flavonoids of Onagraceae. *Annales of the Missouri Botanical Garden*, 71, 30-34.

Barakat, H.H., Hussein, S.A.M., Marzouk, M.S., Merfort, I., Linscheid, M., Nawwar, M.A.M. 1997. Polyphenolic metabolites of *Epilobium hirsutum*. *Phytochemistry*, 46, 935-941.

Başer, K.H.C. 1995. Tıbbi Bitkiler. *Bilim ve Teknik*, 331: 76-79.

Battinelli, L., Tita, B., Evandri, M.G., Mazzanti, G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *II Farmaco*, 56: 345-348.

Baykara O. 2016. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3): 154-165.

Baytop, T. 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 520 s.

Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 480 s. (1984 basımına ilaveli 2. Baskı).

Bejenaru, L.E., Olah, N., Mogosanu, G.D., Bejenaru, C., Neamtu, J., Popescu, H. 2009. Researches upon the free amino acids serine and threonine in five *Epilobium* species (Onagraceae). *Farmacia*, 57, 485-491.

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4:14-19.

Bhatia, H., Sharma, Y.P., Manhas, R.K., Kumar, K. 2014. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2): 1005-1018.

Brower, V. 2008. Back to nature: extinction of medicinal plants threatens drug discovery. *J. Natl. Cancer Inst.*, 100: 838-839.

Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112(2): 195-203.

Catalona, W.J., Richie, J.P., Ahmann, F.R., Hudson, M.A., Scardino, P.T., Flanigan, R.C., DeKernion, J.B., Ratliff, T.L., Kavoussi, L.R., Dalkin, B.L., Waters, W.B., MacFarlane, M.T., Southwick, P.C. 1994. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of Urology*, 151 (5): 1283-90.

Celik, G., Semiz, A., Karakurt, S., Gencler-Ozkan, A.M., Arslan, S., Adali, O., Sen, A. 2016. Inhibitory action of *Epilobium hirsutum* extract and its constituent ellagic acid on drug-metabolizing enzymes. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 41(2): 109-116.

Chan, F.K., Shisler, J., Bixby, J.G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., Lenardo, M.J. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J. Biol. Chem.*, 278: 51613-51621.

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., Chan, F.K. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137: 1112-1123.

Clark, W.H. 1991. Tumour progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer*, 64: 631-644.

Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Lesher, J.L., Park, H.K., Sanders, B.B., Smith, C.L., Taylor, J.R. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. *Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA*, 276 (24): 1957-63.

Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T., Dinsdale, D. 1994. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J. Immunol.*, 153: 507-516.

Colstein, P., Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.*, 32: 37-43.

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 72-79.

Craig, L.C., Gregory, J.D., Hausmann, W. 1950. Versatile laboratory concentration device. *Anal. Chem.*, 22(11): 1462.

Cronquist, A. 1968. The evaluation and classification of flowering plants. Thomas Nelson & Sons Ltd., London, pp. 396.

Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites: Biochemistry and Molecular Biology of Plant, Ed.: Buchannan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1250–1318.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. 2006. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, Ed.: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., Blackwell Publishing Ltd, USA, 1-24.

Datta, B.K., Rahman, I. Das, T.K. 1998. Antifungal activity of Indian plant extracts. *Mycoses*, 41: 535-536.

Davis, P.H. 1972. Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol. 4. Edinburgh University Press, Edinburgh, 657 pp.

Demirci, F., Özek, G., Kırimer, N., İşcan, G., Kürkcüoğlu, M., Demirci, B., Altıntaş, A. 2010a. Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2100, Eskişehir, Türkiye, 209 s.

Demirci, F., Genç, L., Öztürk, N., Öztürk, Y., Demirci, B., Yazan, Y. 2010b. Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları ve etiği. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2098, Eskişehir, Türkiye, 345 s.

Deng, L., Zong, W., Tao, X., Liu, S., Feng, Z., Lin, Y., Liao, Z., Chen, M. 2019. Evaluation of the therapeutic effect against benign prostatic hyperplasia and the active constituents from *Epilobium angustifolium* L. *J. Ethnopharmacol.*, 232: 1-10.

Dewick, P.M. 2002. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd edition. JohnWiley and Sons, Chichester, 507 pp.

Dogan Sigva, Balci Okcanoğlu, T., Avci, C.B., Yilmaz Süslüer, S., Kayabasi, C., Turna, B., Dodurga, Y., Nazli, O., Gündüz, C. 2019. Investigation of the synergistic effects of paclitaxel and herbal substances and endemic plant extracts on cell cycle and apoptosis signal pathways in prostate cancer cell lines. *Gene.*, 687: 261-271.

Doyle, A., Griffiths, J.B., Newell, D.G. 1995. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, England, 352 pp.

Ducrey, B., Wolfender, J.L., Marston, A., Hostettmann, K. 1995. Analysis of flavonol glycosides of 13 *Epilobium* species (Onagraceae) by LC-UV and thermo spray LC-MS. *Phytochemistry*, 38, 129-137.

Ducrey, B., Marston, A., Gohring, S., Hartmann, R.W., Hostettmann, K. 1997. Inhibition of 5 alpha-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothain A and oenothain B from *Epilobium* species. *Planta Medica*, 63,111-114.

