TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE TRAİL VE RUTİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİLERİ

Ayşenur GÖK

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tevhide SEL

ANKARA
2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE TRAİL VE RUTİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİLERİ

Ayşenur GÖK

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tevhide SEL

ANKARA
2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Prostat Kanser Hücrelerinde TRAIL ve Rutinin Hücre Canlılığına Etkileri" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşenur GÖK

Tarih: 08.09.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Biyokimya Anabilim Dalında
Ayşenur Gök tarafından hazırlanan
"Prostat Kanser Hücrelerinde Trail ve Rutinin Hücre Canlılığına Etkileri" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:08.09.2017

İmza
Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Tevhide SEL
Ankara Üniversitesi
(Raportör)

İmza
Yrd. Doç. Dr. Güzin CAMKERTEN
Aksaray Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İç kapak

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Prostat Kanser Hücrelerinde TRAIL ve Rutinin Hücre Canlılığına Etkileri" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Biyokimya Anabilim Dalında
Ayşenur Gök tarafından hazırlanan
"Prostat Kanser Hücrelerinde TRAIL ve Rutinin Hücre Canlılığına Etkileri" adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan		ii
Kabul ve Onay		iii
İçindekiler		iv
Önsöz		vi
Simgeler ve Kısaltmalar		vii
Şekiller		x
Çizelgeler		xii
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Kanser Gelişimi	2
1.2.	Prostat Kanseri	4
1.2.1.	Epidemiyolojisi	4
1.2.2.	Risk Faktörleri	6
1.2.3.	Oluşumu ve türleri	6
1.2.4.	Prostat Spesifik Antijen	8
1.3.	Hormona Dirençli Prostat Kanseri Hücre Hatları (PC-3 ve DU-145)	9
1.4.	Flavonoidler	11
1.5.	Rutin	13
1.5.1.	Genel Yapısı	13
1.5.2.	Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	14
1.5.3.	Organizmadaki Etkileri	15
1.5.4.	Reprodüktif Sisteme Etkileri	16
1.5.5.	Antikanserojen Etkileri	17
1.6.	Apoptozla İlişkili Tümör Nekroz Faktör İndükleyici Ligand (TRAIL)	18
1.6.1.	Genel Yapısı	18
1.6.2.	Ölüm Reseptörleri ve TRAIL'in Etki Mekanizması	19
1.6.3.	Trail' in Fizyolojik Fonksiyonları	21
1.6.4.	Bir Terapötik Yöntem Olarak TRAIL	21
1.6.5.	Kanser Hücrelerinde TRAIL Direnci	22
1.6.6.	TRAIL'e Duyarlı Kanser Hücreleri için Stratejiler	24
1.7.	Amaç	24
2.	**GEREÇ ve YÖNTEM**	26
2.1.	Gereç	26
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
2.1.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler	27
2.1.3.	Kullanılan cihazlar	28
2.2.	Yöntem	29

2.2.1. Hücre kültürünün hazırlanması 29
2.2.1.1.Prostat kanser hücrelerinin çözülmesi ve kültürü 29
2.2.1.2.Hücrelerin pasajlanması 30
2.2.2. MTT hücre canlılık testi 31
2.2.3. Wound Healing testi 33
2.2.4. Trypan Blue Boyamasıyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi 35
2.2.5. İstatistik Analiz 35

3. BULGULAR 37
3.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları 37
3.1.1. Rutin ve Rutin ile TRAIL'in birlikte uygulamalarının PC-3 hücre canlılığı üzerine etkisi 37
3.1.2. Rutin ve Rutin ile TRAIL'in birlikte uygulamalarının DU-145 hücre canlılığı üzerine etkisi 39
3.2. LDH ve Glikoz Düzeyleri 42
3.3. Wound Healing testi sonuçları 44
3.4. Trypan Blue Boyamasıyla Belirlenen Hücre Canlılığı Oranları 49

4. TARTIŞMA 51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
ÖZET 56
SUMMARY 57
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ 71

ÖNSÖZ

Bilim ve teknolojik gelişmelerin son hızla ilerlediği bu günlerde hala aydınlatılmayı bekleyen bazı noktalar mevcuttur. Bunların içinde yer alan en önemli konulardan biri, yüksek ölüm oranına sahip kanser hastalığıdır. Dünya genelinde kanser alanında çok sayıda araştırmacı tarafından oldukça kapsamlı birçok çalışma yapılmasına rağmen halen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır.

Çalışmamızda prostat kanser tedavisi çalışmalarına yeni bir bakış açısı getirmek adına günlük hayatta sıkça rastladığımız dut, karabuğday, çay, portakal, greyfurt, limon, kızılcık ve elma gibi birçok sebze ve meyve bileşenleri içerisinde yer alan flavonoid ailesine ait rutin ile rutin ve TRAIL'in kombinasyonu çalışılmış, prostat kanser hücre hatlarına (PC-3 ve DU-145) etkisini araştırmak adına antiproliferatif aktiviteleri incelenmiştir.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgi birikimleriyle bana yardım eden ve her konuda desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının saygıdeğer öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Görkem KISMALI'ya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlileri ve doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma gönülden saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu mutlu günlere erişmemi sağlayan, eşsiz destekleriyle her zaman yanımda olan ve her zaman bana inanan canım aileme… Canım annem ve babam Hüsne GÖK ve Hüseyin Avni GÖK'e ve canım kardeşim Cüneyt GÖK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AR	Çekirdeksel andojen reseptör
ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
BID	Bcl-2 interacting domain
CD95/ Fas	Lenfositlerin hücre yüzey reseptörü
cm^2	Santimetrekare
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
CD40	B hücre yüzeyindeki molekül
CD3	T lenfositinde yardımcı ve sitotoksik antijen
CD95L	CD95 ligandı
DcR1	Tuzak Ölüm Reseptörü
DcR2	Tuzak Ölüm Reseptörü
dl	Desilitre
DR	Ölüm Reseptörü
DR4	Ölüm Reseptörü 4
DR5	Ölüm Reseptörü 5
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DU- 145	Prostat kanser hücre hattı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGCG	Epigallokateşin Gallat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbant assay
FasL	Fas ligandı
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram

H_2O_2	Hidrojen peroksit
hK	İnsan kallikrein
hK1	Pankreatik/ renal kallikrein
hK2	Glandüler kallikrein
HL- 60	İnsan lökemi hücreleri
IC50	Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu
IGF- 1	İnsülin benzeri büyüme faktörü- 1
IL- 6	İnterlökin-6
IU	İnternasyonel ünite
Kb	Kilobaz
KVH	Kardiyo vasküler hastalık
LAN- 5	Nöroblastom hücre hattı
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LNCaP	Hormona bağımlı prostat kanser hücre hattı
LPS	Lipaz
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	Metiltiazol difenil tetrazolyum
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NK/ Ly asites	Nemeth-Kellner Lymphoma
OD	Optik Dansite
OPG	Osteoprotegerin
OVCAR- 5	Ovaryum karsinom hücre hattı
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC- 3	Prostat kanser hücre hattı
PIN	Prostatik epitelyal neoplazi

PSA	Prostat spesifik antijen
RNA	Ribonükleik Asit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Revolutions per minute
ºC	Santigrat Derece
SDS	Sodyum Dodesil Sulfat
SW480	Fare kolon kanseri hücreleri
TMZ	Temozolomide
TNF	Tümor nekroz faktör
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TNFRSF10A	Tümör nekroz faktör reseptör üstailesi üye 10a
TNFRSF10B	Tümör nekroz faktör reseptör üstailesi üye 10b
TNFRSF10C	Tümör nekroz faktör reseptör üstailesi üye 10c
TNFRSF10D	Tümör nekroz faktör reseptör üstailesi üye 10d
TRAIL/ Apo2L	Apoptozla ilişkili tümör nekroz faktör indükleyici ligand
TRAIL- R1	TRAIL reseptör 1
TRAIL- R2	TRAIL reseptör 2
TRAIL- R3	TRAIL reseptör 3
TRAIL- R4	TRAIL reseptör 4
UV	Ultraviyole
V	Volt
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Prostat Kanser Hücresi Oluşumu 8

Şekil 1.2. 24 Saatlik İnkübasyon Sonunda PC-3 Hücre Hattı 10

Şekil 1.3. 48 Saatlik İnkübasyon Sonunda PC-3 Hücre Hattı 10

Şekil 1.4. Düşük ve Yüksek Oranda Konfluent DU-145 Hücre Hattı 11

Şekil 1.5. Bitki Flavonoidlerinin Sınıflandırılması 12

Şekil 1.6. Rutin'in Kimyasal Yapısı 14

Şekil 1.7. TRAIL Reseptörlerinin Şematik Gösterimi ve TRAIL- DISC (Sinyal Komplekslerine Bağlı Ölüm) Bileşenleri 20

Şekil 1.8. TRAIL'e Direnç Durumlarına göre Hücresel Moleküller 23

Şekil 2.1. 6 Kuyucuklu Plaklarda Rutin, TRAIL ve Rutin + TRAIL'in PC-3 ve DU-145 Hücre Hatlarına Uygulama Şeması. 34

Şekil 3.1. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan PC-3 Hücrelerinde Yüzde Canlılık Oranları (24 Saat İnkubasyon) 37

Şekil 3.2. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan PC-3 Hücrelerinde Yüzde Canlılık Oranları (48 Saat İnkubasyon) 39

Şekil 3.3. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan DU-145 Hücrelerinde Yüzde Canlılık Oranları (24 Saat İnkubasyon) 41

Şekil 3.4. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan DU-145 Hücrelerinde Yüzde Canlılık Oranları (48 Saat İnkubasyon) 41

Şekil 3.5. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan DU-145 Hücre Hattı Besi Yerlerinde Ölçülen LDH Düzeyleri (24 Saat İnkubasyon) 42

Şekil 3.6. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan DU-145 Hücre Hattı Besi Yerlerinde Ölçülen Glikoz Düzeyleri (24 Saat İnkubasyon) 42

Şekil 3.7. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan PC-3 Hücre Hattı Besi Yerlerinde Ölçülen LDH Düzeyleri (24 Saat İnkubasyon) 43

Şekil 3.8. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan PC-3 Hücrelerinde Hücre Hattı Besi Yerlerinde Ölçülen Glikoz Düzeyleri (24 Saat İnkubasyon) 43

Şekil 3.9. Belirtilen Her İki Hücre Hattının Çizilmiş 0. Saat Kontrol (0 µm) Kuyucuğu 44

Şekil 3.10. TRAIL (20 ng/ ml) Uygulanan Çizilmiş DU-145 Hücre Kuyucukları 45
Şekil 3.11. Rutin (750 µm) Uygulanan Çizilmiş 0. Saat DU-145 Hücre Kuyucuğu 45
Şekil 3.12. Rutin (750 µm) Uygulanan Çizilmiş 24. Saat DU-145 Hücre Kuyucuğu 45
Şekil 3.13. Rutin (750 µm)+TRAIL (20 ng/ml) Uygulanan Çizilmiş 0. Saat DU-145 Hücre Kuyucuğu 46
Şekil 3.14. Rutin (750 µm)+TRAIL (20 ng/ml) Uygulanan Çizilmiş 24. Saat DU-145 Hücre Kuyucuğu 46
Şekil 3.15. Rutin (750 µm) Uygulanan Çizilmiş 0. Saat PC-3 Hücre Kuyucuğu 46
Şekil 3.16. Rutin (750 µm) Uygulanan Çizilmiş 24. Saat PC-3 Hücre Kuyucuğu 47
Şekil 3.17. Rutin (750 µm)+TRAIL (20 ng/ml) Uygulanan Çizilmiş 0. Saat PC-3 Hücre Kuyucuğu 47
Şekil 3.18. Rutin (750 µm)+TRAIL (20 ng/ml) Uygulanan Çizilmiş 24. Saat PC-3 Hücre Kuyucuğu 47
Şekil 3.19. DU-145 Hücrelerinde 0. Ve 24. Saatte Ölçülen Uzunlukların (µm) Farkına göre Çizilmiş Alanların Kapanma Oranlarının %Yüzde Değerleri 48
Şekil 3.20. PC-3 Hücrelerinde 0. Ve 24. Saatte Ölçülen Uzunlukların (µm) Farkına göre Çizilmiş Alanların Kapanma Oranlarının %Yüzde Değerleri 48
Şekil 3.21. 24 Saat İnkübe Edilmiş PC-3 Hücrelerinde Canlı Hücrelerin % Yüzde Değerleri 49
Şekil 3.22. 24 Saat İnkübe Edilmiş DU-145 Hücrelerinde Canlı Hücrelerin % Yüzde Değerleri 49

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 26

Çizelge 2.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler 27

Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 28

Çizelge 2.4. PC-3 Ve DU-145 Hücre Hatlarının Her Birine Rutin ve Rutin + TRAİL'in 96'lık Plakta Uygulama Şeması 32

Çizelge 3.1. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan PC-3 Hücrelerinde Artan Dozlara göre Yüzde Canlılık Verileri 38

Çizelge 3.2. Rutin ve Rutin+TRAIL Uygulanan DU-145 Hücrelerinde Artan Dozlara göre Yüzde Canlılık Verileri 40

1. GİRİŞ

Bir çok hastalığın tedavisi için yeni ve son derece etkili gelişmeler içerisinde, daha zengin ülkelerdeki bitkisel ilaçlara olan talepte kayda değer bir artış bulunmaktadır. Bitkisel ilaçlar eşsiz kimyasal çeşitliliği ve minimum yan etkileri olması gibi bilinen yararlı etkilerinden dolayı yaygın şekilde kullanılmaktadır. Flavonoidler, polifenolik bileşikler bitkisel kökenli ilaçlar içerisinde önemli sınıflardan biridir. Antioksidan aktivitelerinden dolayı, DNA ve hücreleri oksidatif hasar, mutagenez ve karsinogenezi inhibe ederek korunmaları açısından önemli bir role sahiplerdir (Jin ve ark., 2007).

Kanser, hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalmasıdır. Kanser günümüzde ölüm oranı yüksek olan sağlık sorunları arasında ön sıralarda yer almaktadır. (Montenegro ve ark.,2014)

Prostat kanseri, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde görülen önemli bir sağlık sorunu olmakla birlikte erkeklerde, akciğer kanserinin peşinden en sık rastlanan ikinci sıradaki kansere bağlı ölüm nedenidir. Prostat kanseri geç başlangıç yaşı, yavaş ilerlemesi, yüksek insidansı, tanımlanabilir preneoplastik lezyonlar ve risk gruplarından dolayı kemopreventif stratejiler bakımından da önemli bir hastalıktır (Cimino ve ark., 2012).

Geleneksel tedavilerin ve cerrahi uygulamaların prostat kanseri insidansını kontrol edememesi, yeni stratejilerin geliştirilmesi için büyük ihtiyaç oluşturmuştur. Bu amaçla rutin gibi diyet polifenolik bileşenler kemopreventetif ajanlar olarak önemli adaylar olabilmektedir (Chidambara ve ark., 2012). Prostat kanseri için

mevcut tedavi seçenekleri (Cerrahi, hormon tedavisi, radyasyon tedavisi, kemoterapi) ile hastada iyileşme görülse de, çoğu hasta kötü sonuç elde etmekte ve toksik yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Dünya çapında Vit. E, selenyum, soya ürünleri, likopen ve yeşil çay kateşini gibi maddeler içeren bitkisel ilaçların kullanımının tahmini % 65 oranında yaygınlaştığı Dünya Sağlık Örgütünce yürütülen araştırma sonucu görülmüştür. Antikanserojen ajanların yaklaşık % 60'ı tıbbi bitkilerden ve diğer bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır. Fakat hala antitümör potansiyeli keşfedilmemiş daha bir çok bitki bulunmaktadır. Sentetik ilaçların zararlı yan etkilerine maruz kalınmaması için alternatif çözüm, alternatif tıbbi bitkiler üzerinde araştırmaların arttırılmasıdır (Cragg ve Newman, 2005; Pandey ve Madhuri, 2006; Rao ve ark., 2004).

1.1. Kanser Gelişimi

Trilyonlarca canlı hücreden oluşan vücudumuzda normal bir vücut hücresi düzenli bir şekilde büyür, yeni hücrelere ayrılır ve ölür. Bir bireyin hayatının erken yılları sırasında, normal hücreler kişinin büyümesini sağlamak için hızlı bir şekilde bölünür. Kişi olgunlaştığında ise çoğu hücre sadece yıpranmış, hasar görmüş ya da ölmekte olan hücrelerin yerini almak için bölünür. Kanser, vücudun herhangi bir bölümünde yer alan hücrelerin kontrol dışı büyümeye başlaması ile ortaya çıkar. Kanserin bir çok çeşidi vardır ancak bunların hepsi de bu anormal hücrelerin kontrol dışı büyümesinden kaynaklanmaktadır. Kanser hücreleri ölmezler bunun yerine büyümeyi ve yeni kanser hücrelerini oluşturmayı sürdürürler. Çoğu vakada bir tümör oluşturduğu gözlenen kanser hücreleri ayrıca normal hücrelerin yapamadığı diğer dokulara invazyonu (yayılım) da gerçekleştirebilirler (Tektemur, 2015).

Normal dokularda hücre çoğalması organizmanın ihtiyacına göre belirlenmektedir. Kanser, hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalmasıdır. Kontrollü hücre çoğalmasının gerçekleşmesi için de protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler arasında denge olması gerekmektedir. Kanserde mutasyon sonucu gen ifadesi değişmektedir ve hücreler kontrolsüz olarak büyümeye ve bölünmeye başlamaktadır. Bu nedenlerle hücrelerin normal fonksiyonları engellenmektedir. Hücrelerin sürekli çoğalması ile her organ yenilenme göstermektedir. Ancak bu yenilenme sırasında bazı hücreler anormal bir şekilde üreyerek tümör oluşturmaktadır. Kanser türleri gerek davranış gerek tedaviye cevap yönünden farklılık göstermektedir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkan tümörler bening ya da maling olabilmektedir (Kasap ve ark., 2010).

Kanser terimi, engellenmiş hücre ölümü, sınırsız hücre çoğalması ve metastaz oluşturmak üzere uzak dokulara ulaşmış malign tümör oluşumuna sıklıkla yol açan hücre fizyolojisindeki geçici-kalıcı değişiklikleri kapsayan kompleks süreçlerin bir serisi olarak tanımlanabilir. Kanser uzun zamanlı bir süreçte ve dört zorunlu faz boyunca gelişir.

a- İndüksiyon Fazı: Bu faz, 30 yıl veya daha uzun sürelidir. Bu fazda, radyasyon ve toksinler gibi, çeşitli çevresel karsinojenlerin birine veya birkaçına maruz kalınabilir. Karsinojene maruz kalındıktan sonra, ilk etkilerinin oluşmasına kadar çok uzun bir periyod geçer. Sonunda kansere yol açacak olası histolojik değişiklikler, şiddetli bir displazi başlar.Aynı kanserojene maruz kalan herkeste kanser gelişmez. Bireysel (genetik) faktörler, kokarsinojenler (kanser oluşumuna yardım eden etkenler), süre, miktar gibi faktörler de bu konuda etkilidir.
b- İnsitu Fazı (Lokal Faz): Bu fazda, kanser gerçekten vardır. Fakat kanser başlangıç alanında lokalize olarak kalır ve diğer dokulara yayılmaz.

c- İnvazyon Fazı**:** Bu fazda, kanser hücreleri çoğalır ve bazal membranı aşarak, daha derin dokulara saldırır. Böylece, kan damarlarına ve lenfatik kanallara girip ilerler.

d- Disseminasyon Fazı: İnvasyon fazından sonra kanser, başlangıç alanından uzak, çeşitli vücut kısımlarına yayılır (Devlin, 2002).

Kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonunda malign tümörlerin yani kanserin proteaz ve büyüme faktörleri salgılamaları önemli rol oynamaktadır. Proteazlar ekstraselüler matriks yapısını bozarak kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine yayılmasına yol açmaktadır Prostat, meme, akciğer, kolon ve rektum kanserleri görülen kanserlerin yarısından fazlasını oluşturmaktadır (Stetler-Stevenson ve ark., 1993).

1.2. Prostat Kanseri

1.2.1. Epidemiyolojisi

Prostat kanseri, dünyada erkeklerde her yıl yaklaşık 900.000 yeni vakanın teşhis edildiği en yaygın kanser türleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark., 2010). Prostat kanserinin ölüm oranı ve insidansı coğrafik bölgeler arası büyük farklar göstermektedir. Yaşam tarzı ve diyetsel faktörler prostat kanseri oluşumunu etkilemektedir (Center ve ark., 2012). Ortalama yaşam boyunca hastalığın görülme riski beyaz erkeklerde %17.6, siyah ırkta %20.6 iken bu hastalıktan hayat kaybı riski ise sırasıyla %2.8 ve %4.7 'dir. Hastalığın yıl boyunca görülme oranı en az olarak Asyada (1.9 kişi/100.000 kişi, Tianjin, çin) iken en yüksek oran Kuzey Amerika ve Skandinavya'da, daha sık olarak Afrikalı Amerikalarda görülmektedir (272 kişi /100.000 kişi). Çevresel etmenler prostat kanserinin oluşumunu

tetikleyebilmektedir. Amerika'da yaşayan Japon ve Çin kökenli insanların prostat kanserine yakalanma ve hayatını kaybetme oranları, Japonya ve Çin'de yaşayan akrabalarına oranla daha fazladır. Ülkemizde yapılan bir çalışmanın verilerine göre, prostat kanseri, akciğer, mesane, malign melanom dışı deri kanserleri, larinks kanserinden sonra en sık görülen 5. kanserdir (Zorlu ve ark., 2004). Prostat kanseri insidansı 1995'den beri yıllık yaklaşık %1.7 artış gösterirken, motalite oranı 1994'den bu yana her geçen yıl tahmini olarak % 4 azalmaya devam etmektedir (Chan ve ark., 2014).

Prostat ilk olarak 1536 yılında bir anatomist olan Niccolò Massa tarafından tanımlanmış ve 1538 yılında da anatomist Andreas Vesalius tarafından resmedilmiştir (Hellerstedt ve Pienta, 2002). Normal prostat bezi mesanenin hemen altında üretranın etrafını saran bir yapıdır. Prostat bezi sperm hareketliliğinde rol alan, birçok protein ve mineralden oluşan seminal sıvıyı üretmektedir. (Prscott ve ark., 1998). Prostat kanserini tıp literatürüne ilk kez 1817 yılında Londra‟lı doktor George Langstaff kazandırmıştır. Prostatı radikal perineal prostatektomi tekniği ile ilk kez 1904 yılında Young adında bir cerrah çıkartmıştır. Radikal retropubik prostatektomi tekniğini ilk kez 1945 yılında Millin kullanmıştır. İlerlemiş prostat kanserli hastalarda androjen hormonunun kan dolaşımından uzaklaştırılması için orşiektomi operasyonunu ilk kez 1941 yılında Charles Brenton Huggins uygulamıştır (Parkin ve ark., 2001; Kumagai ve ark., 2007).

Prostat kanseri, prostat bezinin hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengesinin bozulması sonucu, organ hacminin anormal büyümesine ile meydana gelir. Prostat tümörü genellikle uzun süre belirti vermeden ilermektedir ve belirtiler hastalar ileri yaşlara geldiğinde ortaya çıkmaktadır. Prostat kanseri, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde görülen önemli bir sağlık problemi olmakla birlikte erkeklerde, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan en sık kanser kökenli ölüm nedenidir (Szliszka ve Krol, 2013). Prostat

kanseri özellikle androjen reseptörü hedefleyen ajanlara çeşitli cevaplar veren heterojen bir hastalıktır (Ecstein-Fraisse ve Su, 2014).

1.2.2. Risk Faktörleri

Testosteron ve dihidrotestosteron normal prostat büyümesi için gerekli olan hormonlardır. Artan androjen stimulasyonu hücre bölünmesini arttırmaktadır ve bu da prostat karsinogenezine yol açmaktadır. Testosteron, östrojenler, insülin, leptin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi hormonlar prostat kanseri gelişiminde rol oynamaktadır (Chan ve ark., 1998; Kyprianou ve Isaacs 1988).

Prostat kanseri riski ile diyete bağlı olarak yüksek miktarda yağ alımı arasında bir ilişki bulunmaktadır. Yağ tüketimi ile yağ asitlerinin plazma konsantrasyonları artmaktadır ve bu artışında gonadal steroidlerin globünlere bağlanmasını inhibe edebileceği düşünülmektedir. Uzun süre bu şekilde beslenme, androjenik stimülasyonu artırma nedeniyle prostat kanseri oluşumunu tetikleyebilir. Diyetle alınan fazla miktarda yağ, uzun süreli androjenik uyarı oluşturmaktadır ve kanser riskini arttırmaktadır (Moorty ve Venugopal, 2008).

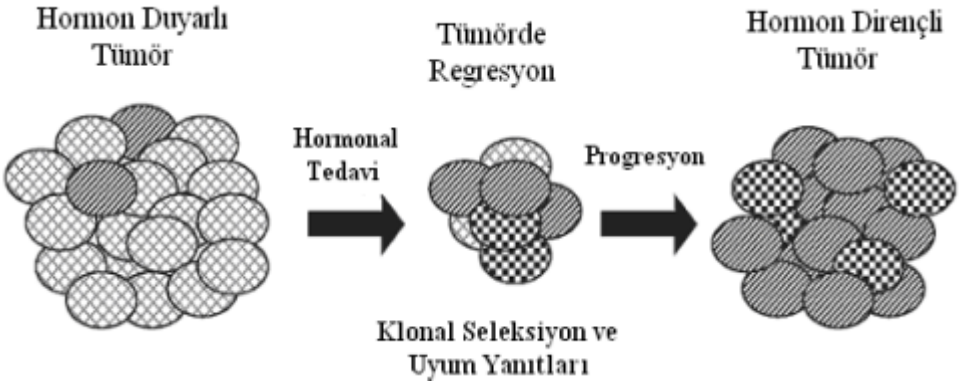
1.2.3. Oluşumu ve türleri

Prostat kanseri ; lokal olarak yavaş bir hızda, genellikle yıllar boyunca sürecek şekilde, gelişen sonunda da prostatın dışındaki komşu dokulara ya da kan

yoluyla farklı dokulara göç ederek yayılabilen bir kanser türüdür (Borley ve Feneley, 2009) .

Normal prostat dokusunda sinyalleşme yolağı androjen ile düzenlenir ve glanduler hücrelerin büyümesi ve apoptozu arasında dengeyi sürdürür. Hastalıklı dokuda, dengeleme mekanizması bozulmuştur ve androjen ekspresyonu glanduler hücrelerin büyümesine ve patolojik değişimlere yol açar, ki bu durum bening prostatik hiperplazi ve prostat kanseri ile sonuçlanır (Rittmaster, 2008). Prostat dokusu diğer tüm genitoüriner sistem organlarına göre en çok nöroendokrin hücreye sahip olan dokudur. Glandüler epitel üç tip hücreden oluşmaktadır . Bunlar içinde en az görüleni nöroendokrin hücrelerdir. Bu hücrelerin görevleri kesin olarak bilinmemekle birlikte diğer organlardaki nöroendokrin hücrelere benzer şekilde, büyüme ve gelişmede endokrin-parakrin düzenleyici bir rol oynadıkları görülmüştür. Bu hücrelerin köken ilişkilerinin bilinmesi, prostat kanserinin oluşum mekanizmasının açığa çıkarılması açısından önemlidir. Hücresel çalışmalarda nöroendokrin mekanizmanın prostat kanserinin oluşması, progresyonu ve genel prognozu için önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. Nöroendokrin hücreler bening prostat hipertrofisi, prostatik intraepitelyal neoplazi ve prostat kanserinde bulunmaktadır (Bostwick, 2003; Tezel ve Tezel, 2005).

Hormon dirençli prostat kanserinin oluşmasında kastrasyon sonrası gen ekspresyonunda ve sinyal iletim yolaklarında başlayan progresif süreç ve bu süreçte prostat kanser hücrelerinde meydana gelen moleküler uyum değişiklikleri ilgili gelişmelerin kademeli olarak refrakter prostat kanserine dönüşmesi şekil1.1.' de gösterilmiştir **(** Hadaschik ve Gleave, 2007).



Şekil 1.1. Prostat kanser hücresi oluşumu **(** Hadaschik ve Gleave, 2007). .

Prostat kanserinin; -adenokarsinoma,

-prostatik duktal adenokarsinoma,

-musinöz adenokarsinoma,

-saf küçük hücreli adenokarsinoma,

-sarkomatid karsinoma (karsinosarkom),

- adenoskuamoz ve skuamoz kanserler,

-transizyonel hücreli kanserler,

-prostatik epitelyal neoplazi (PIN),

-malign mezenşimal tümörler,

-atipik küçük asiner proliferasyon

gibi pek çok türü vardır ve %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlar en sık görülen prostat kanseri tipidir (Baltacı 2007).

1.2.4. Prostat Spesifik Antijen

Prostat Spesifik Antijen (PSA), insan kallikrein (hK) ailesine ait bir serin proteazdır, diğer serin proteazlar; pankreatik/renal kallikrein (hK1) ve glandüler kallikrein (hK2) dir. Bütün serin proteazların geni 19. kromozomda yer alır. PSA ve hK2 androjenlerin denetiminde prostat epitelinden salgılanmakta olup serum ve seminal sıvıda bulunmakta ve endojen proteaz inhibitörleri ile kompleks meydana getirmektedir. PSA, seminal sıvıda yoğun miktarda bulunurken, serumda normal olarak düşük seviyede bulunur (Diamandis ve ark., 2000; Partin ve ark., 1996).

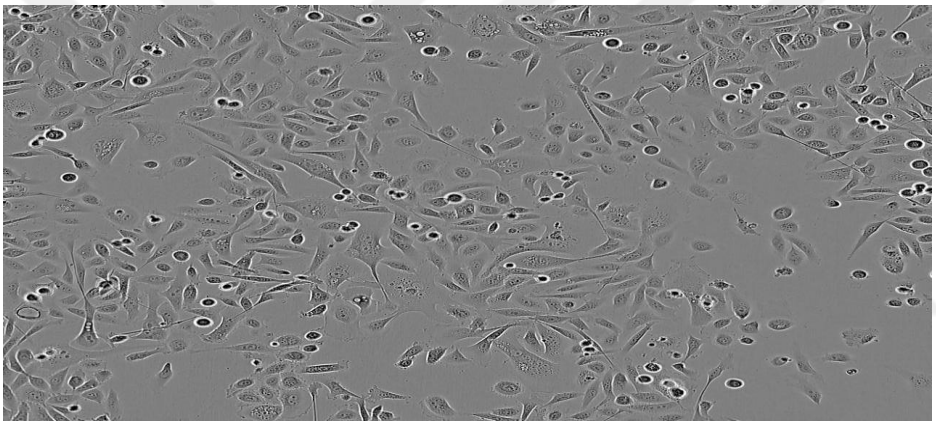
PSA, prostat epitel hücrelerinde sentezlenip yüksek miktarlarda seminal sıvıya salgılanır. Prostat kanserinin belirlenmesine ilişkin olarak dijital rektal muayene ve serum PSA düzeyi, önemli derecede katkı sağlamaktadır ve aynı zamanda prostat kanserinin evrelendirilmesi için de aydınlatıcı olabilmektedir **(** Hadaschik ve Gleave, 2007).

1.3. Hormona Dirençli Prostat Kanseri Hücre Hatları (PC-3 ve DU-145)

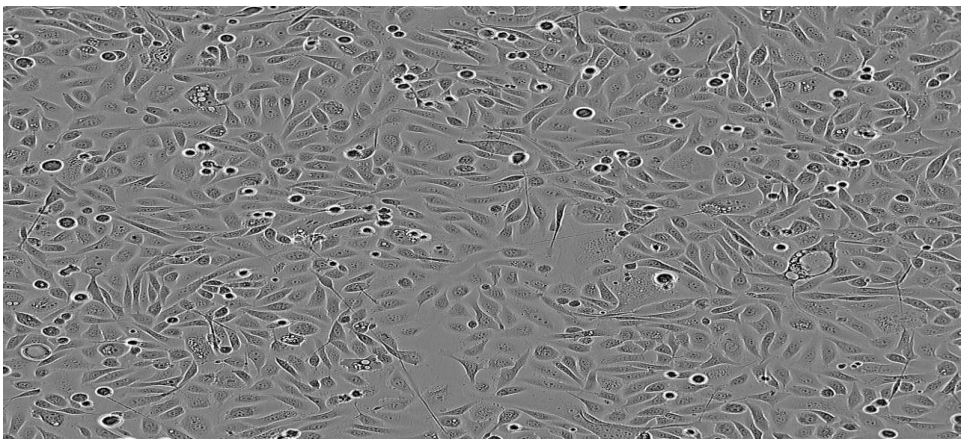
Prostat kanser hücreleri heterojen yapıya sahiplerdir. Hücre hatları farklı fenotipik karakterlere sahip olup, farklı proliferatif ve malignant potansiyel özellikler içerirler (Hamburger ve Salmon, 1977).

PC-3 hücre hattı Kafkas ırkından, 62 yaşında, derece 1V prostat adenokarsinomlu bir hastanın kemik metastazından elde edilmiştir. Kültür hücreleri hem yumuşak agar süspansiyonundaki monomoleküler tabakalarında, hem de fındık faresinin subkutan dokularında üretilmiştir. Transplant tümör (hücre kültürü), ilk tümörden üretilen hücre hattının karakteristiğini yansıtmaktadır. Karakteristik olarak zemine yapışarak çoğalırlar. Bu nedenle

hücrelerin başka yere aktarılması gerektiğinde yapıştığı yerden kaldırmak için tripsin EDTA (etilenediamintetraasetik asid) kullanılır. PC-3 prostat kanseri hücre hattı prostat epitelyum hücresi ile karşılaştırıldığında androjene, glukokortikoidlere, epidermal ve fibroblast büyüme faktörlerine cevap vermezler. Hormonoterapiye ve kemoterapiye dirençlidirler. Bu hücrelerde androjen reseptör fonksiyonu yoktur ve IL-6 reseptörü salgılar. Tüm bu fonksiyon ve morfolojik karakteri, PC-3 prostat kanser hücresinin kötü diferansiye adenokarsinom olduğu yönündedir. Bu hücreler ileri prostat kanser hücrelerinin biyokimyasal değişimlerinin araştırmalarında ve kemoterapötik ajanlara cevabı değerlendirmede kullanılmaktadır.

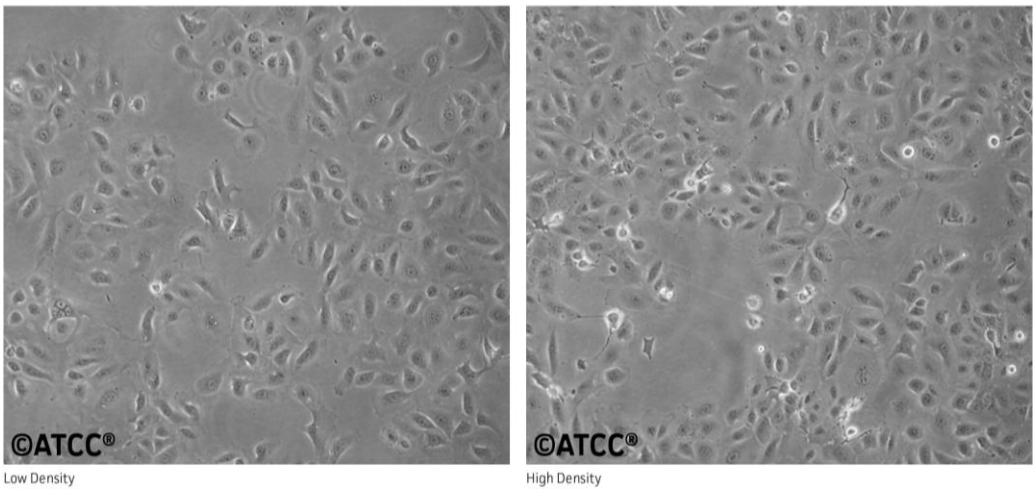


Şekil 1.2. 24 saatlik inkübasyon sonunda PC-3 hücre hattı (Erişim adresi: www.phe-culturecollections.org.uk, erişim tarihi: 18.08.2017).



Şekil 1.3. 48 saatlik inkübasyon sonunda PC-3 hücre hattı (Erişim adresi: www.phe-culturecollections.org.uk, erişim tarihi: 18.08.2017).

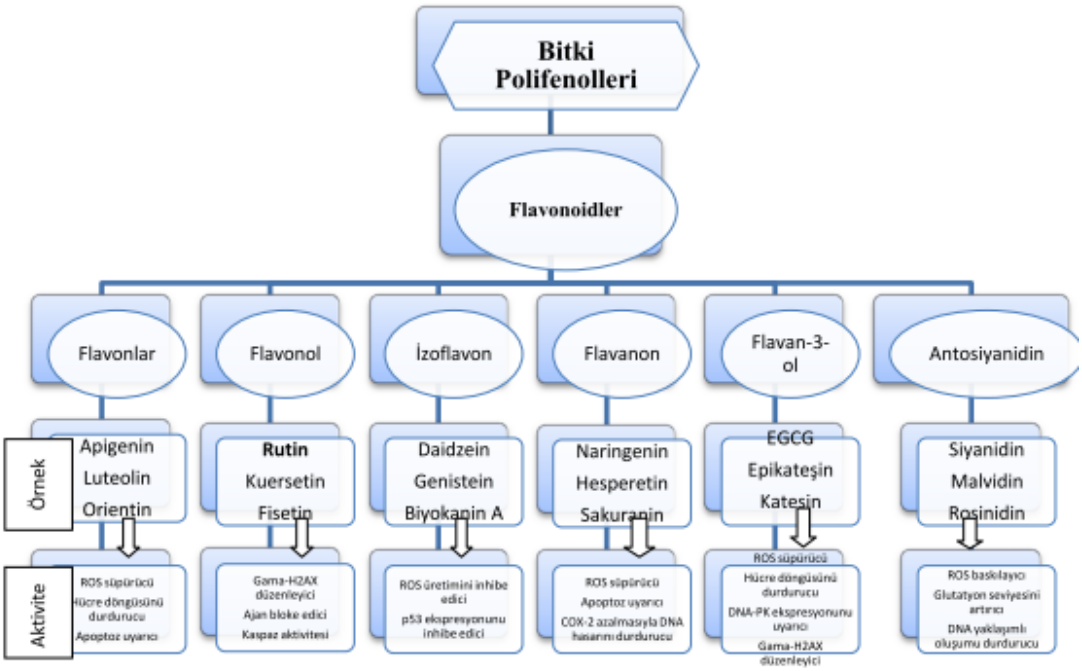
DU-145 hücre hattı prostat kanseri tanısı almış 69 yaşındaki bir erkek olgunun beyin metastazlarından üretilmiştir. Hormonoterapiye ve kemoterapiye dirençli olarak bilinir. "Nude" sıçanlara enjekte edildiğinde derece 2 prostat adenokarsinomu oluşturan tümorojenik etkisi vardır. Yapılan bir çalışmada DU-145 prostat hücrelerinin hücresel iskelet yapıları ışık, elektron ve immünfloresan mikroskobunda incelenmiş ve insan prostat kanseri üzerinde yapılacak ileri çalışmalar için mükemmel in vitro model oluşturabileceği bildirilmiştir (Green ve Clézardin, 2010).



Şekil 1.4. Düşük ve yüksek confluent oranında DU-145 hücre hattı (American Type Culture Collection, erişim tarihi: 18.08.2017).

1.4. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkisel kaynaklı yiyeceklerde bulunan polifenolik bileşiklerdir. 3000' in üzerinde doğal flavonoid belirlenmiş olup , sayıları her geçen gün artmaktadır . Flavonoidler 6 alt sınıfa (flavonoller, katekinler, flavonlar, antosiyanidler, flavanonlar, isoflavonoidler) ayrılırlar . Doğada sıkça rastlanırlar ve neredeyse her bitki familyasında bulunurlar. Meyve ve sebze, tahıl, kırmızı şarap, çay oldukça fazla miktarda flavonoid kaynağı oluşturur (Guardia ve ark., 2001).



Şekil 1.5. Bitki flavonoidlerinin sınıflandırılması (George ve ark., 2017).

Flavonoidler, tabiatta glikokonjugat şeklinde bulunur. Bunlar insan vücudunda genel olarak aglikan ya da metil ve sülfat türevlerini oluşturur (Dhanya ve ark., 2014). Bitkisel kökenli flavonoidlerin biyokimyasal ve farmakolojik fonksiyonları geniş bir yelpazeye sahiptir. Antioksidan, damar açıcı, anti-inflamatuar, antibakteriyel, immün-uyarıcı, antiallerjik ve antiviral etkileri bu aktiviteler arasındadır. Aynı zamanda, insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar flavonoidlerin KVH ve kanser hastalıklarına yakalanma riskini azalttığı belirlenmiştir. Flavonoidler, kanser hücresinin çoğalmasını engellerler ve anjiyogenezi inhibe ederler. Rutin ve kuersetin, flavonoid ailesinde yer alan iki önemli bileşiktir. Bu flavonoidler kozmetik sektöründe antioksidan işlevde fakat sudaki çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle sınırlı seviyede kullanılmaktadır. (Yolaa ve ark., 2014). En sık rastlanan flavonoidlerden bir tanesi olan rutin, kuersetine kıyasla kalınbağırsak iltihabına (kolitis) karşı etkili olmaktadır (Mascaraque ve ark., 2015).

Flavonoidlerin bir diğer özelliği ise, geçiş metal iyonu şelatörü olarak görev yapmasıdır. In vivo ve in vitro ortamlarda, geçiş metalleriyle katalizlenen serbest radikal oluşturma reaksiyonlarında önemli rol oynar. Bu durum, flavonoidlerin antioksidan etkisinden ileri gelmektedir, antioksidan etki ile lipid peroksidasyonu engellenerek, redoks reaksiyonu oluşturan metallerle şelat oluşturarak veya reaktif oksijen türleriyle reaksiyona girip etkisiz hale getirir (Heim ve ark., 2002). Serbest radikaller, vücudun kendisi tarafından (oksijenli solunum, metabolik reaksiyonlar, stres veya enfeksiyon gibi) üretildikleri gibi çevresel nedenlerle de (sigara, güneş ışınları, kirlilik gibi) oluşabilirler. Vücuttaki serbest radikaller eşleşmemiş oksijen atomları taşıdıklarından vücutta proteinler veya hücrelerle elektron alışverişi yaparlar. Bu reaksiyon kontrol altına alınmaz ve devamlı hale gelirse vücut dokularında kanser oluşumu gibi bozukluklara neden olur. Endojen metabolik olarak üretilen veya ekzojen gıda yolu ile alınan antioksidanlar ile serbest radikal oluşumu dengelenerek serbest radikallerin zararlı etkileri giderilmektedir. (Cao ve ark., 1997).