Efferth, T., Miyachi, H., Drexler, H.G., Gebhart, E. 2002. Methylthioadenosine phosphorylase as target for chemoselective treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemic cells. *Blood cells, molecules and diseases*, 28: 47-56.

Efferth, T., Saeed, M.E.M., Mirghani, E., Alim, A., Yassin, Z., Saeed, E., Khalid, H.E., Daak, S. 2017. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*, 8(30): 50284-50304.

Eid, S.Y., El-Readi, M.Z., Fatani, S.H., Eldin, E.E.M.N., Wink, M. 2015. Natural Products Modulate the Multifactorial Multidrug Resistance of Cancer. *Pharmacology & Pharmacy*, 6: 146-176.

Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.*, 16: 966-975.

Engel, T., Henshall, D.C. 2009. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *IJPPP*, 1: 97-115.

Eom, S.Y., Hwang 1, S-H., Yeom, H., Lee, M. 2019. An ATG5 knockout promotes paclitaxel resistance in v-Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 513(1): 234-241.

- Eum, K.H., Lee, M. 2011.** Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-rastransformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.*, 348: 61-68.
- Everest, A., Öztürk, E. 2005.** Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 1: 6.
- Faydaloğlu, E., Sürücüoğlu, M.S. 2013.** Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyel, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanım Olanakları. *EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2): 233-265.
- Ford, V.S., Gottlieb, L.D. 2007.** Tribal relationships within Onagraceae inferred from PgiC sequences. *Systematic Botany*, 32, 348-356.
- Fraenkel, G.S. 1959.** The Raison d'Être of Secondary Plant Substances These Odd Chemicals Arose as a Means of Protecting Plants from Insects and Now Guide Insects to Food. *Science*, 129(3361): 1466-1470.
- Galluzzi, L., Kroemer, G. 2008.** Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135: 1161-1163.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005.** Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Cancer J. Clin.*, 55: 178-194.
- Gilligan, T., Kantoff, P.W. 2002.** Chemotherapy for prostate cancer. *Urology*, 60: 94-100.
- Gozuacik, D., Kimchi, A. 2004.** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16): 2891-2906.
- Gozuacik, D., Bialik, S., Raveh, T., Mitou, G., Shohat, G., Sabanay, H., Mizushima, N., Yoshimori, T., Kimchi, A. 2008.** DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ.*, 15(12): 1875-1886.
- Göktaş, Ö., Gıdık, B. 2019.** Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1): 136-142.
- Granica, S., Bazylo, A., Kiss, A.K. 2012.** Determination of macrocyclic ellagitannin oenothetin B in plant materials by HPLC-DAD-MS: method development and validation. *Phytochem. Anal.*, 23(6):582-587.
- Granica, S., Piwowarski J.P., Czerwińska, M.E., Kiss, A.K. 2014.** Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): a review. *J. Ethnopharmacol.*, 156:316-46.
- Gruenwald, J. 1998.** The emerging role of herbal medicine in health care in Europe. *Drug Inf. J.*, 32, 151-153.

Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. 2000. PDR for Herbal. Medical Economics Company, New Jersey, USA, 858 pp.

Gueritte, F., Fahy, J. 2005. The vinca alkaloids (Chapter 7): Anticancer Agents from Natural Products, Ed.: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp: 123-136.

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, 1290 s.

Hacıbekiroğlu, İ., Kodaz, H., Türkmen, E. 2015. İleri evre prostat kanserinde hormon tedavisi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30(1): 25-33.

Haddock, E.A., Gupta, R.K., Al-Shafi, S.M.K., Haslam, E. 1982. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants. Part1. Introduction. Naturally occurring galloyl esters. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2515-2524.

Halberstein, R.A. 2005. Medicinal plants: historical and crosscultural usage patterns. *Ann. Epidemiol.*, 15(9): 686-699.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57–70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., Mizushima, N. 2008. FIP200, a uLK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 181: 497-510.

Hassa, P.O. 2009. The molecular “Jekyll and Hyde” duality of PARP1 in cell death and cell survival. *Front. Biosci.*, 14: 72-111.

Hausknecht C. 1884. Monographie der gattung *Epilobium*. Jena, Germany.

Hawkins, S.F., Guest, P.C. 2017. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol. Biol.*, 1546:125-133.

He, C., Klionsky, D.J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.*, 43: 67-93.

He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 137: 1100-1111.

Hevesi Toth, B., Balazs, A., Vukics, V., Szoke, E., Kery, A. 2006. Identification of *Epilobium* species and willow-herbs (Onagraceae) by HPLC analysis of flavonoids as chemotaxonomic markers. *Chromatographia*, 63,S119-S123.

Hevesi Toth, B., Blazics, B., Kery, A. 2009. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 26-31.

Hiermann, A. 1983. The investigation of active compounds from *Epilobium* species; 1. Communication: the flavonoid patterns. *Scientia Pharmaceutica*, 51, 158-167.