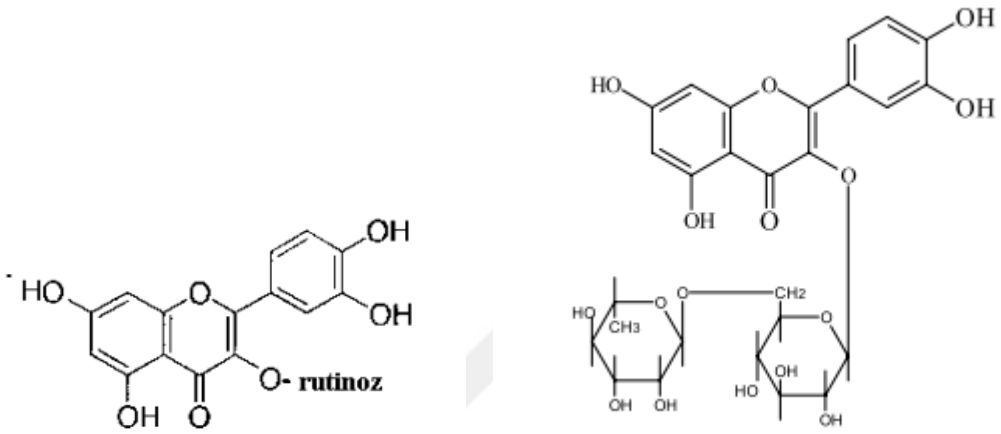
Flavonoidlerin aşırı miktarda alımı, yan etkilere sebep olabilir. Bu durum, esansiyel geçiş elementlerinde ve bunlara bağımlı enzim aktivitelerinde azalmaya neden olur (Cirico ve Omaye 2006; Gao ve ark., 2003).

1.5. Rutin

1.5.1. Genel Yapısı

Bitki polifenollerinden flavonoidler grubuna giren rutin, kuersetin ve rutinozdan oluşan bir glukoziddir, aynı zamanda vitamin P olarak da bilinmektedir. Turunçgil meyveler ve diğer bir çok bitkide bulunan rutin, özellikle karabuğday (

218 mg/kg kuru ağırlık, Kreft ve ark., 2006), siyah çay, elma kabukları, soğan ve üzüm kabuklarında bol miktarda bulunmaktadır (Florek ve ark., 2005). Rutinin molekül formülü, $C_{27} H_{30} O_{16}$ ' dır ve molekül ağırlığı 610.52 daltondur. Kimyasal yapısı Şekil 1.1. ' de gösterilmiştir (Moghaddasian ve ark., 2013).



Şekil 1.6. Rutin'in Kimyasal Yapısı (Tilki, 2007; Yüce, 2006)

1.5.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Yeşilimsi açık sarı renkli, iğne şekilli kristal görünümünde , toz halinde katı bir maddedir. 214-215 °C de dekompoze olarak erir. Erime noktası 242 °C dir. Rutin, suda az çözünür, ancak suda, aglikanı olan kuersetinden daha fazla çözünürdür. 1 g rutin 8 L suda, 200 mL kaynar suda ve 7 mL kaynar metanolde çözünür. Piridin, dimetilsülfoksit, alkali çözeltiler ve formamit içinde çözünür; alkol, aseton ve etilasetat içinde az çözünür ve kloroform, karbon sülfür, eter ve benzende pratik olarak çözünmez. Rutin'in metanol içerisinde hazırlanmış çözeltisi 3 hafta dayanıklıdır (Fang ve ark., 2007). Rutinin suda çözünmüş hali zayıf biyoyararlanıma, değişkenliğe ve doz oranlarındaki eksikliğe yol açmaktadır ve tüm bunlar klinik kullanım alanlarını sınırlandırmaktadır (Kamel ve Mostafa, 2015).

Rutin bir flavonol olan kuersetin ve bir disakkarit olan rutinoz (ramnoz (6-deoksi-L-mannoz) ve glukoz) dan meydana gelmiştir ve flavonol tipi bir glikozittir. Literatürlerde rutin için rutozid; kuersetin-3-rutinozid ve sophorin gibi bir çok isim kullanılmaktadır Kimyasal olarak [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-oxo-chromen-3-yl-rutinoside] ya da [3,3',4',5,7-pentahydroflavon-3-rhamnoglukoside] olarak adlandırılır. Kapalı kimyasal formülü $C_{27} H_{30} O_{16}$ ' dır. Açık kimyasal formülü Şekil 1.1. 'de yer almaktadır (Gao ve ark., 2003).

1.5.3. Organizmadaki Etkileri

Rutin; antioksidan, anti-inflamatuar, anti-karsinojenik, anti-trombotik, sitokoruyucu ve damar koruyucu özelliklere sahiptir. Rutin, fenolik bir antioksidan olup süperoksit radikallerini süpürdüğü tespit edilmiştir. Rutin, demir katyonlarına benzer olarak metal iyonlarıyla şelat oluşturabilir.

Rutinin in vivo antioksidan fonksiyonu, sindirimin sonraki aşamalarında oluşan metaboliti ve aynı zamanda aglikanı olan kuersetin sayesinde olmaktadır. Rutin aynı zamanda biyolojik antioksidan görevli indirgenmiş glutatyon seviyesini korumaya yardımcıdır. Belirli şartlar göre, hem rutin hem de metaboliti olan kuersetin pro-oksidan olarak işlev görür (Park ve ark., 2001). Ancak, çok yüksek dozda rutin alımının, demir içeren enzimlerin (katalaz gibi) demir içeriğini azalttığı sıçan karaciğerlerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Gao ve ark., 2002).

Rutinin diğer etkileri ise, kan damarı elastikiyetini arttırmak, aterosikleroz ve dolaşım bozukluklarında tedavi edici görevde olmak, kan basıncını düşürmek , cildi canlandırmak, doğurganlığı arttırmak, nöro koruyucu

aktivitelere sahip olmak ve C vitamini kullanımını indükleyici etkide bulunmak gibi aktivitelerdir (Kreft ve ark., 2006; Moghaddasian ve ark., 2013).

Rutinin, trombosit kümelerinin inhibisyonunda, kandaki yağ miktarı ve kolesterolün azalmasında yararlı etkileri bulunmuştur. Rutinin ve EGCG, kuersetin gibi diğer analoglarının hem kanser hücre hatlarında hem de fare modellerinde kemopreventif aktivitesi olduğu görülmüştür. NK/ Ly asites ve B16F10 hücreleri gibi in vivo modellerde antitümör etkisi olduğu gözlemlenmiştir. (Menon ve ark., 1995; Volate ve ark., 2005) Rutin uygulamasının prekanseröz lezyonların miktarını azaltmakta, bağırsak kanseri ve nöroblastom LAN-5 hücrelerinin apoptozunun indüklenmesinde önem yararları bulunmaktadır (Chen ve ark., 2013). Kapillar yapıyı güçlendirmesinin yanı sıra, antiviral ve antihipertansif özelliklere de sahiptir (Korkmaz ve Kolankaya, 2010). Gong ve arkadaşları (Gong ve ark., 2010) rutinin apoptotik hücrelerin ölümüyle oluşan H_2O_2 'e karşı toplar damar endotel hücrelerini koruduğunu tespit etmişlerdir.

Rutin bir immun-modülatördür ve anti-diyarel, miyokard koruma ve böbrek hasarına bağlı iskemik-reperfüzyona karşı böbrek koruyucu etkiye sahiptir (Herrmann ve Janke, 2001). Kan basıncını azaltma ve kılcal yapıyı güçlendirmesinden dolayı hemolojik hastalıklar ve hipertansiyonla ilişkili olarak kılcal damarlardaki zayıflığın artması durumuyla savaşmaktadır (Schilcher ve ark., 2002).

1.5.4. Reprodüktif Sisteme Etkileri

Reprodüktif organlar ve sperm kalitesi üzerinde etkili olan rutinin lipid peroksidasyonu ile indüklenen spermanın yıkımına karşı koruyucu etkisi olduğu

görülmüştür (Moretti ve ark., 2012). Ayrıca rutinin reprodüktif toksisiteye bağlı siklofosfamidin gelişmesi ve ratlarda oksidatif strese bağlı testis iskemi-reperfüzyon ile birliklte tip 1 diyabetes mellitusta gözlemlenen oksidatif stresten testis dokusunu ve reprodüksiyonu koruduğu tespit edilmiştir (Abarikwu ve ark., 2012; Akondi ve ark., 2011; Butchi Akondi ve ark., 2011).

1.5.5. **Antikanserojen Etkileri**

Oksidatif stres protein, lipid ve DNA düzeylerinde hücresel hasara yol açmaktadır. Bu hücre kısımlarının yıkımlarındaki birikimin kanser oluşumu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu da belirli reaktif oksijen türlerinin kanser gelişimi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Örneğin androjenler prostattaki bu tip oksijen türünü üretmek için önemli bir ajan olabilmektedir (Ripple ve ark., 1997 , 1999). Çekirdeksel androjen reseptörü üzerinden (AR) androjenler, normal insan ve rodent prostatlarının gelişimi ve onarımı için mutlaka gereklidir (Kamangar ve ark., 2006; Klein, 2006; Moon ve ark., 2006).

Flavonoidlerin antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleriyle çok çeşitli biyolojik etkiler ortaya koydukları bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri belirli kanserlerin ve ateroskleroz gibi bir çok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, insan lökemi HL-60 hücreleri bir fare modeline yerleştirilmiş ve rutin (120 mg/kg) uygulaması sonun da tümör boyutunda önemli bir azalma görülmüştür. Bu durum rutinin antilökemik potansiyelini ortaya koymuştur (Lin ve ark., 2012). Başka bir çalışmada, farelerde SW480 kanser hücre hattına (kolon kanseri) rutinin uygulanması sonucunda, ortalama yaşam süresinin artmasıyla birlikte vücuda daha az zararlı etkisi olduğu dikkat çekmiştir (Alonso-Castro ve ark., 2013). Diğer çalışmalarda, rutinin LAN-5 hücrelerinin (nöroblastomlar) büyümesini önemli seviyede inhibe ettiği, kemotaktik aktivitesi

olduğu ve TNF-a sekresyonunda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2013). Rutin ayrıca kolorektal kanser hücrelerinde metastazı, anjiyogenezi ve proliferasyonu önlemesiyle birlikte hücre döngüsünü durdurma veya apoptoz yoluyla kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir (Arau´jo ve ark., 2011). Radyoiyot tedavisinde bir adjuvan olarak faydalı olduğu görülmüştür (Gonc¸alves ve ark., 2013).

1.6. Apoptozla İlişkili Tümör Nekroz Faktör İndükleyici Ligand (TRAIL)

1.6.1. Genel Yapısı

Programlı hücre ölümü (apoptoz), genetik olarak doku homeostazının korunması ve istenmeyen hücrelerin eliminasyonu için gerekli olan mekanizmanın kontrol edilmesidir. Bu olay içerisinde çok sayıda ligand-reseptör ailesi görev almaktadır. Bu ailenin üyelerinden bazıları TNF-, CD95L, FasL, Apo-1L ve TRAIL/ APO-2L' dir. Bunlar hücre metabolizmasını , proliferasyonu, sitokin üretimini ve apoptozu kapsayan bir çok biyolojik fonksiyonu düzenlemektedir (Krammer, 1999; Peter ve Krammer, 1998).

Apoptozla ilişkili tümör nekroz faktör (TNF) indükleyici ligand (TRAIL/ Apo-2L), normal hücrelere koruyucu etkideyken, kanser hücrelerinin bir çok çeşidinde apoptozu uyaran tip 2 transmembran proteinidir ve bağımsız olarak iki gruptan köken aldığı keşfedilmiştir. Bu iki grubun CD95 ligand (Fas-L) ve TNF nin ekstraselüler etki alanına sahip sıra eşitliğini paylaştığı tespit edilmiştir (sırasıyla %23 ve %28) (Pitti ve ark., 1996; Wiley ve ark., 1995). TNF üst ailesinin bir üyesi olarak tanımlanan TRAIL, insan ve farede sırasıyla 281 ve 291 amino asitten oluşmaktadır. Kısa bir süre sonra açıklanan diğer benzer protein ise Apo-2 ligand tır.

TNF üst ailesi üyelerinin inflamasyon, apoptoz, proliferasyon, invasyon, anjiyogenez, metastaz ve morfogenez olaylarına dahil oldukları bildirilmiştir (Aggarwal ve ark., 2012).

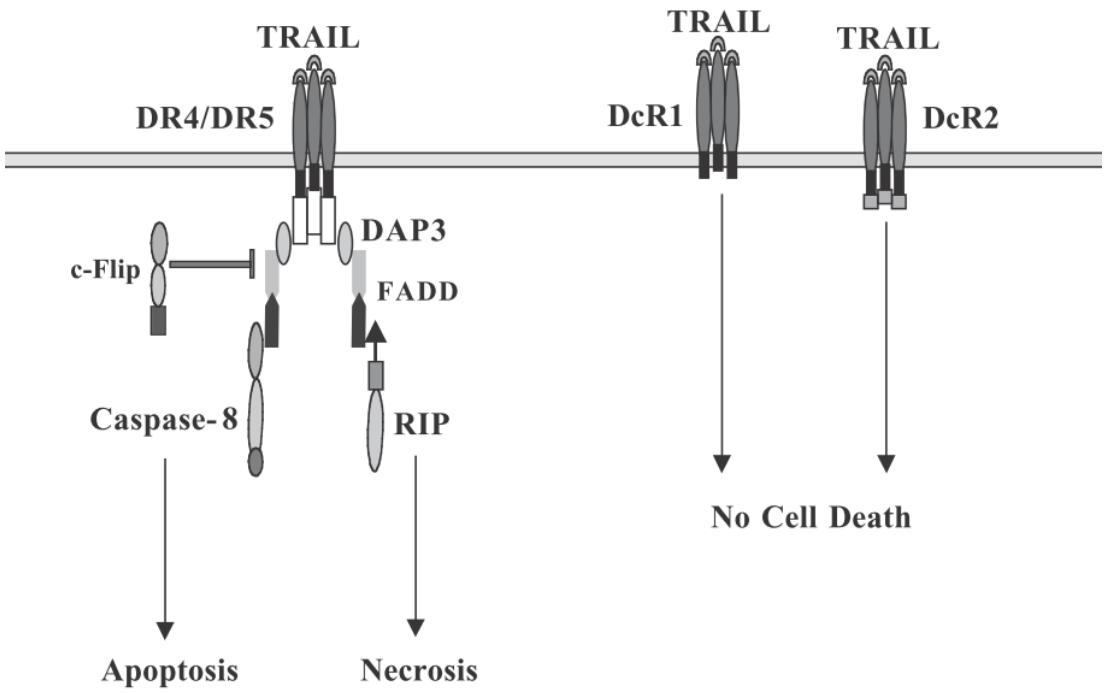
TRAIL in tip 2 membran proteini karakterlerine sahip olduğu bulunmuştur. TRAIL in C terminali çözünür bir ligand oluşturmak için proteolitik özelliğe sahip olabilmektedir. Kromozom 3 üzerine yerleşmiş ve 20 kb gen kodlamasıyla TRAIL beş ekzon ve dört introndan oluşmaktadır. TRAIL mRNA; akciğer, karaciğer, timus, plasenta, ovaryum, ince ve kalın bağırsak ve kalpte tespit edilmiştir ama özellikle prostat ve dalakta daha yüksek oranda bulunmaktadır. TRAIL in hem tam uzunluk hem de çözünür versiyonu insan kanser hücre hatlarında apoptozu uyarmaktadır fakat, normal hücreleri etkilememektedir (Wiley ve ark., 1995). Ailedeki diğer üyelerin ait bu homoloji seviyelerinin nispeten daha düşük görünmesine rağmen monomerik TRAIL in kristal yapısı analizi TNF ve CD40 ligandının üç boyutlu yapısı ile büyük benzerlik göstermektedir. TRAIL hücre yüzeyindeki mevcut reseptörleri bağlayan homo-trimerlerden oluşur. Bu trimerizasyon TRAIL in biyolojik aktivitesini monomerik formuyla kıyasla artırmaktadır (Cha ve ark., 1999).

1.6.2. Ölüm Reseptörleri ve TRAIL'in Etki Mekanizması

TRAIL'in apoptozu uyarması çok aşamalı bir süreçtir. Adaptör protein FADD yoluyla kaspaz 8' i içeri alan ölüm uyarıcı sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna yol açan DR4 ve DR5 hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır. TRAIL apoptotik sinyalleşme, TRAIL reseptörlerine ligand bağlanması ve sonrasında ölüm alanına bağlı adaptör protein Fas (FADD) ve sonunda hücre ölümüne yol açan kaspaz 8 aktivasyonunu ve daha ileri kaspaz 3 alt aktivitesini kolaylaştıran ölüm uyarıcı sinyal kompleksi (DISC) oluşumunu sağlayan sistein – aspartik proteaz prokaspaz- 8' in eklenmesi sonrası başlatılmaktadır (Pennarun ve ark., 2010). DISC' in oluşumu ve

kaspaz 8’ in içeri alınması, DNA parçalanması ve apoptoza neden olan kaspaz 7 ve kaspaz 3’ ün proteolitik aktivasyonuna yol açar (Tenniswood ve Lee, 2004; Wiley ve ark., 1995).

TRAIL in beş reseptörle etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Bu ölüm reseptörleri; DR4/ TRAIL-R1/TNFRSF10A ve DR5/TRAIL-R2/KILLER/TNFRSF10B ve de tuzak reseptörler DcR1/TRAIL-R3/TNFRSF10C ve DcR2/TRAIL-R4/TNFRSF10D dir. Bu dört membrana bağlı reseptöre ek olarak TRAIL zayıf etkileşimde osteoprotegerin (OPG) isimli çözünür bir reseptöre de bağlanabilmektedir. DR4 ve DR5; diğer ölüm alanlarına bağlanabilen sitoplazmik alanlarındaki bir ölüm domainini içeren tip 1 transmembran proteinleridir. TRAIL trimerinin bağlanması üzerine DR4 ve DR5 oligomerize olmaktadır ve sonrasında apoptotik sinyali aktarabilmektedir. Bu durumun aksine, tuzak reseptörler (DcR1 ve DcR2) bir apoptotik sinyal aktaramamaktadır (Emery ve ark., 1998; Pan ve ark., 1997).



Şekil 1.7. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi ve TRAIL- DISC (Sinyal komplekslerine bağlı ölüm) bileşenleri (Srivastava, 2001).

1.6.3. TRAIL in Fizyolojik Fonksiyonları

Hücre yüzeyindeki TRAILR1(DR4) ve TRAILR2(DR5) ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla kanser hücrelerinde apoptozu uyarmasının dışında, anti- inflamatuar etkisi olduğu, otoimmünitede ve anti-tümör denetimde görev aldığı düşünülmektedir (Finnberg ve ark., 2008).

TRAIL in immun hücrelerde indüklenebilir ekspresyonunun mevcut olduğu ileri sürülürken, bir sitokin olan TRAIL yolağı immun sistemin düzenlenmesinde de etkilidir. Aslında, LPS veya tip 1/ 2 interferon tarafından uyarılan monositler, hem çözünür hem de tümör hücrelerine karşı gelişmiş bir sitotoksisiteyle bağ oluşturan membrana bağlı formu ile TRAIL in ekspresyon seviyelerini artırmaktadır. LPS ve tip 1 interferon ayrıca, anti-CD-3'ün yanı sıra insan ve fare kökenli numunelerin T hücreleri yüzeyine TRAIL ekspresyonunun bağlanması için kullanılmaktadır (Arbour ve ark., 2005; Ehrlich ve ark., 2003). TRAIL , kanserlere karşı immun izleme mekanizması olarak da görülmektedir. Bu olaya örnek olarak çözünür rekombinant TRAIL ile tedavi edilen farelerde insan tümör ksenogreflerinin büyümesinin durdurulmasıdır (Walczak ve ark., 1999).

1.6.4. Bir Terapötik Yöntem Olarak TRAIL

Geçmiş yıllardan beri, TRAIL bir kanser terapötiği potansiyeline sahip TNF ailesinin en umut vadeden üyesi olarak ortaya çıkmıştır. İn vitro ve en önemli olarak in vivo tümör hücrelerinde selektif olarak apoptozu uyarabilirken normal hücrelere uygunsuz bir etki göstermediği için hala önemini korumaktadır (Song ve ark., 2006). TRAIL in tümör aktivitesi ve selektif etkisi, onu klinik kullanım için in vivo ciddi

yan etkilere sebep olabilen CD95L ve TNF den daha iyi bir aday haline getirmektedir.

Fakat, bir terapötik ajan olarak TRAIL uygulaması başlangıçta özellikle hepatositlerde in vitro rekombinant TRAIL ile tedavide yan etki göstererek olumsuz sonuçlanmıştır. Başka bir negatif durum, TRAIL tedavisinin TRAIL a dirençli belirli hücrelerde metastazı ve hayatta kalma gücünü geliştirerek desteklemesidir (Ganten ve ark., 2006; Malhi ve Gores, 2007; Secchiero ve ark., 2004).

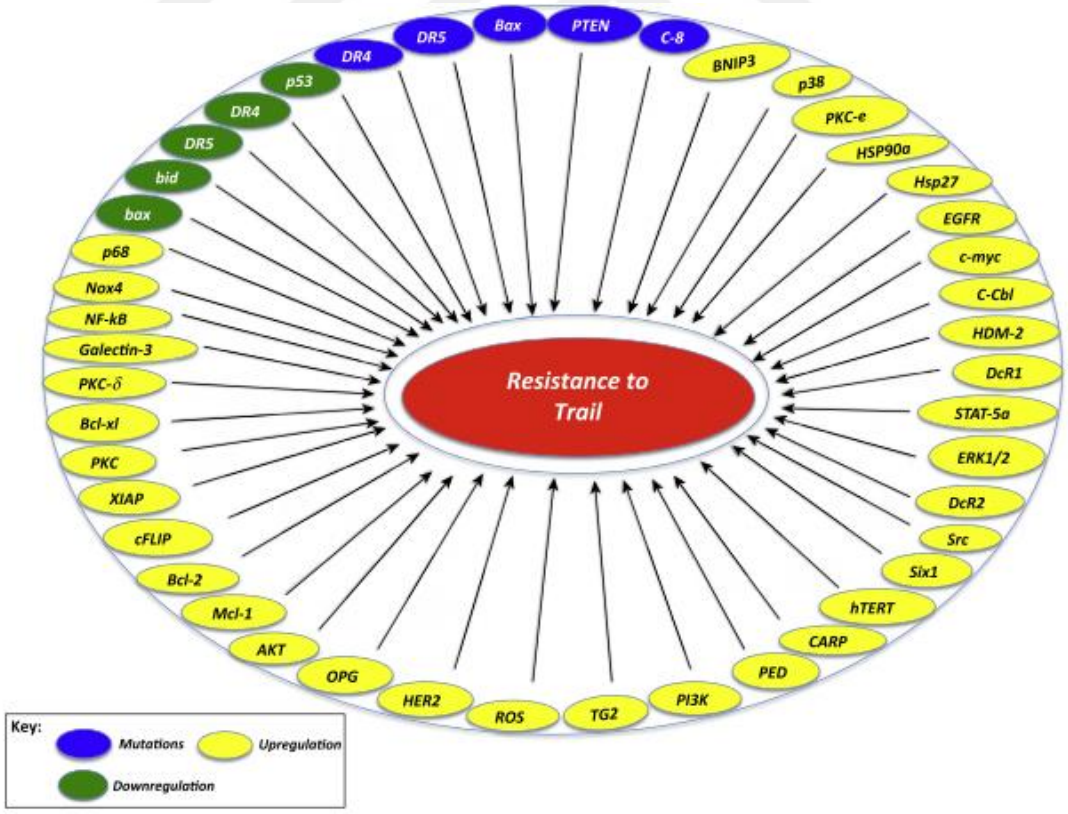
TRAIL in monoterapi de kullanımı giderek azalmakta olmasına rağmen terapötik ajan olarak kullanımına gösterilen ilgi hala devam etmektedir. Sinyal sisteminin daha iyi kavranması ve özellikle dirençten sorumlu apoptotik bloklara yoğunlaşılması; TRAIL e duyarlı kanser hücrelerinin direncinin zayıflatılması için fluorourasil, cisplatin gibi bilinen belirli ilaç ve moleküllerin kullanımının etkisine dair olasılıklar adına ışık tutmaktadır. Aslında TRAIL ile kombine kullanılan diğer moleküllerin yanı sıra genel terapötik ilaçlar, TRAIL aracılı apoptoza karşı duyarlı hücreleri duyarsız hale getirmekte ve normal hücrelere toksik etki göstermemektedir ve bu kombine kullanım daha düşük dozların etkili olmasını ve yan etkilerin azalmasını sağlamaktadır (Poh ve ark., 2007; Zauli ve ark., 2005).

1.6.5. Kanser Hücrelerinde TRAIL Direnci

Bazı tümör hücreleri TRAIL' e bağlı sitotoksisiteye karşı direnç göstermektedir. Apoptoza geçişteki başarısızlık, TRAIL varlığının kanser hücrelerinde direnç oluşturmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, TRAIL' in kanser gelişimi ve ilerlemesinde payı vardır. Çok çeşitli faktörler direncin oluşumuna katkı sağlayabilir. Bu faktörlere; NF-jB aktivasyonu, ölüm reseptörlerinin düzensizliği, tuzak

reseptörler ve proapoptotik veya anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun değişmiş olması örnek gösterilebilir (Bucur ve ark., 2006; Ray ve ark., 2005).

Önceki umut verici sonuçlara rağmen, çok sayıda kanser hücresinin TRAIL a dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu hücreler arasında özellikle şiddetli malign özellikteki pankreatik kanser hücreleri, nöroblastomlar ve malign melanomlar yer almaktadır. Kanser hücreleri, DR ve mitokondriyal düzeyde ve diğer sinyal yolaklarıyla TRAIL e direnç göstermektedirler. Bu şekildeki tümörler apoptoz uyarımından kaçmak için çeşitli mekanizmalara sahip olmasına rağmen TRAIL e karşı direnç oluşturmasıyla ilgili genel bir fikir birliği henüz oluşturulamamıştır (Mellier ve ark., 2010). Çalışmamızda da TRAIL in farklı potansiyelleri gözlemlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 1.8. TRAIL e direnç durumlarına göre hücresel moleküller (Prasad ve ark., 2014).

1.6.6. TRAIL' e Duyarlı Kanser Hücreleri için Stratejiler

Tümör hücrelerini doğal olarak inhibe eden veya ortadan yüksek seviyeye TRAIL e bağlı apoptoza olan direnci yenebilecek sayısız yöntem mevcuttur. Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına yardım eden bu direnç mekanizmaları duyarlılığı tanımlayan ilaçlar gibi yeni yaklaşımların keşfedilmesine yardım etmektedir (Zhang ve Fang, 2005).

Yapılan çalışmalarda, TRAIL e dirençli birçok kanser hücresinde hem TRAIL 'le hem de duyarlı ilaçların düşük toksik dozlarıyla tek ajanlı tedavi, hücre canlılığı üzerinde minimal bir etki oluşturmuştur. Kombine kullanımlarında sinerjistik bir etki ortaya çıkmıştır. Direnci azaltmak veya TRAIL' in etkisini artırmak için küçük moleküllü sensitizörlerin kullanımı, TRAIL e duyarlı tümörleri yönetme ve klinik olarak önemli yaklaşımlar sunabilmek için büyük bir adımdır. Diğer birçok çalışmada etoposide, paclitaxel gibi kemoterapötik ajanların esas olarak ölüm reseptörlerinin aktivitelerini artırma yeteneği olduğu tespit edilmiştir ve farklı düzeylerde TRAIL direncini aşan quersetin ve derivasyonlarını (sulphoraphane, silibinin, curcumin,…) gibi başka ilaçlar da gösterilmiştir (Elrod ve Sun, 2008; Singh ve ark., 2003; Son ve ark., 2007).

1.7. Amaç

Rutin bir glikozid flavonoiddir , antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinmektedir. Apoptozla ilişkili tümör nekroz faktör indükleyici ligand (TRAIL) tümör hücrelerinde apoptozu uyarır ve normal hücreler üzerinde önemli bir toksik etkisi yoktur. TRAIL umut vadeden antikanserojen bir ajan olmasına rağmen TRAIL direnci, etkin bir kanser tedavisi için büyük bir engel oluşturmaktadır. Bu çalışmada,

rutin ve TRAIL'in kombine kullanımının prostat kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışması Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler biyoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler çizelge 2.1.' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal madde adı	Üretici firma	Katalog numarası
PC-3 hücre hattı DU- 145 hücre hattı	ATCC ATCC	CRL- 1435 HTB- 81
FBS standart	Lonza	DE14-801F
Tripsin/EDTA	Lonza	BE02-007E
RPMI hücre besiyeri w/ L-Glutamine 500 ml	Lonza	BE12-702F
%1 Penisilin/streptomisin 10000 units/m1	Lonza	DE I 7-602E

Çizelge 2.1. (Devam). Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

%1 Non-essential aminoasit (100X)	Lonza	BE13-114E
DMSO 5X	Sigma-Aldrich	D2650-5X10
Rutin trihydrate %97	alfaAesar	A13570
TRAIL		
PBS	Lonza	BE17-516F
SDS	Fisher	BP166-500
MTT	Sigma-Aldrich	M-2128
Trypan Blue Solution	Fluka	93595
Mycozap antifungal spray	Lonza	VZA-2001
Zefirolium		

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler çizelge 2.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Sarf malzeme adı	**Üretici firma**	**Katalog numarası**
Serolojik steril pipetler, 1 ml	SARSTEDT	86.1251.001
Serolojik steril pipetler, 5 ml	SARSTEDT	86.1253.001
Steril tüpler , 15 ml	SARSTEDT	62.554.502
Steril tüpler , 50 ml	SARSTEDT	62.547.254
Flask T-25	SARSTEDT	83.3910.002
Flask T-75	SARSTEDT	83.1813.002
6 kuyucuklu plate	SARSTEDT	83.1839
96 kuyucuklu plate	SARSTEDT	83.1835
Cryo tüp 2 ml	Biosigma	N40.3683
Lam	Marienfeld	C100000

Çizelge 2.2. (Devam). Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Lamel	Marienfeld	C911040
1000µl pipet ucu	BIOHIT	791004
200 µl pipet ucu	FL	28052
10µl Filtreli pipet ucu	BIOHIT	790011F
0,45 S PAT enjektör filter	SARSTEDT	83.1826
1,5 ml mikrosantrifüj tüpü	Bioplastic	B74011
2 ml eppendorf tüp	Bioplastic	B71420
Aloe veralı pudrasız eldiven	Yerli	Aloepdrsz-S
Maske	Yerli	Mask
Steril tek kullanımlık önlük	Yerli	Onlk
Beher 1000 ml	Isolab	
Spatül 200 g	Isolab	

2.1.3. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz adı	**Üretici firma**	**Katalog numarası**
Laminar akımlı kabin	Holten	1,8
İnvert Mikroskop	Olympus	CKX41
Floresan mikroskop	Leica	CME
CO_2'li inkubatör	Sanyo	MCO-18AIC
Buzdolabı	Ariston	
-80°C derin dondurucu	Sanyo	MDF-03386S
Sterilizatör	Biosan	UV- cleanerUVC
Su arıtma cihazı (ultrasaf su)	Millipore	Synergy 185
Su banyosu (ısıtmalı)	Nüve	BM402

Çizelge 2.3.(Devam). Çalışmada kullanılan cihazlar.

ELISA spektrofotometrik cihazı	Tecan	Sunrıse
Pipet 1000µl	Gilson	Pipetman
Pipet 100µl	Gilson	Pipetman
Pipet 10µl	Gilson	Pipetman
Santrifüj	Sigma	3K30
Güç kaynağı	Conset	E815
Vorteks	Biosan	Biovortex VI
Hassas terazi	Shimadzu	AUW320

2.2.Yöntem

2.2.1. Hücre kültürünün hazırlanması

2.2.1.1. Prostat kanser hücrelerinin çözülmesi ve kültürü

Çalışmamızda prostat kanser hücrelerinde rutin, TRAİL ve kombine kullanımlarının farklı zaman dilimlerinde farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisini incelemek üzere ticari olarak alınan PC-3 (CRL- 1435) ve DU-145 (HTB- 81) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler temin edilen kriyotüpler içinde saklandıkları (-80^{o}C) derin dondurucudan çıkarılarak 37^{o}C' deki steril su banyosunda kısa sürede çözdürülmüş ve olası kontaminasyonu önlemek için tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar akımlı kabine alınmıştır. Hücreler hafifçe pipetlenerek dağıtılmış ve %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Lonza, Basel, İsviçre), %1 Penisilin/ Streptomisin (Lonza, İsviçre), %1 non-essential aminoasit içeren RPMI(Lonza, İsviçre) kültür besiyerinin olduğu falcon tüpe alınmıştır. 10 dakika süreyle 500 rpm

devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittiğinde tüp tekrar alkolle silinerek laminar akımlı kabine alınmıştır. Santrifüj sonrası üstte kalan medyum çekilip atılmıştır.

Tüp içerisindeki hücreler, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin/ Streptomisin, %1 non-essential aminoasit içeren ve hücre üremesi için uygun olan RPMI besi ortamı ile pipetasyon yapıldıktan sonra T25 cm^2'lik filtre kapaklı hücre kültürü üretme kaplarına (flask) alınmıştır. Laminar kabinden alınarak 37^oC'deki %5 karbondioksit (CO_2) ortamındaki inkübatöre konulmuştur. Dondurma işlemi sonrası ilk kez çözülmüş olan hücrelerin besiyerleri ertesi gün değiştirilmiştir. Daha sonraki değiştirmeler ise, her gün hücrelerin canlılıklarının ve çoğalma hızlarının invert mikroskop ile takip edilmesi doğrultusunda, hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.2. Hücrelerin pasajlanması

Çalışmamızın devamında yüzeyi kaplanmış olan kültür kaplarındaki hücrelerin bir kısmı, hem sonraki deneyler için kullanılmak ve hem de stok olarak saklamak üzere, %20 FBS ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) (D2650, Sigma, St. Louis, USA) içeren dondurma kültür vasatında 1'er ml'lik hazırlanmış olarak cryo tüpler içerisinde dondurulmuş ve -80^oC'de saklanmıştır. Bölünmeye devam eden diğer hücreler hücre kültürü mikroskobu (invert mikroskop) (Leica, Almanya) kullanılarak kontrol edilmiştir. Flasklardaki hücrelerin belirli bir çoğunluğa ulaşması (konfluent) durumunda Tripsin/ EDTA (Lonza, İsviçre) kullanılarak yapıştıkları yüzeyden kaldırılması amacıyla, flasklar önce alkolle silinerek laminar kabine alınmıştır. Üzerindeki medyum alınarak atılmış ve yerine kültür ortamındaki hücre metabolizma yan ürünlerinin, serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla hücre dejenerasyonuna karşı dikkat edilerek divalent katyonları (Ca^{++},Mg^{++}) içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) (Lonza, İsviçre) (pH=7.0) ile hücrelerin yüzeyi

yıkanmıştır. Bunun nedeni serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisini inhibe etmesidir. Daha sonra PBS uzaklaştırılmış ve yerine 3-4 ml tripsin EDTA solüsyonu konulup yıkama işlemi yapılarak tripsinize edilmiştir. %5 CO_2 , 37^oC' deki inkübatörde yaklaşık 3-8 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları görülmüştür. Yerlerinden kalkmış PC-3 ve DU-145 hücre hatlarını içeren tripsin/EDTA solüsyonları, 50 ml'lik iki ayrı steril tüpe alınmışlardır ve üzerlerine 5 ml besi yeri ilave edilerek 500 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmişlerdir. Üstte kalan sıvı steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra kalan peletlerin üzerine uygun miktarda (1 adet T75 cm^2'lik flask için 10-15 ml besi yeri bulunacak şekilde) RPMI besi yeri (%10 FBS, %1 antibiyotik, % 1 esansiyel olmayan amino asit) konularak pipetleme işlemi yapılmıştır ve bu besi ortamı tek hücre halinde olacak şekilde pipetlenmeye devam edilerek homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonu her hücre hattı için iki adet olacak şekilde 4 adet T75 cm^2'lik filtre kapaklı hücre kültürü üretme kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlanmıştır.

2.2.2. **MTT hücre canlılık testi**

Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak kullanılan tetrazolyum tuzlarından biridir. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır. MTT kültür ortamında çözünemez ve ek olarak indirgenme ürünlerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO), SDS gibi çözücülerin kullanılmasını gerektirir. Doksan altı mikrokuyucuklu plakta büyütülen (24-96 saat, 37 °C) hücrelerin işaretleme "labeling" çözeltisindeki inkübasyon (%5 CO2, 37 °C) süresi MTT için 2-5 saattir. Genelde MTT inkübasyonundan önce hücreler,

kuyucuklarda 5000-10000 hücre olacak şekilde plaklara ekilir ve 48-72 saat kültür yapılır (Terzioğlu ve ark., 2013).

75 cm^2'lik flasklar deneyler için uygun oranda hücre ile kaplandıktan sonra flasklardaki PC-3 ve DU-145 hücreleri Tripsin-EDTA eklenip santrifüj edilmiş, FBS içermeyen besi yeri eklenerek ependorf tüpe alınmıştır. Trypan mavisi ile karıştırılıp sulandırılmış, daha sonra lam üzerine alınıp invert mikroskopta sayılmıştır. T75cm^2'lik flasklarda yeterli yoğunlukta (%70-%80) olan PC-3 ve DU-145 hücrelerinin sayısı 1.67×10^6 /ml oranında hesaplanmıştır .

MTT Proliferasyon Yöntemi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Uygun ortamda çoğaltılan hücreler her kuyucukta 5×10^4 hücre/100 µl olacak şekilde PC-3 ve DU-145 hücreleri ekilmiş ve kuyucuklara hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlanmıştır. Bu hücreler 37 °C'de, %5 CO2'li inkubatörde 1 gün bekletilmiştir. Hücrelerin uygun yoğunluğa ulaştığı görüldükten sonra, 96 kuyucuklu plaklara kaplanan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak farklı konsantrasyonlarda Rutin ve Rutin+TRAİL içeren 100 µl besi yerleri Çizelge 1.3. de gösterilen şekilde eklenmiştir:

Çizelge 2.4. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarının her birine Rutin ve Rutin + TRAİL'in 96'lık plakta uygulama şeması.

PC-3 Hücre Hattı		DU-145 Hücre Hattı	
Rutin konsantrasyonu	Rutin+TRAIL konsantrasyonu	Rutin konsantrasyonu	Rutin+TRAIL konsantrasyonu
1000 µM	1000 µM+ 20 ng/ml	1000 µM	1000 µM+ 20 ng/ml
750 µM	750 µM+ 20 ng/ml	750 µM	750 µM+ 20 ng/ml
500 µM	500 µM+ 20 ng/ml	500 µM	500 µM+ 20 ng/ml

Çizelge. 2.4. (Devam). PC-3 ve DU-145 hücre hatlarının her birine Rutin ve Rutin + TRAİL'in 96'lık plakta uygulama şeması.

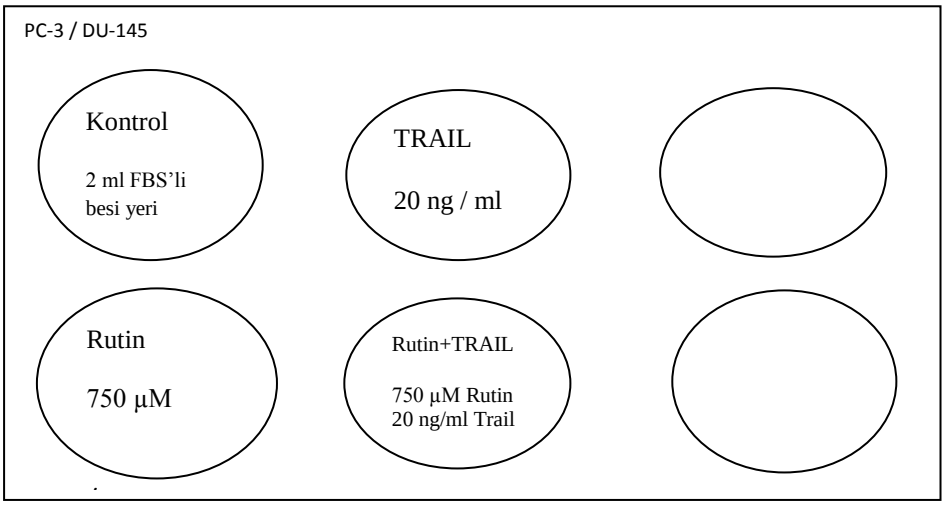
250 µM	250 µM+ 20 ng/ml	250 µM	250 µM+ 20 ng/ml
100 µM	100 µM+ 20 ng/ml	100 µM	100 µM+ 20 ng/ml
50 µM	50 µM+ 20 ng/ml	50 µM	50 µM+ 20 ng/ml
25 µM	25 µM+ 20 ng/ml	25 µM	25 µM+ 20 ng/ml
12,5 µM	12,5 µM+ 20 ng/ml	12,5 µM	12,5 µM+ 20 ng/ml
5 µM	5 µM+ 20 ng/ml	5 µM	5 µM+ 20 ng/ml
1 µM	1 µM+ 20 ng/ml	1 µM	1 µM+ 20 ng/ml
KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL
SDS	SDS	SDS	SDS

Uygulamadan sonraki 24. saatte ilgili plaklar etüvden çıkarılmış üzerindeki besiyerleri LDH ve glikoz ölçümleri için toplanmış, sonrasında ise her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri ve MTT (Sigma-Aldrich) solüsyonu karışımı eklenmiştir (90 µl besiyeri + 10 µl 5mg/ml MTT solüsyonu (0,025 g MTT + 5 ml PBS 10× (Lonza))) ve 4 saat 37 °C'de, %5 CO2'li etüvde bekletilmiştir. 4 saat sonunda Formazan kristallerinin çözülmesi amacıyla bütün kuyucuklara 100 µl çözücü solusyon (SDS) (Fisher) eklenmiş ve 12 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaktaki hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometre cihazında 570 nm'de yapılmıştır. Aynı protokol 48. saatte de uygulanmış ve absorbans verileri elde edilmiştir.