Hiermann, A., Juan, H., Sametz, W. 1986. Influence of *Epilobium* extracts on prostaglandin biosynthesis and carrageenin induced oedema of the rat paw. *J. Ethnopharmacol.*, 17: 161-169.

Hiermann, A. 1995. Phytochemical characterization of *Epilobium angustifolium* L. and its differentiation to other *Epilobium* species by TLC and HPLC. *Scientia Pharmaceutica*, 63,135-144.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(16): 7276-7280.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.*, 1: 489-495.

Hook, D.J., Pack, E.J., Yacobucci, J.J., GUSS, J. 1997. Approaches to automating the dereplication of bioactive natural products. The key step in high throughput screening of bioactive materials from natural sources. *J. Biomol. Screening*, 2: 145-152.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.L., Oshiro, N., Mizushima, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell*, 20(7): 1981-1991.

Hostettmann, K. 1995. Flavonoids and bioflavonoids 1995: proceedings of the International Bioflavonoid Symposium. 9th Hungarian Bioflavonoid Symposium, 16-19 July 1995, Vienna, Austria.

Howard, G.Z., Mabry, T.J. 1972. Distribution of flavonoids in twenty-one species of *Oenothera*. *Phytochemistry*, 11, 289-291.

Itokawa, H., Wang, X., Lee, K.-H. 2005. Homoharringtonine and related compounds (Chapter 4): Anticancer Agents from Natural Products, Ed.: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp: 47-70.

Ivancheva, S., Manolova, N., Serkedjieva, J., Dimov, V., Ivanovska, N. 1992. Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. *Basic Life Sciences*, 59: 717-728.

İli, P. 2003. Bazı Tıbbi Bitkilerin Kimyasal İçerikleri ve Hayvanlara Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*. PAÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.

Jain, A.K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., Pandey, A.K. 2017. Models and Methods for In Vitro Toxicity: In Vitro Toxicology 1st Edition, Ed.: Dhawan, A., Kwon, S., Academic Press, London, United Kingdom, pp: 45-65.

Jamous, R.M., Abu Zaitoun, S.Y., Husein, A.I., Qasem, I.B.Y., Ali-Shtayeh, M.S. 2015. Screening for biological activities of medicinal plants used in traditional Arabic palestinian herbal medicine. *European Journal of Medicinal Plants*, 9(1): 1-13.

Jamous, R.M., Ali-Shtayeh, M.S., Abu-Zaitoun, S.Y., Markovics, A., Azaizeh, H. 2017. Effects of selected Palestinian plants on the *in vitro* exsheathment of the third stage larvae of gastrointestinal nematodes. *BMC Veterinary Research*, 13(1): 308.

Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoe, H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 7(1): 1-7.

Jennings, T.A. 1999. Lyophilization: Introduction and Basic Principles. Informa Healthcare USA, Inc., New York, USA, 664 pp.

Jensen, E.C. 2012. The basics of western blotting. *Anat. Rec. (Hoboken)*, 295(3): 369-371.

Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., Wilson, L. 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9552-9556.

Jordan, M.A., Wilson, L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 123-130.

Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandenabeele, P., Samson, M., Dimanche-Boitrel, M.T. 2012. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.*, 19: 2003-2014.

Joy, P.P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, B.P. 2001. Medicinal plants: Tropical Horticulture Vol 2, Editörler: Bose, T.K., Kabir, J., Joy, P.P., Naya Prakash, India, pp: 449-632.

Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R., He, Xin 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 377-392.

Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.*, 17(1): 16-23.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., Ohsumi, Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.*, 150: 1507-1513.

Karadağ, A. 2016. Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15(2): 19-26.

Karakurt, S., Semiz, A., Celik, G., Gencler-Ozkan, A.M., Sen, A., Adali, O. 2013. *Epilobium hirsutum* alters xenobiotic metabolizing CYP1A1, CYP2E1, NQO1 and GPx activities, mRNA and protein levels in rats. *Pharmaceutical Biology*, 51(5): 650-658.

Karakurt, S., Semiz, A., Celik, G., Gencler-Ozkan, A.M., Sen, A., Adali, O. 2016. Contribution of ellagic acid on the antioxidant potential of medicinal plant *Epilobium hirsutum*. *Nutrition and Cancer*, 68(1): 173-183.

Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., Van, A.J., Winograd, B., Pinedo, H.M. 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer.*, 27: 897-900.

Kelly, K. 2009. The History of medicine. Early Civilizations of Medicine The History Prehistoric Times to 500 C.E. Facts on file, New York, USA, 174 pp.

Kendir, G., Güvenç, A. 2010. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 30(1): 49-80.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.

Kırimer, N., Demirci, B., Özek, T. 2010. Tıbbi ve aromatik bitkisel ürünlerin üretimi ve kalite kontrolü. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2109, Eskişehir, Türkiye, 149 s.

Kim, Y.S., Morgan, M.J., Choksi, S., Liu, Z.G. 2007. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol. Cell*, 26: 675-687.