2.2.3. Wound Healing testi

Wound healing testi, hücre kültürlerinin üretme kaplarındaki yayılım ve etkileşim karakterlerini araştırmakta güçlü yöntemlerden biridir. Hücreler gerekli özellikteki flask ya da plaklarda konfluent seviyede üretilir, sonrasında ya büyüme bariyerinin çıkarılması ya da hücre katmanının çizilmesi yolu ile hücre alanında yara veya düz bir çizgi oluşturulur. 0. ve sonraki saatlerdeki fotoğraflar, ortama eklenen çeşitli maddelerin hücre göçünü önlemesi veya arttırması ile ilgili özelliklerini

belirlemede bilgi sağlamaktadır. Etkileri değerlendirmek için ölçülen parametreler, uygulama alanının ilk ve son durum evrelerinin gözlemlenmesi ve üreme hızı hesaplamalarıdır (Application Note 30, 2015). Stok olarak dondurulmuş hücre hatları uygun şartlarda çözdürülerek T25 cm^2'lik flasklara alınıp çoğaltılmışlardır. Yeterli oranda hücre ile kaplandıktan sonra tripsine edilip her hücre hattı için 2 adet T75 cm^2'lik hücre kültürü üretme kabına alınmışlardır. Flasklardaki hücreler uygun yoğunluğa ulaştıklarında, tekrar üzerilerindeki besi yerleri alınıp tripsin-EDTA eklenerek yüzeyden kaldırılmış ve santrifüj edildikten sonra 6 kuyucuklu plaklara alınıp üretilmişlerdir. Test için hücrelerin uygun konfluent oranına ulaşması amacıyla en az 24 saat beklenilmiştir. Hücreler kuyucukları yeterli oranda (1 kuyucuk için 3-7 × 10^5 hücre/ml) kapladıktan sonra 6 kuyucuklu plaklar %70 alkolle silinerek işlem sırası ile laminar akımlı kabine (Holten) alınmışlardır. 100 µl'lik steril bir pipet ucu steril bistüri ucu ile 45º lik eğimle çok kısa uzunlukta kesilmiştir. Hazırlanmış pipet ucunun zeminle yaklaşık 30º lik açı yapacağı şekilde tutulması ile kuyucuk alanlarına aşağıdan yukarıya doğru temas kesilmeden ve aşırı baskı uygulanmadan düz bir çizgi çizilmiştir. İşlemler tamamlandıktan sonra kuyucuklar 1 ml PBS 10× ile yıkanmıştır. Sonrasında çizelge 1.4. de belirtilen dozlar uygulanmıştır ve floresan mikroskopta (Leica) 0. saat ölçümleri yapılıp, plaklar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24. saate gelindiğinde LDH ve glikoz ölçümleri için besi yerleri toplanmış ve floresan mikroskopta 2. ölçümler yapılmıştır.



Şekil 2.1. 6 kuyucuklu plaklarda rutin, TRAIL ve rutin + TRAIL'in PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına uygulama şeması.

2.2.4. Trypan Blue Boyamasıyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücrelerle yapılan çalışmalarda hücre canlılığının belirlenmesi büyük önem taşır. Bu amaçla 'Trypan Blue' adı verilen bir boya kullanılmaktadır. Bu boya negatif yüklüdür. Eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girmez. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Trypan blue ile çalışırken, hücrelerin trypan blue boyasında belirtilen süreden daha uzun sürede kalmaması gerekmektedir. Aksi takdirde canlı hücreler de maviye boyanmaktadır (Freshney, 2000).

Wound healing testinde 24. saat ölçümleri yapılmış ve besi yerleri alınmış 6 kuyucuklu plaklara tripsin-EDTA eklenip eppendorf tüplere alınmışlardır. Santrifüj edilip süpernatantlar atıldıktan sonra peletler üzerine 200 µl PBS 10× eklenip pipetleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra bu karışımların her birine 50 µl filtreden geçirilmiş trypan blue solüsyonu (Fluka) eklenip tekrar pipetleme işlemi yapılmıştır. 5 dakika beklenmiştir. Eppendorf tüplerden 100 µl örnek (1-2 × 10^5 hücre / ml) alınıp Thoma lamına yerleştirilmiştir. Kare alanda bulunan ilk 100 hücre, 10× objektifte, boya alıp almama durumuna göre sayılmıştır.

Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

Canlı hücre oranı (%) = Boya almamış hücrelerin sayısı/ Toplam hücre sayısı x 100

2.2.5. İstatistik Analiz

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce normallik yönünden parametrik test varsayımlarından Shapiro Wilk ile varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Değişkenler arası farklılığın

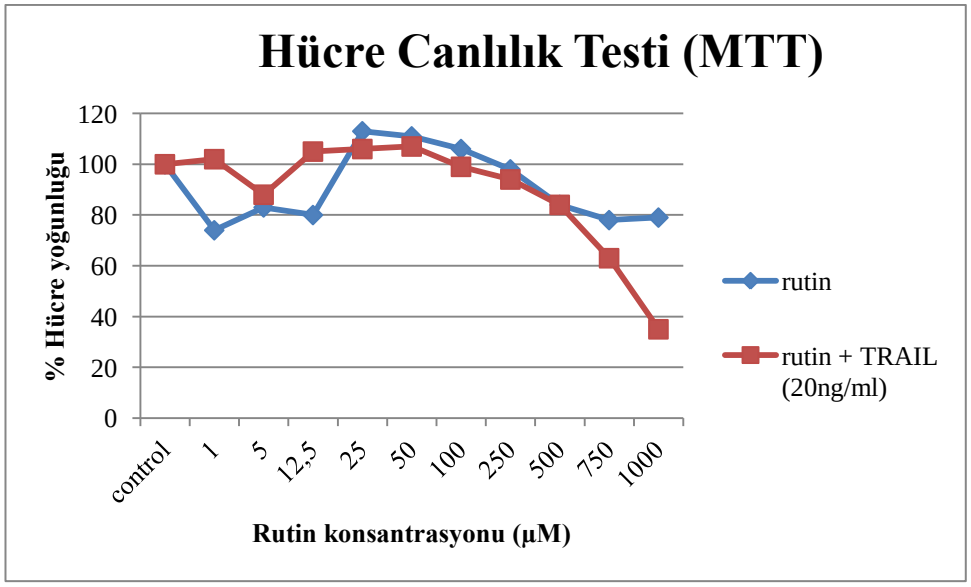
istatiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Dunnett testi'nden yararlanıldı (Eymen, 2007). Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 14.01 paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları

3.1.1. Rutin ve Rutin ile TRAIL'in birlikte uygulamalarının PC-3 hücre canlılığı üzerine etkisi

Deneylerde 0, 1, 5, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM rutin ve aynı konsantrasyonlarda rutin ile birlikte 20 ng/ml TRAIL uygulanmış ve 24,48 saat inkubasyona bırakılan PC-3 hücrelerinin canlılık değişimi MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Kontrol (0 µM) örneğin canlılığı tüm zaman aralıkları için %100 kabul edilmiş ve diğer örneklere ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Çizelge 3.1.' deki verilere göre artan rutin ve rutin+TRAIL dozlarında canlılık oranları şekil 3.1.'de yer alan grafikte gösterilmiştir.

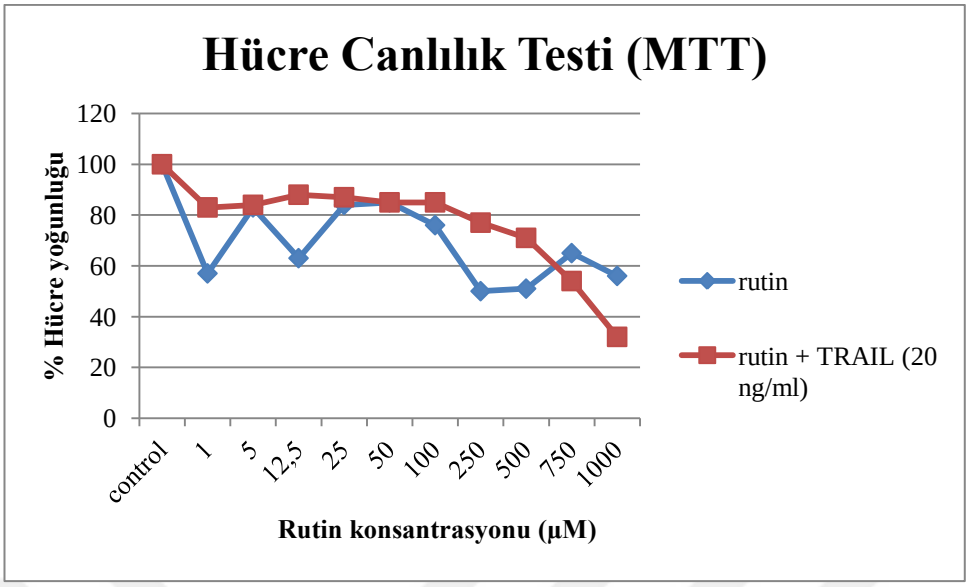


Şekil 3.1. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan PC-3 hücrelerinde yüzde canlılık oranları (24 saat inkubasyon)

Çizelge 3.1. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan PC-3 hücrelerinde artan dozlara göre yüzde canlılık verileri.

	Rutin konsantrasyonu (µM)	0	1	5	12,5	25	50	100	250	500	750	1000
24 saat inkübasyon	% canlılık Rutin	100	74	83	80	113	111	106	98	84	78	79
	Standart hata	3,75	3,02	7,18	7,74	12,72	8,78	3,81	4,69	7,25	4,03	6,60
	% canlılık Rutin+TRAIL (20ng/ml)	100	102	88	105	106	107	99	94	84	63	35
	Standart hata	1,05	1,35	3,47 *	3,59	2,35	4,55	2,56	3,55	2,24 *	3,13 *	2,03 *
48 saat inkübasyon	Rutin konsantrasyonu (µM)	0	1	5	12,5	25	50	100	250	500	750	1000
	% canlılık Rutin	100	57	83	63	84	85	76	50	51	65	56
	Standart hata	0,83 *	3,49 *	4,55 *	2,05 *	3,91 *	2,89 *	4,53 *	3,02 *	1,00 *	1,36 *	1,44 *
	% canlılık Rutin+TRAIL (20ng/ml)	100	83	84	88	87	85	85	77	71	54	32
	Standart hata	1,61 *	3,14 *	2,49 *	2,46 *	2,96 *	3,84 *	2,18 *	1,24 *	2,85 *	1,08 *	3,28 *

* $P < 0,05$



Şekil 3.2. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan PC-3 hücrelerinde yüzde canlılık oranları (48 saat inkubasyon)

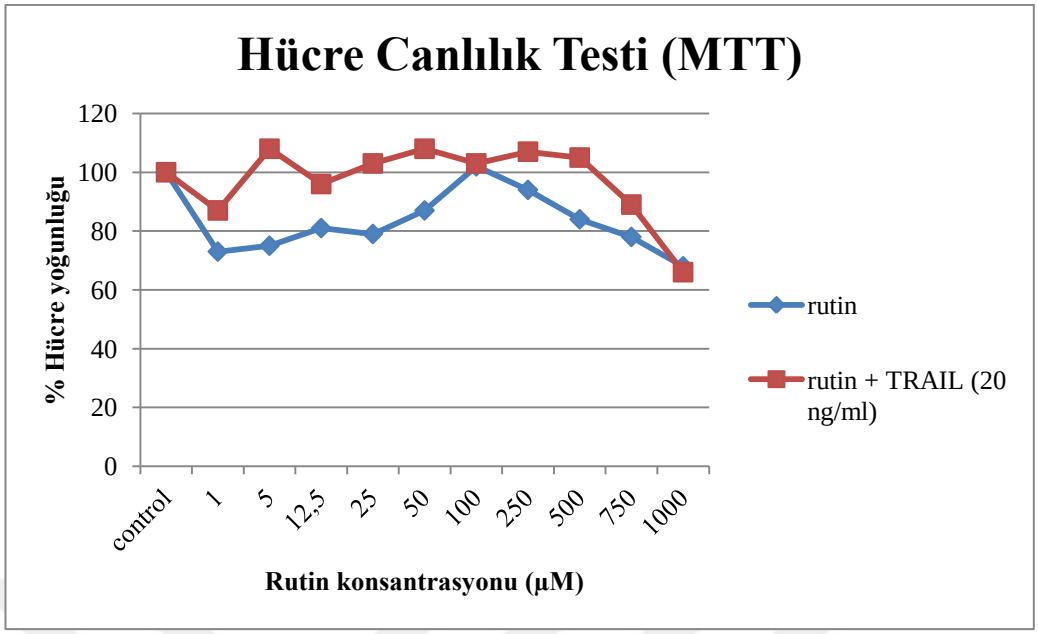
3.1.2. Rutin ve Rutin ile TRAIL'in birlikte uygulamalarının DU-145 hücre canlılığı üzerine etkisi

Kontrole (0 µM) göre 0, 1, 5, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM dozlarında rutin ve aynı dozlarda rutinle birlikte TRAIL(20 ng/ml) uygulanmış ve 24 ve 48 saatlik inkubasyon sonrası DU-145 hücre hattında MTT hücre canlılık testi yapılmıştır. Rutin ve Rutin+TRAIL'in 24 ve 48 saatlik inkubasyon sonucunda DU-145 hücre hatlarındaki hücre canlılığı değişim oranları çizelge 3.2.'de yer alan verilere göre şekil 3.3. ve şekil 3.4. 'de gösterilmiştir.

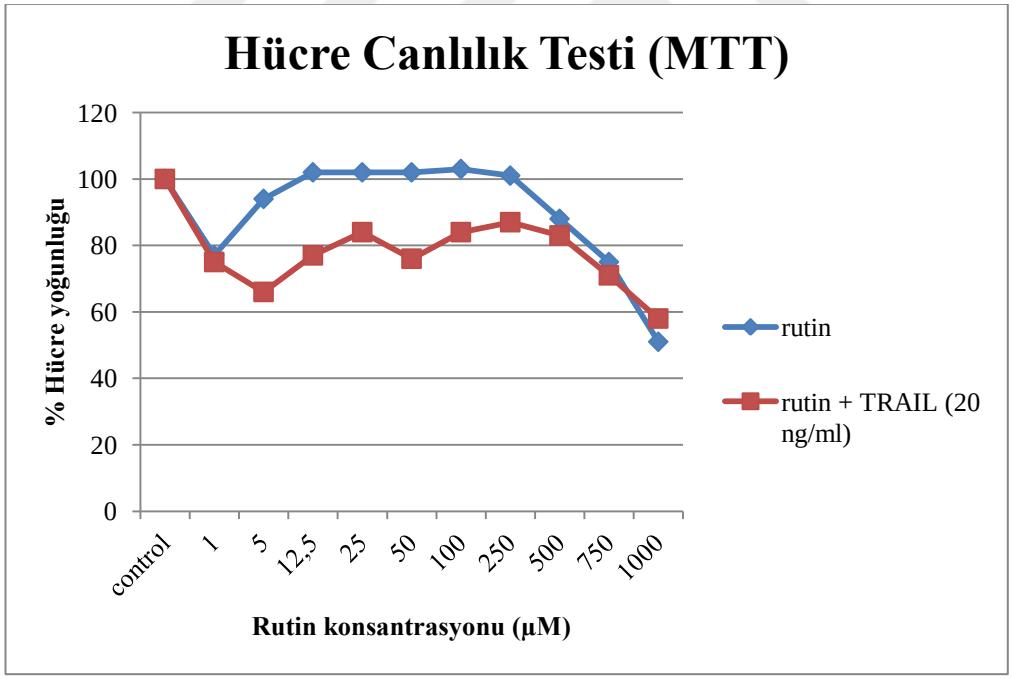
Çizelge 3.2. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan DU-145 hücrelerinde artan dozlara göre yüzde canlılık verileri.

	Rutin konsantrasyonu (µM)	0	1	5	12,5	25	50	100	250	500	750	1000
24 saat inkübasyon	% canlılık Rutin	100	73	75	81	79	87	102	94	84	78	68
	Standart hata	0,88	3,37 *	7,18 *	7,74	12,72	8,78	3,81	4,69	7,25	4,03 *	6,60 *
	% canlılık Rutin+TRAIL (20ng/ml)	100	87	108	96	103	108	103	107	105	89	66
	Standart hata	2,84	25,99	3,66	2,41	5,07	8,28	3,25	4,37	4,78	1,18	2,57
48 saat inkübasyon	Rutin konsantrasyonu (µM)	0	1	5	12,5	25	50	100	250	500	750	1000
	% canlılık Rutin	100	77	94	102	102	102	103	101	88	75	51
	Standart hata	0,85	6,81 *	6,38	2,20	3,18	3,14	4,54	1,01	3,02	9,72 *	6,02 *
	% canlılık Rutin+TRAIL (20ng/ml)	100	75	66	77	84	76	84	87	83	71	58
	Standart hata	0,90 *	7,51 *	2,99 *	6,47 *	3,23 *	1,20 *	3,13 *	0,95	3,26 *	2,28 *	1,27 *

* $P < 0,05$



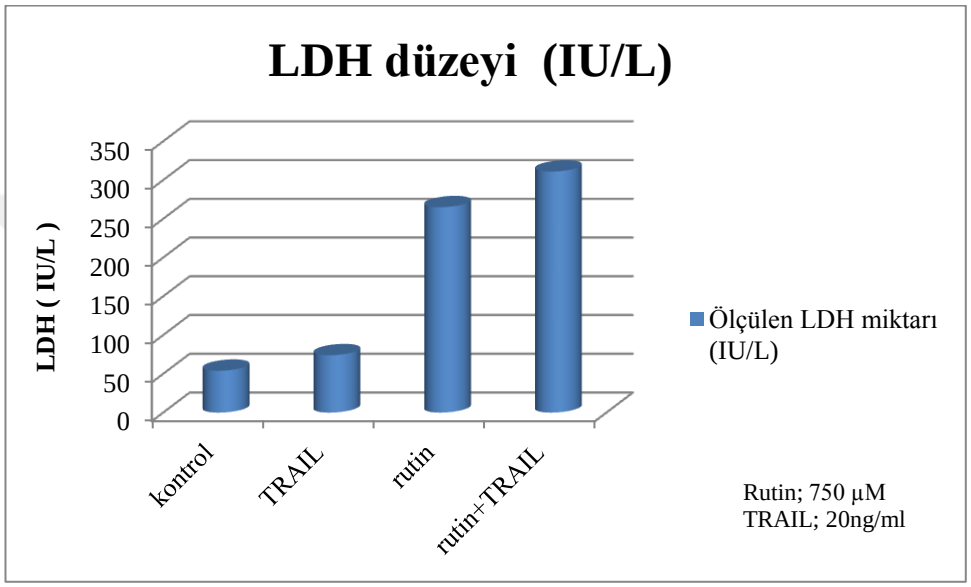
Şekil 3.3. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan DU-145 hücrelerinde yüzde canlılık oranları (24 saat inkubasyon)



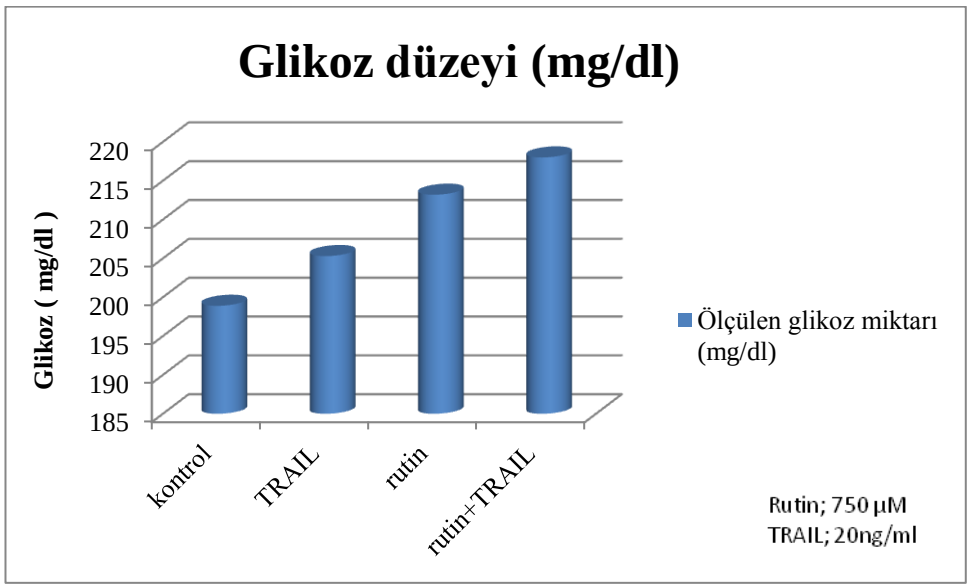
Şekil 3.4. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan DU-145 hücrelerinde yüzde canlılık oranları (48 saat inkubasyon)

3.2. LDH ve Glikoz Düzeyleri

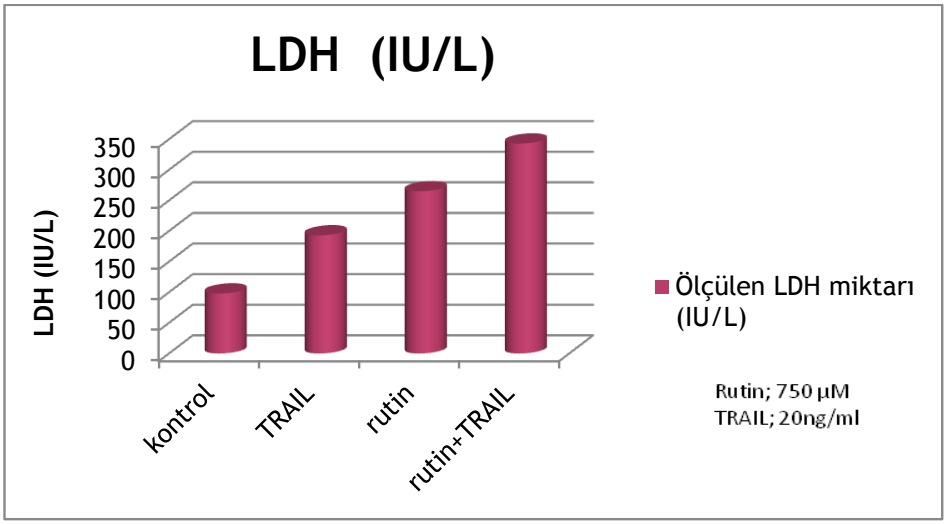
Deneyler sonrası toplanan besi yerlerindeki LDH ve glikoz düzeyleri; spektrofotometrik yöntemle otoanalizörde belirlenmiş ve şekil 3.5., 3.6., 3.7. ve 3.8.' de bulunan grafiklerde gösterilmiştir.



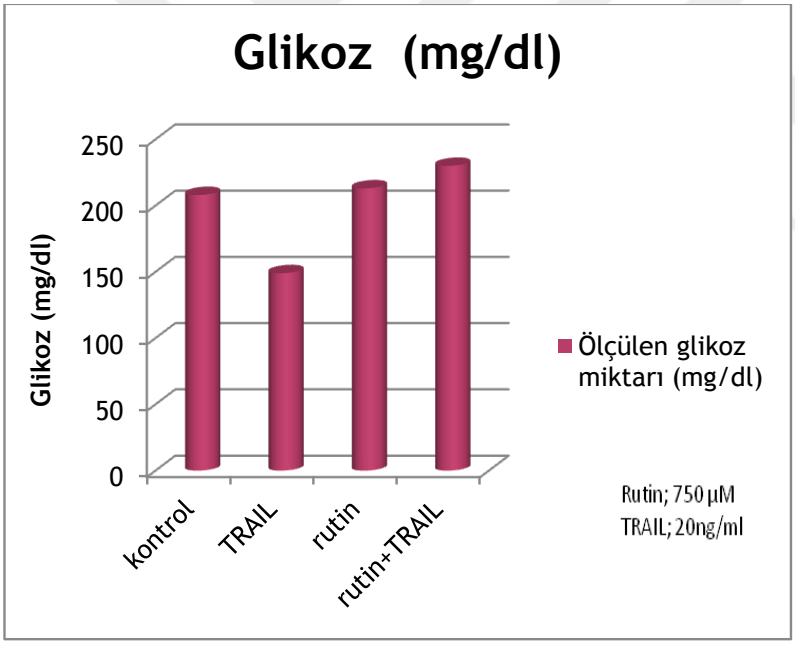
Şekil 3.5. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan DU-145 hücre hattı besi yerlerinde ölçülen LDH düzeyleri (24 saat inkubasyon).



Şekil 3.6. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan DU-145 hücre hattı besi yerlerinde ölçülen glikoz düzeyleri (24 saat inkubasyon).



Şekil 3.7. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan PC-3 hücre hattı besi yerlerinde ölçülen LDH düzeyleri (24 saat inkubasyon).

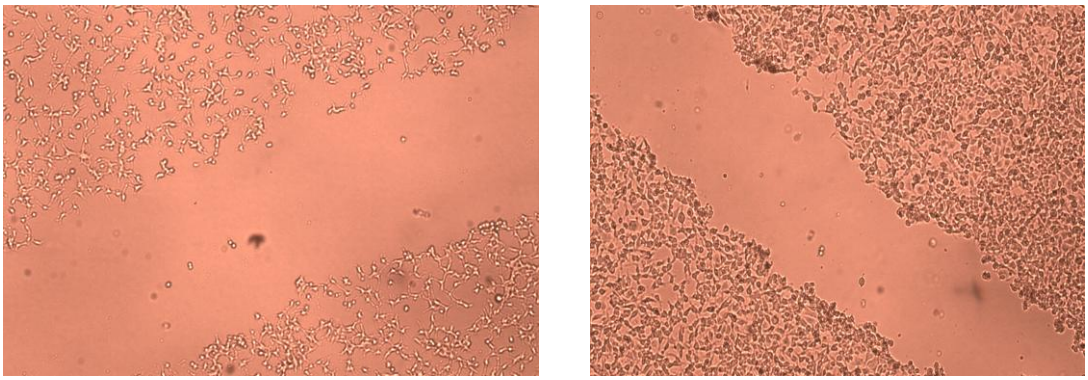


Şekil 3.8. Rutin ve Rutin+TRAIL uygulanan PC-3 hücre hattı besi yerlerinde ölçülen glikoz düzeyleri (24 saat inkubasyon).

3.3. Wound Healing testi sonuçları

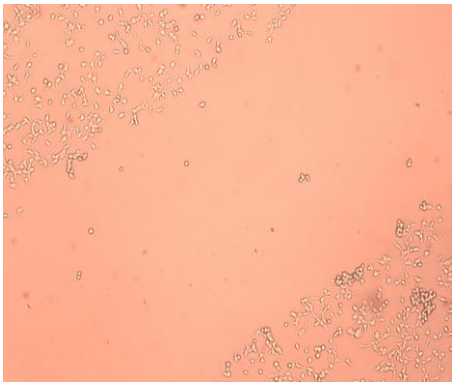
DU-145 ve PC-3 hücrelerini üretildiği 6 kuyucuklu plaklara rutin (750 µM), TRAIL (20 ng/ml) ve rutin+TRAIL kombinasyonu uygulanmış, uygulamalar sonrası 0. ve 24. saat için çizilmiş alanların en uzunluğu (µm) ölçülmüş ve şekil 3.9. – 3.18.' de yer alan fotoğrafları çekilmiştir. Hücrelerin çizilmiş alanları % yüzde kapatma oranları ölçülen ilk ve son en uzunluklarının (µm) farkına göre (DU-145 için sırasıyla; kontrol, TRAIL, rutin ve rutin+TRAIL: 565 µm, 427 µm, 159 µm, -20 µm ve PC-3 için sırasıyla; kontrol, TRAIL, rutin ve rutin+TRAIL: 548 µm , 447 µm , -3 µm, -547 µm) ve kontroldeki uzunluk farkı %100 kabul edilerek şekil 3.19. ve 3.20.'de gösterilmiştir.

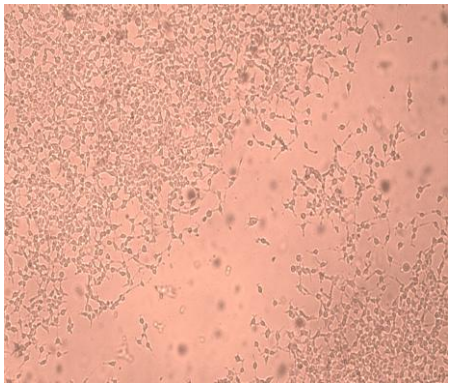
Her iki hücre hattının kontrol kuyucuğundaki çizilmiş alanda 24 saatte tamamen kapanma görülürken, sırasıyla TRAIL, rutin ve rutin+TRAIL için bu oranın azaldığı görülmüştür. TRAIL uygulanan kuyucuklarda her iki hücre hattı için de birbirine yakın oranlarda kapanma olduğu görülmüştür.



*DU-145 * PC-3

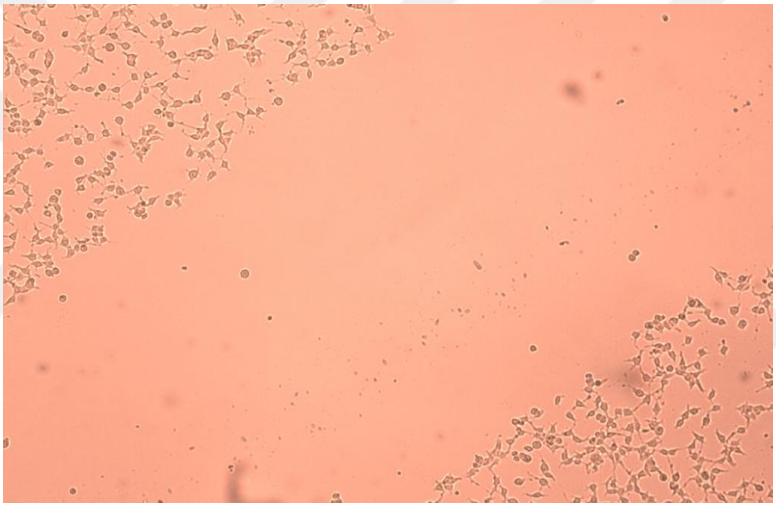
Şekil 3.9. Belirtilen her iki hücre hattının çizilmiş 0. saat kontrol (0 µM) kuyucuğu.



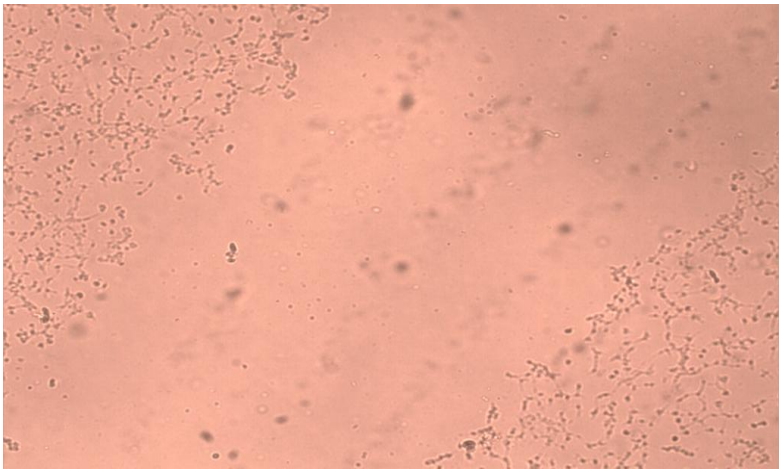


*0.saat * 24. Saat

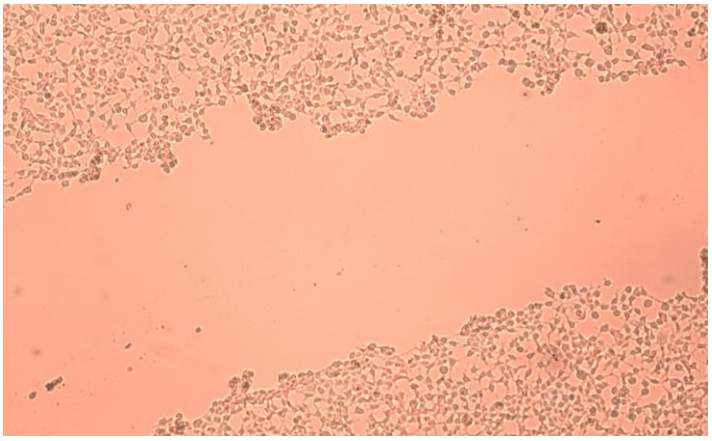
Şekil 3.10. TRAIL (20 ng/ ml) uygulanan çizilmiş DU-145 hücre kuyucukları.



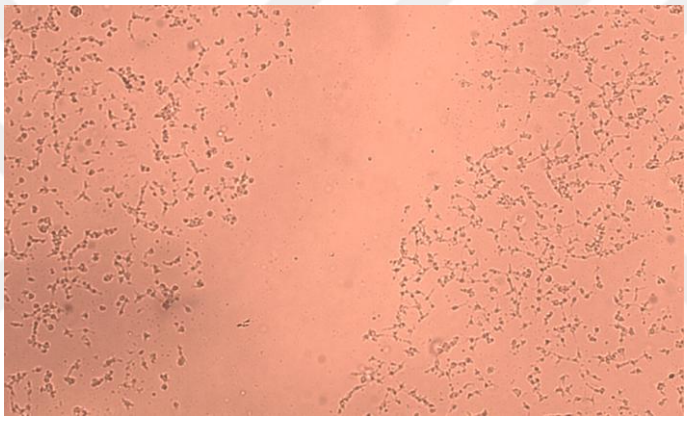
Şekil 3.11. Rutin (750 µM) uygulanan çizilmiş 0. saat DU-145 hücre kuyucuğu.



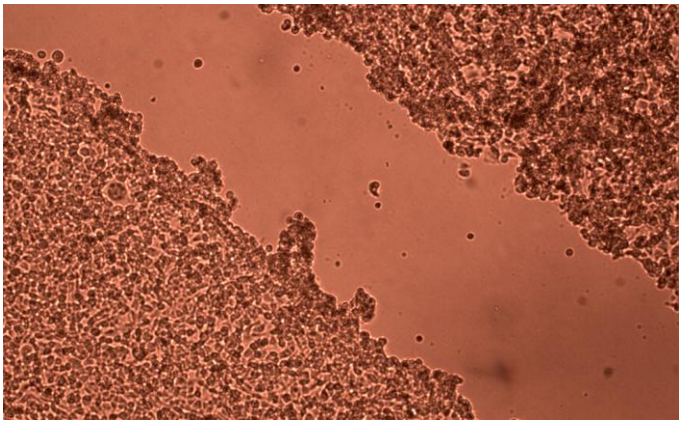
Şekil 3.12. Rutin (750 µM) uygulanan çizilmiş 24. saat DU-145 hücre kuyucuğu.



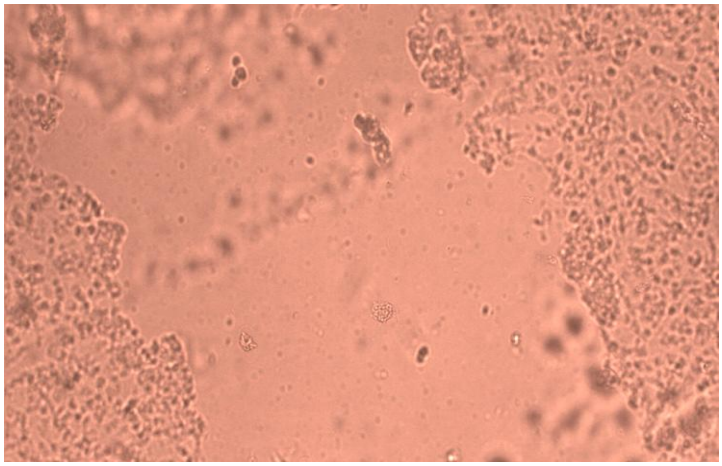
Şekil 3.13. Rutin (750 µM)+TRAIL (20 ng/ml) uygulanan çizilmiş 0. saat DU-145 hücre kuyucuğu.



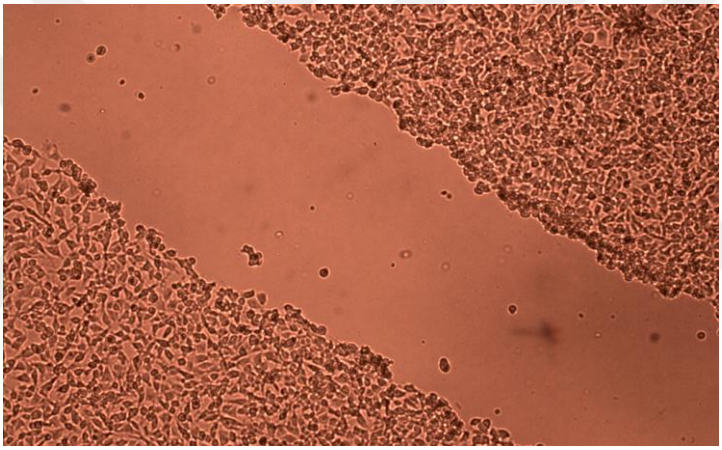
Şekil 3.14. Rutin (750 µM)+TRAIL (20 ng/ml) uygulanan çizilmiş 24. saat DU-145 hücre kuyucuğu.



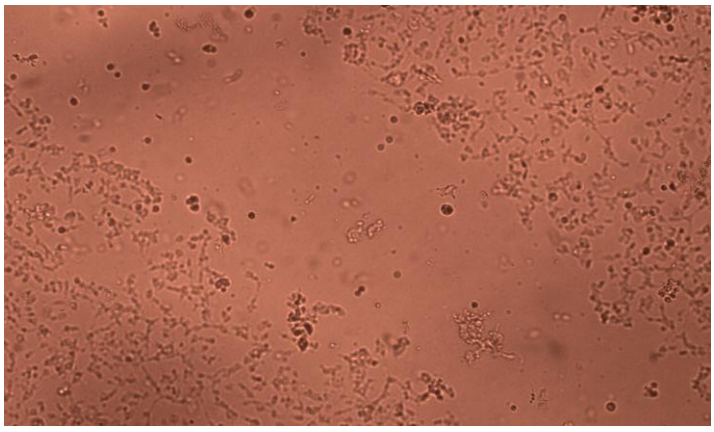
Şekil 3.15. Rutin (750 µM) uygulanan çizilmiş 0. saat PC-3 hücre kuyucuğu.



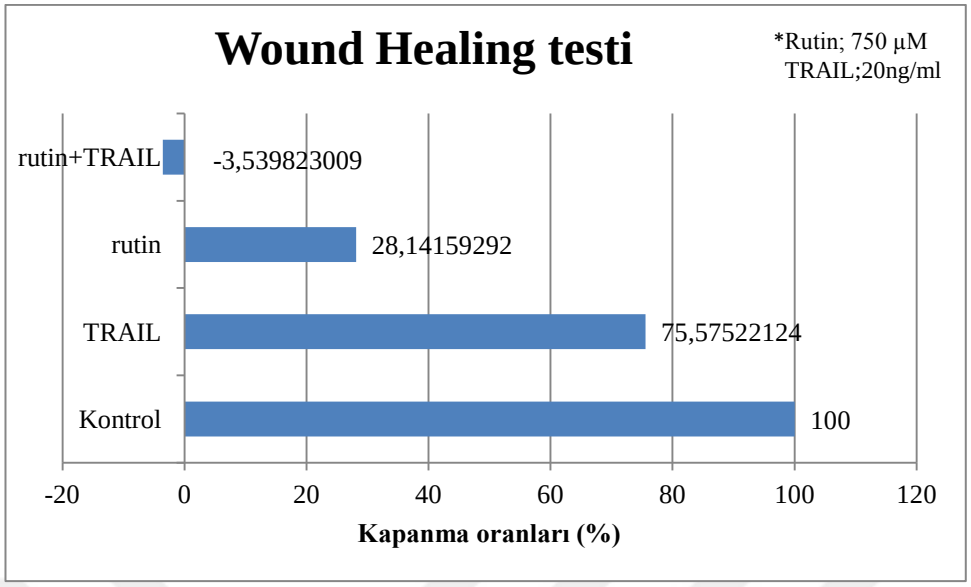
Şekil 3.16. Rutin (750 µM) uygulanan çizilmiş 24. saat PC-3 hücre kuyucuğu.



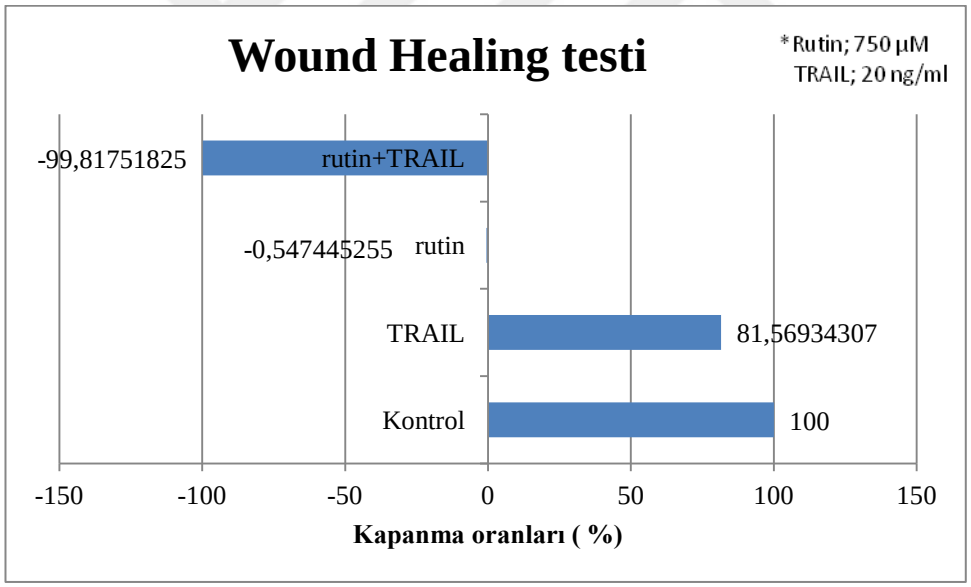
Şekil 3.17. Rutin (750 µM)+TRAIL (20 ng/ml) uygulanan çizilmiş 0. saat PC-3 hücre kuyucuğu.



Şekil 3.18. Rutin (750 µM)+TRAIL (20 ng/ml) uygulanan çizilmiş 24. saat PC-3 hücre kuyucuğu.

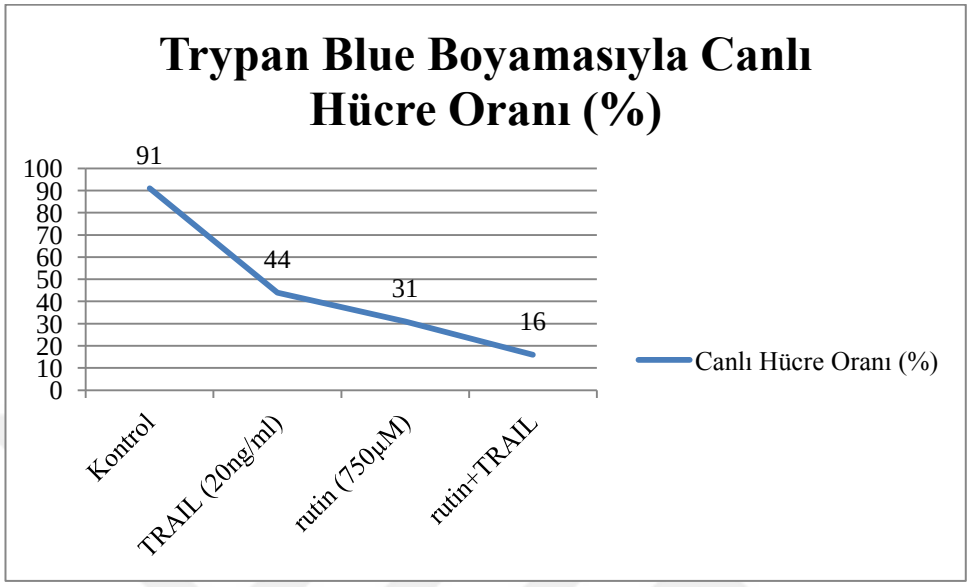


Şekil 3.19. DU-145 hücrelerinde 0. ve 24. saatte ölçülen uzunlukların (µm) farkına göre çizilmiş alanların kapanma oranlarının %yüzde değerleri.