- Kingston, D.G.I. 2005.** Taxol and its analogs (Chapter 6): Anticancer Agents from Natural Products, Ed.: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp: 89-122.
- Kiss, A., Kowalski, J., Melzig, M.F. 2004.** Compounds from *Epilobium angustifolium* inhibit the specific metallopeptidases ACE, NEP and APN. *Planta Medica*, 70, 919-923.
- Kiss, A., Kowalski, J., Melzig, M.F. 2006a.** Effect of *Epilobium angustifolium* L. extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidase activity in selected cell lines. *Pharmazie*, 61(1): 66-69.
- Kiss, A., Kowalski, J., Melzig, M.F., 2006b.** Induction of neutral endopeptidase activity in PC-3 cells by an aqueous extract of *Epilobium angustifolium* L. and oenothlein B. *Phytomedicine*, 13: 284-289.
- Kiss, A.K., Bazylko, A., Filipek, A., Granica, S., Jaszewska, E., Kiarszys, U., Kośmider, A., Piwowarski, J. 2011.** OenothleinB's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine*, 18(7): 557-560.
- Klionsky, D.J., Lane, J.D. 2010.** Alternative macroautophagy. *Autophagy*, 6(2): 201-201.
- Kösa, S., Güral, S.M. 2019.** Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve Peyzajda Kullanımları. *Peyzaj-Eğitim, Bilim, Kültür ve Sanat Dergisi*, 1(2019): 41-54.
- Kral, M., Rosinska, V., Student, V., Grepl, M., Hrabec, M., Bouchal, J. 2011.** Genetic Determinants of Prostate Cancer: A Review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 155(1): 3-10.
- Kramer, G., Erdal, H., Mertens, H.J., Nap, M., Mauermann, J., Steiner, G., Marberger, M., Bivén, K., Shoshan, M.C., Linder, S. 2004.** Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res.*, 64(5): 1751-1756.
- Kreis, W., Budman, D.R., Calabro, A. 2001.** A reexamination of PSC 833 (Valspodar) as a cytotoxic agent and in combination with anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 47(1): 78-82.
- Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. 2010.** Autophagy And Integrated Stress Response. *Mol. Cell*, 40(2): 280-293.
- Kunduhoglu, B., Pilatin, S., Caliskan, F. 2011.** Antimicrobial screening of some medicinal plants collected from Eskisehir, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(4): 945-952.
- Kurien, B.T., Scofield, R.H. 2006.** Western blotting. *Methods*, 38(4): 283-293.

Lampronti, I., Saab, A.M., Gambari, R. 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *International Journal of Oncology*, 29: 989-995.

Laubenbacher, R., Hower, V., Jarrah, A., Torti, S.V., Shulaev, V., Mendes, P. Torti, F.M., Akman, S. 2009. A systems biology view of cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1796(2): 129-139.

Lee, K.-H., Xiao, Z. 2005. Podophyllotoxins and analogs (Chapter 5): Anticancer Agents from Natural Products, Ed.: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp: 71-88.

Lee, S-T., Wong, P-F., Hooper, J.D., Mustafa, M.R. 2013. Alpha-tomatine synergises with paclitaxel to enhance apoptosis of androgen-independent human prostate cancer PC-3 cells *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*, 20(14): 1297-1305.

Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.*, 187(5): 567-572.

Lesuisse, D., Berjonneau, J., Ciot, C., Devaux, P., Doucet, B., Gourvest, J.F., Khemis, B., Lang, C., Legrand, R., Lowinski, M., Maquin, P., Parent, A., Schoot, B., Teutsch, G., Chodounska, H., Kasal, A. 1996. Determination of oenothien B as the active 5-alpha-reductase-inhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. *Journal of Natural Products*, 59, 490-492.

Levine, B., Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6: 463-477.

Li, P.C., Lam, E., Roos, W.P., Zdzienicka, M.Z., Kaina, B., Efferth, T. 2008. Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer research*, 68: 4347-4351.

Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27: 6194-6206.

Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., Laurell, C.B. 1987. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J. Clin. Invest.*, 80(2): 281-285.

Liu, B., Cheng, Y., Liu, Q., Bao, J.K., Yang, J.M. 2010. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol. Sin.*, 31: 1154-1164.

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, 4(6): 357-362.

Llambi, F., Green, D.R. 2011. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21: 12-20.

Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z.Q., Schulze-Osthoff, K. 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell*, 13: 978-988.

Lovkova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M., Kliment'eva, N. I. 2001. Chemical features of medicinal plants (Review). *Applied biochemistry and microbiology*, 37(3): 229-237.

Majeski, A.E, Dice, J.F. 2004. Mechanisms of Chaperone-Mediated Autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12): 2435-2444.

Majno, G., Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15.

Martin, S.J., Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82: 349-352.

Maruta, H., Okita, N., Takasawa, R., Uchiumi, F., Hatano, T., Tanuma, S. 2007. The involvement of ATP produced via (ADP-Ribose)n in the maintenance of DNA replication apparatus during DNA repair. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(3): 447-450.

Mathen, C., Hardikar, B.P. 2010. A Method for Photomicrography of Cytotoxicity in 96-Well Plates. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(4): 232-238.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., White, E. 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7: 961-967.

McCormick, F. 1999. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*, 12: 53-56.

McGee, R.S., Herr, J.C. 1988. Human seminal vesicle-specific antigen is a substrate for prostate-specific antigen (or P-30). *Biol. Reprod.*, 39: 499-510.