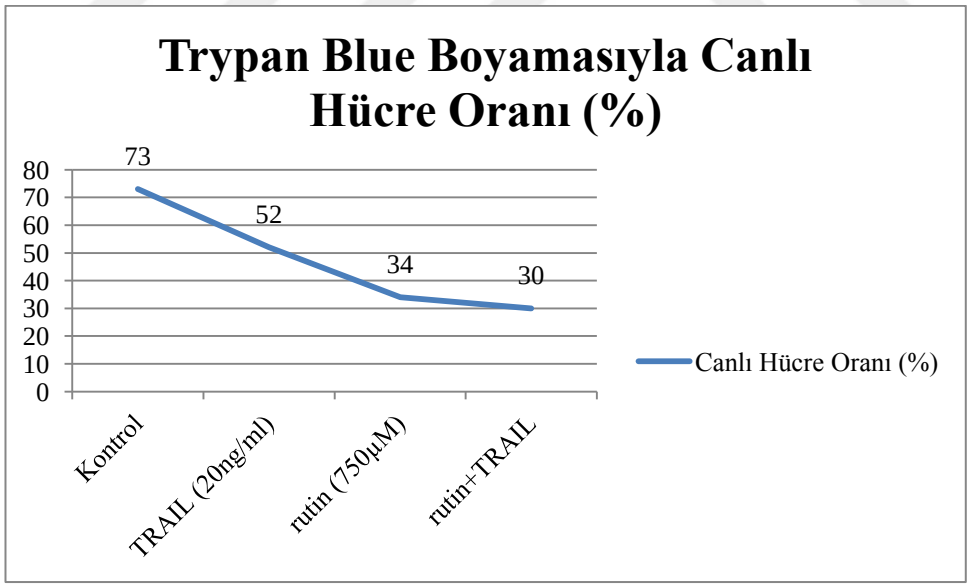


Şekil 3.20. PC-3 hücrelerinde 0. ve 24. saatte ölçülen uzunlukların (µm) farkına göre çizilmiş alanların kapanma oranlarının %yüzde değerleri.

3.4. Trypan Blue Boyamasıyla Belirlenen Hücre Canlılığı Oranları



Şekil 3.21. 24 saat inkübe edilmiş PC-3 hücrelerinde canlı hücrelerin % yüzde değerleri.



Şekil 3.22. 24 saat inkübe edilmiş DU-145 hücrelerinde canlı hücrelerin % yüzde değerleri.

24 saatlik inkubasyon sonrası hücreler doz gruplarına göre 6 kuyucuklu plaklardan toplanmış, boya alıp almama durumuna bakılarak hücre sayımı yapılmış,

canlı hücre oranı (%) formülüne göre canlı hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 3.21. ve 3.22.'de gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Doğal bitki ekstraktları ve flavonoidleri hem in vivo hem de in vitro ortamda antikanser özelliklerini göstermektedir. Antikanser aktivitelerindeki mekanizmalarının sınıflandırılmasının yanı sıra biyoaktif bileşenlerinin keşfi çok önemlidir.

Kanser hücre sinyal yollarının birden fazla değişime uğramasından ötürü genetik bir geçmiş barındırabilen heterojen bir hastalıktır. Alışılagelmiş kemoterapinin sağlıklı hücrelerin kötü etkilenmesinde ve kanser hücrelerindeki kademeli ilaç direncinde etkili olduğu çoğu kez düşünülmektedir. Medikal bitkiler, sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkiye sebep olmaksızın kanser hücrelerinde büyümeyi durdurması ve / veya apoptozu oluşturması yeteneğine dayanarak kanser tedavisinde potansiyel yeni bir kaynak olarak incelenmektedir (Shahneh ve ark., 2014).

Yapılan son çalışmalarda kanserin, hücre döngüsü denetim merkezlerindeki etkisizlikten ötürü hücre döngüsünün bir hastalığı olabileceği ortaya konmaktadır. Böylece kanser hücrelerinin siklusunun durdurulması kanser tedavisinde hedef mekanizmalardan biri olarak görülmektedir (Diaz-Moralli ve ark., 2013).

Güncel olarak birçok antihormonal ajan prostat kanseri tedavisi için kullanılmaktadır ki bunların arasına antiandrojen nilutamide ve siproteron asetat girmektedir (Delaere ve Van Thilio, 1991) . Bu ilaçların birçok yan etkisi bulunduğu için birçok hasta bu tedavilere doğal alternatifler ya da doğal tamamlayıcılar bulma arayışı içindedirler. Flavonoidler gibi bitki kökenli ürünler ve bileşikler son zamanlarda oldukça dikkat çekmektedir. Son zamanlarda flavonoidler prostat kanserini önleme açısından da değerlendirilmektedir. Meyvelerde, sebzelerde, çayda

ve daha birçok bitkide bulunan bu bileşiklerin prostat hastalıklarının gelişimi ve tedavisi üzerindeki tam etkisi henüz netliğe kavuşmamıştır (Strom ve ark., 1999).

Prostat kanseri tipik olarak androjen hormona bağlı tümorlerin bir sınıfına dahildir. Klinik olarak östrojeni değiştirme tedavisi ve androjeni geri alma bu tömerlerin büyümesini azaltmak için etkili stratejiler olarak kullanılmaktadır. Androjen ablasyonu konvensiyonel kemopreventif stratejilere daha zayıf cevap veren androjene duyarsız tümörlerin gelişmesine yol açabilir (Klocker ve ark., 1999).

Prostat kanseri kemoterapisi sıklıkla dozu düşürülmesi gereken ve toksisiteyi de oluşturabilecek birden fazla ajan gerektirmekte ve sonrasında zayıf bir tedavi ile sonuçlanabilmektedir (Rongrong ve ark., 2013). Çalışmamızda prostat kanseri tedavisinde fitopreventif yaklaşımı desteklemek için rutinin de uygun bir potansiyele sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Konvensiyonel kanser tedavilerindeki gelişmelere rağmen, USA'da her yıl 29,000 hasta kanserden ölmektedir. Bu hastalığın iyileştirici tedavisi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Moleküler teknoloji tekniklerindeki gelişmeler ile birçok molekül kanserdeki hedef ve tedavi için kilit elemanlar olarak önerilmektedir. Bu moleküller arasında TRAIL, DR4 ve DR5 için reseptörler bulunmaktadır. Uyumlu TRAIL ligandı kullanan bu hedef moleküller için birçok grup seçilmektedir (Griffith ve ark., 2002; Arafat ve ark., 2003; Shankar ve ark., 2004).

Bahsedilen bir çok faktör ışığında ortaya çıkan durumlardan biri de, TRAIL'in aynı knaser türünün farklı hücre hatlarında farklı duyarlılıklar ortaya koymasıdır. Bu duruma, prostat kanser hücre hatlarından DU-145 ve PC-3, TRAIL'le ilişkili hücre ölümüne duyarlı iken, LNCaP hücreleri TRAIL tedavisine karşı dirençli oluşu örnek gösterilebilir (Munshi ve ark., 2001). Çalışmamızda bu durumun aksine DU-145 ve

PC-3 hücre hatlarında direnç gözlemlenmiştir. Bir diğer çalışmada TRAIL'in PC-3 hücrelerinde uygulanan kriyoterapinin etkisini artırarak hücre canlılığını inhibe ettiği görülürken DU-145 hücrelerinin PC-3 hücrelerine göre TRAIL' e karşı daha dirençli olduğu görülmüştür (Ismail ve ark., 2009). Başka bir çalışmada, in vitro sitotoksisite testi uygulanan DU-145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları , basit sellüler fonksiyonuları ve morfolojiyi etkileyen potansiyel toksik bileşikleri belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan Leea İndica'nın üç ekstraktı (metanol, etanol, su içeriği), normal hücrelerin büyümesinde her hangi bir etki göstermezken, bu iki hücre hattında in vitro büyümeyi inhibe edici etkiler göstermiştir. Sonuçlarda L. indica'nın metanol ekstratının hücre hatlarını önemli seviyede inhibe ettiği görülmüştür. Çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da IC50 değerlerine bakıldığında PC-3 hücre hattının daha duyarlı olduğu görülmüştür (Dalu ve ark., 2014). Benzer başka bir çalışmada da prostat kanserinin hormondan serbest iki hücre hattı (DU145 ve PC3) ve hormona bağımlı bir hücre hattındaki (LNCaP) proliferasyonu inceleyerek prostat kanseri için mümkün bir koruma mekanizmasını araştırmak adına argan yağından elde edilen polifenoller ve sterollerin etkisi değerlendirilmiştir. Bu deney sonucunda da PC3' ün diğer iki hücre hattına göre daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır. (Kampa ve ark., 2000; Yuan ve ark., 2005). Yaptığımız çalışmalardan MTT hücre canlılık testlerinde de, sadece rutin uygulamasında DU-145 hücre hattı daha duyarlı iken rutin+TRAIL uygulamasında PC-3 hücre hattının daha duyarlı olduğu bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada rutin, hem kanser hücrelerine (SW480) hem de non-tümörgenik hücrelere uygulanmış, sonuçlara bakıldığında kanser hücre hattında yüksek sitotoksik etki gösterirken non-tümörgenik hücreler üzerinde düşük sitotoksik etki yaptığı görülmüştür. Rutin aynı zamanda kolon kanser hücreleri gibi diğer birçok kanser hücre hattı için de sitotoksik etkisini göstermiştir **(**Alonso-Castro ve ark., 2013). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında da prostat kanseri hücre hatları da (PC-3 ve DU-145) rutinin sitotoksik etkisini doğrulamaktadır.

Kemoterapide kombine ilaç kullanımı ileri derece prostat kanserlerinde daha etkili tedavisi için giderek artan uygulamalar olarak dikkat çekmektedir. Rutinin aglikanı olan quersetin ve diğer ajanların kombine kullanımının sinerjistik etkisi, prostat kanserinin tedavisinde terapötik potansiyelleri keşfetmek adına araştırılmaktadır (Young, 2009). Önceki çalışmalarda, quersetin ve ribavirinin myeloma 8,226 hücre hattı ve ovaryum karsinom OVCAR-5 hücre hattı üzerinde kombine kullanımı sinerjik anti-proliferatif etki oluşturmuştur (Li ve ark., 1999). Başka bir çalışmada glioblastoma multiformenin tedavisinde, rutin TMZ ile kombine kullanıldığında TMZ'nin etkisini hem in vitro hem de in vivo olarak önemli seviyede artırdığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2017). Yaptığımız çalışmada da prostat kanser hücrelerine rutin ve TRAIL' ın kombine kullanımı ile rutin, prostat kanser hücrelerinin TRAIL ölüm reseptörlerine (DR4,DR5) karşı direncini bozarak kendi antiproliferatif etkisini arttırmıştır.

Yaptığımız çalışmada rutinin hücre canlılığını inhibe etme ve hücre göçü açısından antitümör potansiyeli incelenmiştir ve MTT hücre canlılık testlerinde, rutin ve rutin+TRAIL uygulamaları için hücre canlılığı üzerine hem bileşikler arasında hem de hücre hatları arasında farklı sonuçlar gözlemlenmiştir. TRAIL, rutinin tek başına kullanımına göre kombine kullanımıyla rutinin antiproliferatif etkisini arttırmıştır. Hücre hatları arasında rutin ve rutin+TRAIL uygulamasında PC-3 hücre hattının DU-145 hücre hattına göre daha duyarlı olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser tedavileri için şu anda kullanılan ilaçlara alternatif olarak daha yüksek ya da benzer etkili yeni antitümör ajanları bulunması oldukça arzu edilen bir durumdur. Kemoterapiye alternatif olabilecek ya da yan etkilerini azaltabilecek yeni etken maddeleri keşfetmek, tedavi çalışmalarının en önemli konusudur.

TRAIL' in doğal kaynaklı terapötik ajanlarla kombinasyonu, prostat kanseri tedavisindeki gelişmelere ışık tutabilecek potansiyele sahiptir. Akciğer ve prostat kanseri gibi şiddetli tümörler mevcut olarak cerrahi veya radyoterapi ile kontrol edilmekte ve sıklıkla adjuvan kemoterapiyle desteklenmektedir. Ne yazık ki, bu hastalık için mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır. İyi bir sonuç için kemoterapi ve radyoterapi oldukça yetersiz kalmaktadır. Cerrahi müdahalenin sonrasında sıklıkla nüksetmektedir. Bu sebeple kanser için farklı ve etkili başka tedavilere ciddi derecede ihtiyaç vardır. Kanserin geliştiği epitelyal hücrelerin tedavisinde TRAIL, alışılmış kemoterapötik ilaçların antitümör potansiyelini artırabildiği gibi, son çalışmalarda gen tedavisinde de potansiyel bir kullanım alanı sunduğu görülmüştür. Çalışmamızda da TRAIL'in rutin ile kombine kullanımında, sahip oldukları sinerjik etkiyle tedavilere yeni bir bakış açısı yerleştirmek için oldukça uygun bir potansiyele sahip oldukları görülmüştür.

Çalışmamızda rutinin prostat kanser hücrelerinde TRAIL'in etkisini etkili biçimde artırdığı gözlemlenmiştir. TRAIL'ın tek başına uygulanmasına göre Rutin ve rutin+TRAIL'in kombine kullanımının prostat kanser hücrelerinin büyümesinde inhibe edici bir etki oluşturduğu görülmüştür. PC-3 hücrelerinin rutin ve TRAIL uygulamalarında daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Yine PC-3 hücrelerinde rutin+TRAIL kombinasyonu sinerjik etki göstermiştir. Birlikte uygulamalarının rutin ya da TRAIL' in tek başına kullanımına göre hücre canlılığını daha fazla azalttığı

görülmüştür. Rutinin ve TRAIL'in potansiyel aktivitelerini daha ayrıntılı incelemek adına moleküler düzeyde çalışmalara devam edilmelidir.

ÖZET

Prostat Kanser Hücrelerinde TRAIL ve Rutinin Hücre Canlılığına Etkileri

Rutin bir glikozid flavonoiddir , antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinmektedir. Apoptozla ilişkili tümör nekroz faktör indükleyici ligand (TRAIL) tümör hücrelerinde apoptozu uyarır ve normal hücreler üzerinde önemli bir toksik etkisi yoktur. TRAIL umut vadeden antikanserojen bir ajan olmasına rağmen TRAIL direnci, etkin bir kanser tedavisi için büyük bir engel oluşturmaktadır. Bu çalışma, prostat kanser hücrelerinde rutin ve TRAIL'in kombine kullanımının yararını incelemek için yapılmıştır.

Deneylerde , PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücrelerine rutin (1-1000uM) ve/veya TRAIL (20ng/ml) uygulanmış, hücre canlılığı ve göçü incelenmiştir. Hücre canlılığı trypan blue sayımı ve MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Hücre göçü wound healing testiyle belirlenmiştir. Ayrıca besi yerinin laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri hücre canlılığının biyokimyasal markerları olarak belirlenmiştir. Prostat kanser hücrelerine 24 ve 48 saatlik inkübasyonda rutin uygulanmış ve 24 saatlik inkübasyon için PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücrelerinin IC_{50} dozu 750 μM konsantrasyon üzerinde görülmüştür. Rutin+TRAIL ile yapılan uygulamada PC-3 hücreleri DU-145 hücrelerinden daha duyarlıdır. Rutin ve rutin+TRAIL doza bağlı şekilde prostat kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir. TRAIL' le yapılan uygulamada PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücrelerinin büyümesinde inhibe edici etki yoktur. Rutin ve TRAIL kombinasyonu PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücreleri üzerinde sinerjistik antitümor etkiyi ortaya çıkarmıştır. Kontrol ve TRAIL gruplarına göre LDH aktivitelerinin rutin ve rutin+TRAIL uygulama gruplarında önemli bir artışı vardır.

Mevcut veri, rutinin prostat kanser hücrelerinde TRAIL'in etkisini etkili biçimde artırdığını göstermektedir. Rutin ve rutin+TRAIL'in kombine kullanımı prostat kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe edilmesinde TRAIL'ın tek başına uygulanmasından daha etkili olmuştur. Fakat, bulgularımızı desteklemek için moleküler düzeyde ek çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antitümör aktivite, DU-145 ve PC-3 hücre hattı, Prostat kanser, Rutin, TRAIL.

SUMMARY

Effect of TRAIL and Rutin on Cell Viability in Prostate Cancer Cells

Rutin is a glycosided flavonoid and known to have antioxidant and anti-inflammatory properties. Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces the apoptosis of tumor cells and has no significant toxic effect on normal cells. Although TRAIL is a promising anticancer agent, TRAIL resistance is a major barrier to effective cancer therapy. This study was conducted to examine the utility of the combined use of rutin and TRAIL in prostate cancer cells.

PC-3 and DU145 prostate cancer cells were treated with rutin (1-1000uM) and/or TRAIL (20 ng/ml), cell viability and migration were examined.Cell viability was determined by trypan blue exclusion and MTT assay. Cell migration was determined by wound healing assay. Furthermore, lactate dehydrogenases (LDH) levels of medium were determined as biochemical markers of cell viability. Prostate cancer cells were treated with rutin for 24 and 48 h incubation and IC_{50} doses for 24 h incubation were determined 750 μM. Treatment with rutin+TRAIL, PC-3 cells is more sensitive than DU145 cells. Rutin and rutin plus TRAIL inhibit prostate cancer cell growth in a dose-dependent manner. Treatment with TRAIL has no effect at inhibiting growth of PC-3 and DU145 prostate cancer cells. The combination of rutin and TRAIL elicit a synergistic antitumor effect on PC-3 and DU145 prostate cancer cells. There is a significant increased in rutin and rutin+TRAIL treatments group of LDH activities with respect to control and TRAIL group.

Present data show that rutin efficiently enhanced TRAIL effects in prostate cancer cells. Combined treatment with rutin and TRAIL is more effective than the individual treatments of TRAIL at inhibiting growth of prostate cancer cells. Howeves, further studies at molecular level are required to suppert our findings.

Key words: Antitumor activity, DU-145 ve PC-3 cell line, Prostate cancer, Rutin, TRAIL.

KAYNAKLAR

ABARIKWU SO, OTUECHERE CA, EKOR M, MONWUBA K, OSOBU D (2012). Rutin ameliorates cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. *Toxicol. In.,* **19 (2):** 207–214.

AGGARWAL BB (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood,* **119:** 651–665.

AKONDI BR, CHALLA SR, AKULA A (2011). Protective effects of rutin and naringin in testicular ischemia-reperfusion induced oxidative stress in rats. *J. Reprod. Infertility,* **12 (3):** 209–214.

ALONSO-CASTRO AJ, DOMI´NGUEZ F, GARCI´A-CARRANCA´ A (2013). Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Archives of Medical Research,* **44 (5):** 346–351.

APPLICATION NOTE 30 (2015). Data Analysis of Wound Healing Assays With Instructions for WimScratch. *İbidi GmbH,* **1.2:** 1-11.

ARAFAT WO, BUCHSBAUM DJ, GO´MEZ-NAVARRO J, TAWIL SA, OLSEN C, XIANG J, EL-AKAD H (2003). An adenovirus encoding proapoptotic bax synergistically radiosensitizes malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **55:** 1037–50.

ARAU´JO JR, GONC¸ALVES P, MARTEL F (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.,* **31 (2):** 77–87.

ARBOUR N, RASTIKERDAR E, MCCREA E, LAPIERRE Y, DORR J, BAR-OR A, ANTEL JP (2005). Upregulation of TRAIL expression on human T lymphocytes byinterferon beta and glatiramer acetate. *Mult. Scler*., **11 (6):** 652–657.

BALTACI S, ANAFARTA K, BEDÜK Y, ARIKAN N (2007). Temel Üroloji, Ed.: Baltacı, S., Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara. 740-766.

BORLEY N, FENELEY MR (2009). Prostate Cancer: Diagnosis and Staging. *Asian J Androl,* **11(1):** 74-80.

BOSTWICK DG (2003). Chapter 32, in Modern Surgical Pathology. *Surgical Pathology Of Prostate*, Ed.: Widner, N., Cote, R.J., Suster, S., Elsevier Science, Philidelphia, 1 st ed. 1149- 1196.

BUCUR O, RAY S, BUCUR MC, ALMASAN A (2006). APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy. *Front Biosci*., **11:** 1549–1568.

BUTCHI AKONDI R, KUMAR P, ANNAPURNA A, PUJARI M (2011). Protective effect of rutin and naringin on sperm quality in streptozotocin (STZ) induced type 1 diabetic rats. *Iran J. Pharm. Res.*, **10 (3):** 585–596.

CAO G, SOfiC E, PRIOR RL (1997). Antioxidant And Prooxidant Behavıor Of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med*., **22(5):** 749-760.

CENTER MM, JEMAL A, LORTET-TIEULENT J, WARD E, FERLAY J, BRAWLEY O (2012). International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*, **61:** 1079-92.

CHA SS, KIM MS, CHOI YH, SUNG BJ, SHIN NK, SHIN HC, SUNG YC, OH BH (1999). A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity*, **11 (2):** 253–261.

CHAN JM, JOU RM, CARROLL PR (2004). The relative impact and future burden of prostate cancer in the United states. *J Urol* , **172:** 13-17.

CHAN JM, STAMPFER MJ, GIOVANNUCCI EL (1998). What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin Cancer Biol*, **8 (4):** 263-273.

CHEN CY, LI H, YUAN YN, DAI HQ, YANG B (2013). Antioxidant activity and components of a traditional Chinese medicine formula consisting of Crataegus pinnatifida and Salvia miltiorrhiza. *BMC Complement Altern. Med*., **13:** 99.

CHEN H, MIAO Q, GENG M, LIU J, HU Y, TIAN L, PAN J, YANG Y (2013). Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest andpromoting apoptosis. *Sci. World J.*, 269165.

CHIDAMBARA MKN, KIM J, VIKRAM A, PATIL B (2012). Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chemistry*, **132(1):** 27–34.

CIMINO S, SORTINO G, FAVILLA V, CASTELLI T, MADONIA M, SANSALONE S, RUSSO GI, MORGİA G (2012). Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. *Oxid Med Cell Longev Article,* **ID 632959,** 8.

CIRICO TL, OMAYE ST (2006). Additive or Synergetic Effects of Phenolic Compunds on Human Low Density Lipoprotein Oxidation. *Food and Chemical Toxicology,* **44:** 510-516.

COOPER GM, HAUSMAN RE (2006). Hücre Moleküler Yaklaşım. Ed.: Sakızlı Atabey, N., İzmir Tıp Kitabevi, İzmir. 591-632.

CRAGG GM, NEWMAN DJ (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, **100:** 72–9.

DALU D, DUGGIRALA S, AKARAPU S (2014). Anti-hyperglycemic and hypolipidemic activity of Leea indica. *Int J Bioassay*, **3:** 3155–9.

DELAERE KP, VAN THILIO EL (1991) Flutamide monotherapy as primary treatment in advanced prostatic carcinoma. *Semin Oncol*, **18:** 13– 8.

DEVLIN TM (2002). Textbook of Biochemistry, New York: Wiley- Liss.

DHANYA R, ARUN KB, SYAMA HP, NISHA A, SUNDARESAN A, SANTHOSH K, JAYAMURTHY A (2014). Rutin and quercetin enhance glucose uptake in L6 myotubes under oxidative stress induced by tertiary butyl hydrogen peroxide. *Food Chem*, **158:** 546–554.

DIAMANDIS EP, YOUSEF GM, LUO LY, MAGKLARA A, OBIEZU CV (2000). The new human kallikrein gene family: Implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, **11:** 54-60.

DIAZ-MORALLI S, TARRADO-CASTELLARNAU M, MIRANDA A, CASCANTE M (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharm. Therap*., **138:** 255–271.

ECSTEIN-FRAISSE E, SU Z (2014). Cabazitaxel-a next-generation taxane for the treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Gan To Kagaku Ryoho,* **41(7):** 817-822.

EHRLICH S, INFANTE-DUARTE C, SEEGER B, ZIPP F (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine*, **24 (6):** 244–253.

ELROD HA, SUN SY (2008). Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer Biol. Ther*., **7 (2):** 163–173.

EMERY JG, MCDONNELL P, BURKE MB, DEEN KC, LYN S, SILVERMAN C, DUL E, APPELBAUM ER, EICHMAN C, DIPRINZIO R, DODDS RA, JAMES IE, ROSENBERG M, LEE JC, YOUNG PR (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **273 (23):** 14363–14367.

EYMEN UE (2007). SPSS 15.0 Veri Analiz Yöntemleri. Ed.: EYMEN, UE., İstatistik Merkezi, Yayın no: 1.

FANG F, LI JM, PAN QH, HUANG WD (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chem.*, **101:** 428-433.

FERLAY J, SHIN H, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN D (2010). Cancer İncidence And Mortality Worldwide: IARC Cancerbase, GLOBOCAN v2.0, No. 10.

FINNBERG N, KLEIN-SZANTO AJ, EL-DEIRY WS (2008). TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J. Clin.Invest*., **118:** 111–123.

FLOREK E, IGNATOWICZ E, WRZOSEK J, PIEKOSZEWSKI W (2005). Effect of Rutin on Total Antioxidant status of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Pharmacological Reports*, **57**: 84-89.

FRESHNEY RI (2000). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 3rd edition, Wiley-Liss, New York.

GANTEN TM, KOSCHNY R, SYKORA J, SCHULZE-BERGKAMEN H, BUCHLER P, HAAS TL, SCHADER MB, UNTERGASSER A, STREMMEL W, WALCZAK H (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin. Cancer Res*. **12 (8):** 2640–2646.

GAO Z, XU H, CHEN X, CHEN H (2003). Antioxidant Status and Mineral Contents in Tissues of Rutin and Baicalin Fed Rats. *Life Sciences*, **73:** 1599-1607.

GAO Z, HUANG K, XU H (2002). Effects of Rutin Supplementation on Antioxidant Status and Iron, Copper and Zinc Contents in Mouse Liver and Brain. *Biological Trace Element Research*, **88:** 271-279.

GAO Z, XU H, CHEN X, CHEN H (2003). Antioxidant Status and Mineral Contents in Tissues of Rutin and Baicalin Fed Rats. *Life Sciences*, **73:** 1599-1607.

GEORGE VC, DELLAIRE G, VASANTHA RUPASINGHE HP (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **45 :** 1 – 14.

GONC¸ALVES CF, SANTOS MC, GINABREDA MG, FORTUNATO RS, CARVALHO DP, FREITAS FERREIRA AC (2013). Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. *PLoS One*, **8 (9):** 73908.

GONG G, QIN Y, HUANG W, ZHOU S, YANG X, LI D (2010) . Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **628 (1–3):** 27–35.

GREEN J, CLÉZARDIN P (2010). The molecular basis of bisphosphonate activity: a preclinical perspective. *Semin Oncol*, **37(Suppl 1):** 3-11.

GRIFfiTH TS, FIALKOV JM, SCOTT DL, AZUHATA T, WILLIAMS RD, WALL NR (2002). Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, **62:** 3093–9.

GUARDIA T, ROTELLI AE, JUAREZ AO, PELZER LE (2001). Anti-inflammatory Properties of Plant Flavonoids. Effects of Rutin, Quercetin and Hesperidin on Adjuvant Arthritis in Rat. *Il Farmaco*, **56:** 683-687.

HADASCHIK BA, GLEAVE ME (2007). Therapeutic options for hormone-refractory prostate cancer in 2007. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, **25:** 413- 419.

HAMBURGER AW, SALMON SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197:** 461–3.

HEIM KE, TAGLIAFERRO AR, BOBILYA DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, **13:** 572–584.

HELLERSTEDT BA, PIENTA KJ (2002). The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin.*, **52(3):** 154–179.

HERRMANN AP, JANKE HD (2001). Cofermentation of rutin and hesperidin during two-stage anaerobic pre-treatment of high-loaded brewery wastewater. *Water res.*, **35(11):** 2583 – 8.

ISMAIL M, MORGAN R, HARRINGTON K, DAVIES J, PANDHA H (2009). Enhancing prostate cancer cryotherapy using tumour necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sensitisation in an in vitro cryotherapy model. *Cryobiology*, **59:** 207–213.

JIN GP, CHEN QZ, DING YF, HE JB (2007). *Electrochim. Acta.,* **52:** 25-35.

KAMANGAR F, DORES GM, ANDERSON WF (2006). *J. Clin. Oncol*., **24:** 2137-2150 .

KAMEL R, MOSTAFA DM (2015) . Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.,* **153:** 59–66.

KAMPA M, HATZOGLOU A, NOTAS G, DAMIANAKI A, BAKOGEORGOU E, GEMETZI C (2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer*, **37:** 223–33.

KASAP M, PAZARBAŞI A, ALPTEKİN D (2010). Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Nobel Kitabevi, Adana. 151-421.

KLEIN EA (2006). *Ann. Rev. Med.* **57:** 49 – 63 .

KLOCKER H, CULIG Z, EDER IE, NESSLER-MENARDI C, HOBISCH A (1999). Mechanism of androgen receptor activation and possible implications for chemoprevention trials. *Eur Urol.,* **35:** 413–419.

KORKMAZ A, KOLANKAYA D (2010). Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *J. Surg. Res.,* **164:** 309–315.

KRAMMER PH (1999) . CD95 (Apo - 1 / Fas) – mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol,* **71:** 163 – 210.

KREFT I, FABJAN N, YASUMOTO K (2006). Rutin content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) food materials and products. *Food Chem.,* **98:** 508–512.

KUMAGAI J, FUJIMURA T, TAKAHASHI S, URANO T, OGUSHI T, HORIE - INOUE K, OUCHI Y, KITAMURA T, MURAMATSU M, BLUMBERG B,

INOUE S (2007). Cytochrome P450 2B6 is a growth - inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate*, **67 (10):** 1029 – 1037.

KYPRIANOU N, ISAACS JT (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*, **122(2):** 552- 562.

LI W, SHEN F, WEBER G (1999). *Oncol. Res.,* **11:** 243- 247 .

LIN JP, YANG JS, LIN JJ, LAI KC, LU HF, MA CY, SAI-CHUEN WU R, WU KC, CHUEH FS, GIBSON WOOD W, CHUNG JG (2012). Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ. Toxicol*., **27 (8):** 480–484.

MALHI H, GORES GJ (2007). TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? *Oncogene*, **25 (56):** 7333–7335.

MASCARAQUE C, LÓPEZ-POSADAS R, MONTE JM, OMERO-CALVO I, DADDAOUA A, GONZÁLEZ M, MARTÍNEZ-PLATA E, SUÁREZ MD, GONZÁLEZ R, MARÍN JJG, ZARZUELO A, MARTÍNEZ-AUGUSTİN O, MEDINA FS (2015). The small intestinal mucosa acts as a rutin reservoir to extend flavonoid anti-inflammatory activity in experimental ileitis and colitis. *J Funct Foods*, **13:** 117-420.

MELLIER G, HUANG S, SHENOY K, PERVAIZ S (2010). TRAILing death in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, **31:** 93–112.

MENON LG, KUTTAN R, KUTTAN G (1995). Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett*., **95:** 221–225.

MOGHADDASIAN B, ERADATMAND ASLI D, ALAGHEMAND A (2013). Diurnal change in rutin content in Capparis spinosa growing wild in Tafresh/Iran European. *EJEBAU*, **3(3):** 30-34.

MONTENEGRO MF, SÁNCHEZ-DEL-CAMPO L, FERNÁNDEZ-PÉREZ MP, SÁEZ-AYALA M, CABEZAS-HERRERA J, RODRÍGUEZ-LÓPEZ JN (2014). Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.605.

MOON YJ, WANG XD, MORRIS ME (2006). *Toxicol. Vitro*, **20:** 187 – 210 .

MOORTHY HK, VENUGOPAL P (2008). Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature. *Indian J Urol*., **24(3):** 295-302.

MORETTI E, MAZZI L, TERZUOLI G, BONECHI C, IACOPONI F, MARTINI S, ROSSI C, COLLODEL G (2012). Effect of quercetin, rutin,naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod. Toxicol*., **34 (4):** 651–657.

MUNSHI A, PAPPAS G, HONDA T, MCDONNELL TJ, YOUNES A, LI Y, MEYN RE (2001). TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2. *Oncogene*, **20:** 3757–3765.

PAN G, NI J, WEI YF, YU G, GENTZ R, DIXIT VM (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science 277*, **5327:** 815–818.

PANDEY G, MADHURI S (2006). Medicinal plants: better remedy for neoplasm. *Indian Drugs*, **43:** 869–74.

PARK SH, BOK SH, JEON SM, PARK YB, LEE SJ, JEONG TS, CHOI MS (2001). Effect of Rutin and Tannic Acid Supplements on Cholesterol Metabolism in Rats. *Nutrition Research*, **22:** 283-295.

PARKIN DM, BRAY F, DEVESA SS (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer,* **37 (8):** 4 – 66.

PARTIN AW, PIANTADOSI S, SUBONG EN, KELLY CA, HORTOPAN S, CHAN DW (1996). Clearance rate of serum- free and total PSA following radical prostatectomy. *Prostate Suppl*, **7:** 35-39.

PENNARUN B, MEIJER A, VRIES EG , KLEIBEUKER JH, KRUYT F, JONG S (2010). Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1805 (2):** 123-140.

PETER ME, KRAMMER PH (1998) . Mechanisms of CD95 (Apo - 1 / Fas) - mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* , **10:** 545 – 551.

PITTI RM, MARSTERS SA, RUPPERT S, DONAHUE CJ, MOORE A, ASHKENAZI A (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem*., **271 (22):** 12687–12690.

POH TW, HUANG S, HIRPARA JL, PERVAIZ S (2007). LY303511 amplifies TRAIL-induced apoptosis in tumor cells by enhancing DR5 oligomerization, DISC assembly, and mitochondrial permeabilization. *Cell Death Differ*, **14 (10):** 1813–1825.

PRASAD S, KIM JH, GUPTA SC, AGGARWAL BB (2014). Targeting death receptors for TRAIL by agents designed by Mother Nature. *Trends in Pharmacological Sciences*, **Vol. 35,** No. 10, 520-536.

PRSCOTT JL, BLOK L, TINDALL DJ (1998). Isolation and Androgen Regulation of Human Homeobox cDNA, NKX3.1. *Prostate,* **35(1):** 71 - 80.

RAO KVK, SCHWARTZ SA, NAIR HK, AALINKEEL R, MAHAJAN S,CHAWDA R (2004). Plant derived products as a source ofcellular growth inhibitory phytochemicals on PC-3M, DU-145and LNCaP prostate cancer cell lines. *Curr Sci*., **87:** 1585–8.

RAY S , BUCUR O, ALMASAN A (2005). Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis*, **10:** 1411–1418.

RITTMASTER RS (2008). 5a-reductase Inhibitors in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer Risk Reduction. *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism*, **22:** 389–402.

SCHILCHER H, PATZ B, SCHİMMEL KCH (2002). Klinische Studie mit einem Phytopharmakon zur Behandlung von Mikrozirkulationsstörungen. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren*, **31:** 819–826.

SECCHIERO P, ZERBINATI C, RIMONDI E, CORALLINI F, MILANI D, GRILL V, FORTI G, CAPITANI S, ZAULI G (2004). TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol. Life Sci*., **61 (15):** 1965–1974.

SHAHNEH FZ, BARADARAN B, MAJIDI J, BABALOO Z (2014). Echinophora platyloba DC (Apiaceae) crude extract induces apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells (PC-3). *Biomed. J.*, **37:** 298–304.

SHANKAR S, SINGH TR, SRIVASTAVA RK (2004). Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: intracellular mechanisms. *Prostate,* **61:** 35–49.

SINGH TR, SHANKAR S, CHEN X, ASIM M , SRIVASTAVA RK (2003). Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res.,* **63 (17):** 5390–5400.

SON YG, KIM EH, KIM JY, KIM SU, KWON TK, YOON AR, YUN CO, CHOI KS (2007). Silibinin sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis via DR5 up-regulation and down-regulation of c-FLIP and survivin. *Cancer Res*., **67 (17):** 8274–8284.

SONG K, BENHAGA N, ANDERSON RL, KHOSRAVI-FAR R (2006). Transduction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand into hematopoietic cells leads to inhibition of syngeneic tumor growth in vivo. *Cancer Res.,* **66 (12):** 6304–6311.

SRIVASTAVA RK (2001). TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and Clinical Applications in Cancer. *Neoplasia*, **Vol. 3**, No. 6, 535 – 546.

STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S, LIOTTA LA (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol*, **9:** 541-573.

STROM SS, YAMAMURA Y, DUPHORNE CM, SPITZ MR, BABAIAN RJ, PILLOW PC (1999). Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutr Cancer*, **33:** 20–5.

SZLISZKA E, KROL W (2011). Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* ; doi: 10.1155/2013/731940.

TEKTEMUR A (2015). İnsan Prostat Kanser Pc-3 Hücre Hattında Trpm2 İyon Kanalının Otofajik Yolaklardaki Rolünün Araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.

TENNISWOOD M, LEE CY (2004). On TRAIL of cell death pathways in prostate cancer. *Cancer Biol. Therapy,* **3:** 769–771.

TERZİOĞLU G, KESKİN AÜ, YANIKKAYA DEMİREL G (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turk J Immunol.*, **3:** 74-89.

TEZEL G, TEZEL E (2005). Nöroendokrin- dışı tümörlerde nöroendokrin diferansiasyon ve nöroendokrin diferansiasyonun moleküler biyolojisi. Derleme. *Hacettepe Tıp Dergisi,* **36:** 19- 2.

TİLKİ DT (2007). Rutin'in Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Fitonutrient Tabletlerinde Miktar Tayini. ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

VOLATE SR, DAVENPORT DM, MUGA SJ, WARGOVİCH MJ (2005). Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis*, **26 (8):** 1450–1456.

WALCZAK H, MILLER RE, ARIAIL K, GLINIAK B, GRIFfiTH TS, KUBIN M, CHIN W, JONES J, WOODWARD A, LE T, SMITH C, SMOLAK P, GOODWIN RG, RAUCH CT, SCHUH JC, LYNCH DH (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med*., **5 (2):** 157–163.

WILEY SR, SCHOOLEY K, SMOLAK PJ, DIN WS, HUANG CP, NICHOLL JK, SUTHERLAND GR, SMITH TD, RAUCH C, SMITH CA (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity***, 3 (6):** 673–682.

XU R, ZHANG Y, YE X, XUE S, SHI J, PAN J, CHEN Q (2013). Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancerbcell line PC-3 in vitro. *Food Chemistry*, **138:** 48–53.

YOLAA ML, ATARB N (2014). A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. *Electrochimica Acta*., **119:** 24-31.

YOUNG CYF (2009). Use of Quercetin in Prostate Cancer Cell. *Elsevier*, **No: 88:** 879-888.

YUAN H, GONG A, YOUNG CY (2005). Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, **26:** 793–801.

YÜCE B (2006). Hesperidin, Rutin Ve 7,8-Dihidroksi-3-(4-Metilfenil) Kumarin Bileşiklerinin Lipit Düşürücü Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi.

ZAULI G, SANCILIO S, CATALDI A, SABATINI N, BOSCO D, DI PIETRO R (2005). PI-3K/Akt and NF-kappaB/IkappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment. *J. Cell Physiol*., **202 (3):** 900–911.

ZHANG L, FANG B (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther*., **12 (3):** 228–237.

ZHANG P, SUN S, LI N, WAI HO AS, YEE KIANG KM, ZHANG X, CHENG YS, POON MW, LEE D, SUEN PU JK, KIT LEUNG GK (2017). Rutin increases the cytotoxicity of temozolomide in glioblastoma via autophagy inhibition. *J Neurooncol*, **132:** 393–400.

ZORLU F, ESER SY, FİDANER C (2004). İzmir ilinde ürogenital kanserlerin insidans hızları(1995-96). *Üroonkoloji Bülteni,* **1:** 2-9.

ÖZGEÇMİŞ

I. Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı:	Ayşenur Gök
Doğum tarihi:	07.07.1989
Doğum yeri:	Giresun
Medeni hali:	Bekar
İletişim:	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Dışkapı / Ankara aysenrgok@gmail.com 0506 935 9492

II. Eğitim- Öğretim

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014-2017

Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 09.2008-02.2014

Lise: Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi, 2003-2007

III. Ünvanları

Veteriner Hekim, 2014

Uzman Veteriner Hekim, 2017

IV- Mesleki Deneyimi

07/2010_08/2010	ARCADİA VETERİNER KLİNİĞİ (Ankara) _Stajyer Veteriner Hekim
06/2011_08/2011	İNTERNATİONAL VETERİNARY HOSPİTAL (Antalya) _ Stajyer Veteriner Hekim
07/2013_04/2014	LENA VETERİNER KLİNİĞİ (Ankara) _Veteriner Hekim

02/2016_12/2016	Ankara Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi (Ankara)_ Proje Meleği (Veteriner Fakültesinden sorumlu)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

04/2016	Türk Biyokimya Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

09/2016	Poster _ GOK A, KİSMALİ G, MERAL O, SEL T (2016). Rutin sensitizes the resistance of prostate cancer cells to TRAIL. *The FEBS Journal*, **283 (Suppl. 1):** 160.
04/2017	Poster _ GÖK A , ÖZTÜRK S , KISMALI G, MERAL Ö , SEL T (2017). The antiproliferative effect of resveratrol on prostate cancer cells. 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, *Bildiriler*, 837.

VII- Diğer Bilgiler

10/2010	Köpeklerde Ultrasonografi (Ankara Üniversitesi Vet. Fak. 1. Veteriner Bilimleri Öğrenci Kongresi (Uluslararası Katılımlı)- Workshop Çalışması)
07/2012	Kariyerim Akademi -Beden Dili ve Diksiyon Eğitimi -Profesyonel İletişim ve Hitabet Sanatı -Profesyonel İkna Teknikleri
10/2013	.Helal Gıda Eğitimi .ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri .GMP (iyi üretim uygulamaları eğitimi)
03/2014	Veteriner Hekimler Derneği (üyelik)
12/2016	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitimi (ANKÜSEM, B Kategorisi, 81 saat)