McNeal, J.E. 1981. Zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2: 35-49.

McPartland, J.L., Guzail, M.A., Kendall, C.H., Pringle, J.H. 2005. Apoptosis in chronic viral hepatitis parallels histological activity: an immunohistochemical investigation using anti-activated caspase-3 and M30 cytodetachment antibody. *Int. J. Exp. Pathol.*, 86(1): 19-24.

Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P. 2010. Overview of Macroautophagy Regulation in Mammalian Cells. *Cell Research*, 20: 748-762.

Miyamoto, K., Kishi, N., Koshiura, R. 1987. Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins. *Chem. Pharm. Bull.*, 35(2): 814-822.

Miyamoto, K., Koshiura, R., Hatano, T., Yoshida, T., Okuda, T. 1992. Structures and activities of tannins in crude drugs (5) host-mediated antitumor activity. *Journal of Pharmacobiodynamics*, 15: S6.

Miyamoto, K., Nomura, M., Murayama, T., Furukawa, T., Hatano, T., Yoshida, T., Koshiura, R., Okuda, T. 1993a. Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 16(4): 379-387.

Miyamoto, K., Nomura, M., Sasakura, M., Matsui, E., Koshiura, R., Murayama, T., Furukawa, T., Hatano, T., Yoshida, T., Okuda, T. 1993b. Antitumor activity of oenothetin B, a unique macrocyclic ellagitannin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84(1): 99-103.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. 2008. Autophagy Fights Disease Through Cellular Self-Digestion. *Nature*, 451: 1069-1075.

Monaghan, R.L., Tkacz, J.S. 1990. Bioactive microbial products: Focus upon mechanism of action. *Annual Review of Microbiology*, 44: 271-301.

Montague, J.W., Cidlowski, J.A. 1996. Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia*, 52: 957-962.

Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J., Susin, S.A. 2007. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 4844-4862.

Nathan, C., Ding, A. 2011. Nonresolving inflammation. *Cell*, 140: 871-882.

Nawwar, M.A.M., Marzouk, M.S., Nigge, W., Linscheid, M. 1997. High-performance liquid chromatographic electrospray ionization mass spectrometric screening for polyphenolic compounds of *Epilobium hirsutum* - the structure of the unique ellagitannin epilobamide A. *Journal of Mass Spectrometry*, 32: 645-654.

Neidler, S. 2017. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>-(Erişim tarihi: 10 Mart 2018).

Newman, D.J., Cragg, G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75: 311-335.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1833(12) :3448-3459.

Nishida, K., Yamaguchi, O., Otsu, K. 2008. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ. Res.*, 103: 343-351.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. and Capaccioli, S. 2009. Natural Compounds for Cancer Treatment and Prevention. *Pharmacological Research*, 59: 365-378.

Oberhammer, F.A., Hochegger, K., Fröschl, G., Tiefenbacher, R., Pavelka, M. 1994. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J. Cell Biol.*, 126(4): 827-837.

Ohsumi, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2: 211-216.

Okada, T., Afendi, F. M., Altaf-Ul-Amin, M., Takahashi, H., Nakamura, K., Kanaya S. 2010. Metabolomics of Medicinal Plants: the Importance of Multivariate Analysis of Analytical Chemistry Data. *Current Computer-Aided Drug Design*, 6(3): 179-196.

Okuyama, S., Makihata, N., Yoshimura, M., Amakura, Y., Yoshida, T., Nakajima, M., Furukawa, Y. 2013. Oenothien B Suppresses Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in the Mouse Brain. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 9767-9778.

Otsuka, H. 2006. Purification by Solvent Extraction Using Partition Coefficient: Natural Products Isolation, 2nd Edition (Methods in Biotechnology, Vol. 20), Ed.: Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I., Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp: 269-273.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B., Bao, J.K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.*, 45: 487-498.

Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., Shah, A. 2009. *In-vitro* cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 1: 38-46.

Patel, R.M., Patel, S.K. 2011. Cytotoxic activity of methanolic extract of *Artocarpus heterophyllus* against A549, Hela and MCF-7 cell lines. *J. App. Pharm. Sci.*, 1: 167-171.

Papazisis, K.T., Geromichalos, G.D., Dimitriadis, K.A., Kortsaris, A.H. 1997. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J. Immunol. Methods.*, 208 (2): 151-158.

Papsidero, L.D., Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. 1980. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res.*, 40(7): 2428-2432.

Pei, X., Xiao, J., Wei, G., Zhang, Y., Lin, F., Xiong, Z., Lu, L., Wang, X., Pang, G., Jiang, Y., Jiang, L. 2019. Oenothain B inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation by ROS-mediated PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Chem. Biol. Interact.*, 298: 112-120.

Pirvu, L., Nicorescu, V., Hlevca, C., Udeanu, D.I., Nicorescu, I. 2015. Antimicrobial and synergistic activity of some whole and selective *Epilobium hirsutum* L. (great willowherb) extracts tested on standard and wild staphylococcus *Aureus* strains. *Farmácia*, 63(5): 690-695.

Pirvu, L., Nicorescu, I., Hlevca, C., Albu, B., Nicorescu, V. 2016. *Epilobi hirsuti* herba extracts influence the *in vitro* activity of common antibiotics on standard bacteria. *Open Chemistry*, 14: 65-75.

Piowowski, J.P., Bobrowska-Korczak, B., Stanislawski, I., Bielecki, W., Wrzesien, R., Granica, S., Krupa, K., Kiss, A.K. 2017. Evaluation of the Effect of *Epilobium angustifolium* Aqueous Extract on LNCaP Cell Proliferation in *In Vitro* and *In Vivo* Models. *Planta Med.*, 83(14-15): 1159-1168.

Pogrel, M.A., Pham, H:D, Guntenhoner, M., Stern, R. 1993. Profile of hyaluronidase activity distinguishes carbon dioxide laser from scalpel wound healing. *Ann. Surg.*, 217, 196-200.

Pourmorad, F., Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M., Yasini, S. 2007. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Epilobium hirsutum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(16): 2764-2767.

Qiu, J. 2007. Traditional medicine: a culture in the balance. *Nature*, 448(7150): 126-128.

Rahier, N.J., Thomas, C.J., Hecht, S.M. 2005. Camptothecin and its analogs (Chapter 2): Anticancer Agents from Natural Products, Ed.: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp: 5-22.

Ramstead, A.G., Schepetkin, I.A., Quinn, M.T., Jutila, M.A. 2012. Oenothain B, a cyclic dimeric ellagitannin isolated from *Epilobium angustifolium*, enhances IFN γ production by lymphocytes. *PLoSOne*, 7, e50546.

Raven, P.H. 1962. The Genus *Epilobium* in Turkey. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*, 24: 183-203.

Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 405-413.

Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M. 2013. Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 15: 25-38.

- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J. 2015.** Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol.*, 1275:31-56.
- Roman, M.I., Rusu, M.A., Puică, C., Borşa, M. 2010.** Cytotoxic effects of three species of *Epilobium* (Onagraceae) herbal extracts in rats. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii*, 20(1): 19-23.
- Rosadas, C., Cabral-Castro, M.J., Vicente, A.C., Peralta, J.M., Puccioni-Sohler, M. 2013.** Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol. Methods*, 193(2): 536-541.
- Rowinsky, E.K. 1997.** The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.*, 48: 353-74.
- Roy, P.S., Saikia, B.J. 2016.** Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J. Cancer*, 53(3): 441-442.
- Sadıkoğlu, N. 1998.** Cumhuriyet Dönemi Türk Etnobotanik Araştırmalar Arşivi. *Yüksek Lisans Tezi*, İÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sakagami, H., Jiang, Y., Kusama, K., Atsumi, T., Ueha, T., Toguchi, M., Iwakura, I., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. 2000.** Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines - A possible mechanism. *Phytomedicine*, 7(1): 39-47.
- Samuni-Blank, M., Izhaki, I., Dearing M. D., Gerchman, Y., Trabelcy, B., Lotan, A., Karasov, W. H., and Arad, Z. 2012.** Intraspecific Directed Deterrence by the Mustard Oil Bomb in a Desert Plant. *Current Biology*, 22(13): 1218-1220.
- Saraste, A., Pulkki, K. 2000.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.*, 45: 528-537.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. 2006.** Natural Products Isolation, 2nd Edition (Methods in Biotechnology, Vol. 20). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 515 pp.
- Sayers, T.J. 2011.** Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 60: 1173-1180.
- Scheller, C., Knoferle, J., Ullrich, A., Pröttengeier, J., Racek, T., Sopper, S., Jassoy, C., Rethwilm, A., Koutsilieris, E. 2006.** Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus. *J. Cell. Biochem.*, 97: 1350-1361.
- Schepetkin, I.A., Kirpotina, L.N., Jakiw, L., Khlebnikov, A.I., Blaskovich, C.L., Jutila, M.A., Quinn, M.T. 2009.** Immunomodulatory activity of oenothienin B isolated from *Epilobium angustifolium*. *Journal of Immunology*, 183, 6754-6766.

Schiff, P.B., Horwitz, S.B. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1561-1565.

Schippmann, U.W.E., Leaman, D., Cunningham, A.B., 2006. A Comparison of Cultivation and Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants under Sustainability Aspects, *Frontis*, 17, 75-95.

Schulz, W.A., Burchardt, M., Cronauer, M.V. 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*, 9(8): 437-448.

Schutte, B., Henfling, M., Kölgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M.P., Nap, M., Björklund, V., Björklund, P., Björklund, B., Lane, E.B., Omary, M.B., Jörnvall, H., Ramaekers, F.C. 2004. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 297(1): 11-26.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48(17):4827-4833.

Seidel, V. 2006. Initial and Bulk Extraction: Natural Products Isolation, 2nd Edition (Methods in Biotechnology, Vol. 20), Ed.: Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I., Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp: 27-46.

Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., Andrews, D.W. 2011. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813: 508-520.

Sharma, R., Manhas, R.K., Magotra, R. 2012. Ethnoveterinary remedies of diseases among milk yielding animals in Kathua, Jammu and Kashmir, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1): 265-272.

Sheikh, N.A., Desai, T.R., Tirgar, P.R. 2017. Evaluation of iron chelating and antioxidant potential of *Epilobium hirsutum* for the management of iron overload disease. *Biomed Pharmacother.*, 89: 1353-1361.

Sherwood, E.R., Berg, L.A., Mitchell, N.J., McNeal, J.E., Kozlowski, J.M., Lee, C. 1990. Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J. Urol.*, 143(1): 167-171.

Shikov, A.N., Poltanov, E.A., Dorman, H.J.D., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P., Hiltunen, R. 2006. Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3617-3624.

Shintani, T., Klionsky, D.J. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306: 990-9955.

- Shougang, J., Zu, Y., Fu, Y., Zhang, Y. 2008.** Activation of the mitochondria-driven pathway of apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by a novel hydrophilic paclitaxel derivative, 7-xylosyl-10-deacetylpaclitaxel. *International Journal of Oncology*, 33: 103-111.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990.** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(13):1106-1112.
- Skulachev, V.P. 2006.** Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, 11: 473-485.
- Slacanin, I., Marston, A., Hostettmann, K., Delabays, N., Darbellay, C. 1991.** Isolation and determination of flavonol glycosides from *Epilobium* species. *Journal of Chromatography*, 557, 391-398.
- 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. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1): 76-85.
- Solecki, R. 1975.** Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in Northern Iraq. *Science*, 190(4217): 880-881.
- Stamp, N. 2003.** Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, 78(1): 23-55.
- Stolarczyk, M., Naruszewicz, M., Kiss, A.K. 2013a.** Extracts from *Epilobium* sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 1044-1054.
- Stolarczyk, M., Piwowarski, J.P., Granica, S., Stefańska, J., Naruszewicz, M., Kiss, A.K. 2013b.** Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium* ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion. *Phytother. Res.*, 27(12): 1842-1848.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F. 1978.** Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer.*, 21(3): 274-281.
- Strober, W. 2001.** Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.*, Appendix 3:Appendix 3B.
- Suffness, M. 1995.** Taxol® Science and Applications. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 436 pp.

Şarışen, Ö., Çalışkan, D. 2005. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat(!). *Sted*, 14(8):182-187.

Tai, J., Cheung, S., Cheah, S., Chan, E., Hasman, D. 2006. *In vitro* anti-proliferative and antioxidant studies on Devil's Club *Oplopanax horridus*. *J. Ethnopharmacol.*, 108(2): 228-235.

Tai, J., Cheung, S. 2007. Anti-proliferative and antioxidant activities of *Saposhnikovia divaricata*. *Oncol. Rep.*, 18(1): 227-234.

Temel, M., Tınmaz, B., Öztürk, M., Gündüz, O. 2018. Dünyada ve Türkiye’de Tıbbi-Aromatik Bitkilerin Üretimi ve Ticareti. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg.*, 21(Özel Sayı): 198-214.

Thrane, U. 2001. Development in the Taxonomy of Fusarium Species Based on Secondary Metabolites: In Fusarium: Paul E. Nelson memorial symposium, Ed.: Summerell, B.A., APS Press, Minnesota, 29-49.

Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G., Saso, L. 2001. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Farmacol.*, 56: 341-343.

Tokur, O., Aksoy, A. 2017. In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 6(1): 112-118.

Ullmann, M. 1978. Islamic Medicine. Edinburgh University Press, Edinburgh, 138 pp.

Ullman, E., Fan, Y., Stawowczyk, M., Chen, H.M., Yue, Z., Zong, W.X. 2008. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ.*, 15: 422-425.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf-(Erişim tarihi: 19 Nisan 2018).

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A.Y., Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 232-239.

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29(6): 468-480.

Vajrabhaya, L., Korsuwannawong, S. 2018. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(15): 1-6.

van Engeland, M., Kuijpers, H.J., Ramaekers, F.C., Reutelingsperger, C.P., Schutte, B. 1997. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 235(2): 421-430.

van der Kuip, H., Mürdter, T.E., Sonnenberg, M., McClellan, M., Gutzeit, S., Gerteis, A., Simon, W., Fritz, P., Aulitzky, W.E. 2006. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer*, 6: 86.

Velasco, L., Goffman, F.D. 1999. Tocopherol and fatty acid composition of twenty-five species of Onagraceae Juss. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129, 359-366.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P. 1998. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.*, 188: 919-930.

Vitali, F., Fonte, G., Saija, A., Tita, B. 2006. Inhibition of intestinal motility and secretion by extracts of *Epilobium* spp. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 342-348.

Vitalone, A., McCroll, J., Thome, D., Costa, L.G., Tita, B. 2003a. Characterization of the effect of *Epilobium* extracts on human cell proliferation. *Pharmacology*, 69: 79-87.

Vitalone, A., Guizzetti, M., Costa, L.G., Tita, B. 2003b. Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55(5): 683-690.

Vitalone, A., Allkanjari, O. 2018. *Epilobium* spp: Pharmacology and Phytochemistry. *Review Phytother. Res.*, 32(7): 1229-1240.

Voynova, E., Dimitrova, S., Naydenova, E., Karadjov, P. 1991. Inhibitory action of extracts of *Maclura aurantiaca* and *Epilobium hirsutum* on tumour models in mice. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*, 17(4): 50-52.

Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol.*, 17(2): 159-163.

Wang, C.C., Chen, L.G., Yang, L.L. 1999. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Cancer letters*, 140(1-2): 195-200.

Weaver, B.A. 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell.*, 25(18): 2677-2681.

White, E., DiPaola, R.S. 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 15: 5308-5316.

Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, Role and Biotechnology of Secondary Metabolites. *Annual Plant Reviews*, 2, 1-16.

Wink, M. 2003. Evolution of Secondary Metabolites from an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.

Wink, M. 2008. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and Its Evolution. *Natural Product Communications*, 3, 1205-1216.

Wu, W., Liu, P., Li, J. 2012. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82, 249-258.

Xie, Z., Klionsky, D.J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat. Cell Biol.*, 9: 1102-1109.

Xie, Z., Wei, Y., Xu, J., Lei, J., Yu, J. 2019. Alkaloids from *Piper nigrum* Synergistically Enhanced the Effect of Paclitaxel against Paclitaxel-Resistant Cervical Cancer Cells through the Downregulation of Mcl-1. *J. Agric. Food. Chem.*, 67(18): 5159-5168.

Xu, Y., Huang, S., Liu, Z.G., Han, J. 2006. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J. Biol. Chem.*, 281: 8788-8795.

Yencilek, F., Koca, O., Kuru, M. 2018. Diagnosis in Prostate Cancer. *Nucl. Med. Semin.*, 4: 163-173.

Zargari, A. 1992. Medicinal Plants. Tehran University Press, Tehran, 889 pp.

Zhang H. 2011. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. *Phytomedicine*, 18(10): 902-903.

Zhou, Y., Shen, J., Xia, L., Wang, Y. 2015. *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. essential oil and paclitaxel synergistically enhance the apoptosis of SKOV3 cells. *Mol. Med. Rep.*, 12(1): 1253-1257.

EK Bilimsel Araştırma İzininin Onaylanmasına İlişkin Yazı



T.C.
ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



Sayı : 72784983-488.04-35048
Konu: Araştırma İzinleri

10.02.2017

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
(Fen Edebiyat Fakültesi)
BURSA

İlgi : ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ'NİN 27.12.2016 tarihli ve 6849 sayılı yazısı

Üniversiteniz Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi MALYER tarafından yürütülecek olan "Epilobium hirsutum L. Ekstresinin Prostat Kanseri Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
 - Arazi çalışması öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma ile ilgili Orman ve Su İşleri Bakanlığının ilgili İl Şube Müdürlüklerine bilgi verilmesi, korunan alanlarda yapılacak çalışmalarda mihmandar bulundurulması
 - Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
 - Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
 - Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze ve ilgili Bölge Müdürlüklerine gönderilmesi,
- şartıyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgesi ekte gönderilmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Mustafa AKINCIOĞLU
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı

EKLER :

I- Bir Takım Araştırma İzni

DAĞITIM :

Gereği:
Uludağ Üniversitesi Rektörlüğüne

Bilgi:
II. Bölge Müdürlüğü

Güvenli Elektronik İmza
ANIL BEYAZ
Nedim BEYAZ
Bölge Personeli

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır.
Evrak doğrulama adresi: <http://ebys.ormansu.gov.tr/Dogrulama.aspx?d=fsL4>

Adres : Alparslan Türkeş Cad. No:71 Beştepe 06560 Yenimahalle -
ANKARA
Telefon : 03122075594
e-posta : ydagasan@cob.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : Yakup DAĞAŞAN Uzman
Fax :
Elektronik Ağ: www.ormansu.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buse VATANSEVER
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 07 Nisan 1990
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bursa Atatürk Lisesi, 2004-2007
Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 2007-2011
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 2012-2014

Çalıştığı Kurum(lar) : -

İletişim (e-posta) : busevtnsvr90@gmail.com

Akademik çalışmalar :

Ardicli, S., Samli, H., Dincel, D., Ekiz, B., Yalcintan, B., Vatansever, B., Balci, F. 2018. Relationship of the bovine *IGF1*, *TG*, *DGAT1* and *MYF5* genes to meat colour, tenderness and cooking loss. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(3): 1077-1087.

Ardicli, S., Samli, H., Vatansever, B., Soyudal, B., Dincel, D., Balci, F. 2019. Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein–Friesian Bulls. *Arch. Anim. Breed.*, 62(1): 9-32.

Samli, H., Samli, M., Vatansever, B., Ardicli, S., Aztopal, N., Dincel, D., Sahin, A., Balci, F. 2019. Paclitaxel resistance and the role of miRNAs in prostate cancer cell lines. *World J. Urol.*, 37(6): 1117-1126.

Samli, H., Samli, D.T., Ardicli, S., Samli, M., Vatansever, B. 2020. Evaluation of intercellular communication between normal human prostate epithelial cells and prostate cancer cell lines in co-culture model. *Journal of Cellular Biotechnology*, 6(1): 71-79.