

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PROSTAT KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNE ACORUS  
CALAMUS BİTKİ EKSTRAKTININ ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**HALİT BUĞRA KOCA**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ömer ÇOLAK**

**MAYIS, 2013**



**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PROSTAT KANSER HÜCRE KÜLTÜR ÜZERİNE ACORUS  
CALAMUS BİTKİ EKSTRAKTININ ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**HALİT BUĞRA KOCA**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ömer ÇOLAK**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Halit Buğra KOCA'nın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Prostat Kanseri Hücre Kültürü Üzerine Acorus Calamus Bitki Ekstraktının Etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.


30.05.2013

Üye : Prof Dr. İ. Özkan ALATAŞ



Üye : Prof Dr. Ömer ÇOLAK (Tez Danışmanı)

Üye : Prof Dr. Tülay KÖKEN



Üye : Prof Dr. Sema USLU



Üye : Prof Dr. Nilüfer ERKASAP



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30/05/2013 tarih ve 958/449 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Prostat kanseri Türkiye’de erkekler arasında en yaygın olarak teşhis edilen kanser türüdür ve kanser nedeniyle ölümlerde erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanserinde vasküler endotelial büyüme faktör-A’nın (VEGF-A) tek başına en önemli anjiogenik faktör olduğu düşünülmektedir. Apoptotik süreçte yer alan poli-(ADP-riboz) polimeraz’ın (PARP) yıkılımı apoptotik süreç markırı olarak kullanılmaktadır. Acorus Calamus’un anti-kanserojen etkisi ile birlikte çeşitli tıbbi özelliklere sahip olduğu uzun yıllardır özellikle Asya’da kabul edilmektedir. Çalışmamızda acorus calamus kökünün etanolik ekstraktının insan prostat kanser LNCaP hücre dizisinde hücre çoğalmasına, anjiogeneze ve apoptozise olası etkileri in vitro ortamda çalışıldı. Ekstraktın hücrelerin çoğalması üzerine etkisinin ve inhibitör konsantrasyon %50 (IC50) düzeyinin belirlenmesi amacıyla hücreler 24 ve 48 saat boyunca 0, 250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml ekstrakt konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Bu konsantrasyonlardaki ekstraktlar 24 ve 48 saatte LNCaP hücre yaşayabilirliğini kontrolle karşılaştırıldığında doza ve zamana bağlı olarak %44'lere kadar azalttı. 24 saat sonra 750 µg/ml ekstrakt konsantrasyonunda bölünmüş PARP düzeyinde %180 oranında anlamlı bir artış gözlenirken 48 saat sonrası 500 ve 750 µg/ml ekstrakt konsantrasyonlarında bölünmüş PARP düzeyleri sırasıyla %198 ile %244 oranlarında bulundu. VEGF-A protein ve gen ekspresyon miktarlarında 24 saat sonra anlamlı bir farklılık bulunmazken 48 saat sonrası 750 µg/ml ekstrakt konsantrasyonunda VEGF-A protein ve gen ekspresyonu düzeyleri sırasıyla 142 pg/ml ve %6 olarak bulundu. Bu çalışma acorus calamus kökünün etanolik ekstraktının zaman ve doz bağımlı olarak güçlü bir anti-kanser, anti-anjiogenik ve apoptotik etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** LNCaP, acorus calamus, anti-kanser, anti-anjiogenik, apoptotik.

## SUMMARY

Prostate cancer is the most common cancer diagnosed among men in Turkey and second leading cause of the cancer death in Turkish men behind only lung cancer. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), thought to be the single most important angiogenic factor in prostate cancer. Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) involved in apoptotic process and cleavage of PARP serves as a marker of cells undergoing apoptosis. *Acorus calamus* has long been considered to have anti-carcinogenic and medicinal properties especially in Asia. We examined whether ethanolic extract of *acorus calamus* root affects the survival of prostate cancer LNCaP cells and induces apoptosis and angiogenesis of these cells in vitro. Cells were incubated during 24 and 48 hours with 0, 250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml doses of extract to determine the effect of the extract on the cells proliferation and inhibitor concentration 50% (IC50) value. Extract with these concentrations reduced the number of LNCaP living cells up to 44 % as compared to the control at dose and time dependent manner at 24 and 48 hours. Meanwhile, significantly increased by 180% had been observed in cleaved PARP after 24 hours at 750 µg/ml extract concentration, and after 48 hours cleaved PARP levels at 500 and 750 µg/ml extract concentrations were found %198 and %244, respectively. There were no significant differences at protein and gene expression amounts of VEGF-A after 24 hours, but after 48 hours VEGF-A protein and gene expression amounts at 750 µg/ml extract concentrations were found 142 pg/ml and 6%, respectively. The present study reveals the possibility that ethanolic extract of *acorus calamus* root possesses a dose and time dependent anticancer, apoptotic and anti-angiogenic properties.

**Key words :** LNCaP, *acorus calamus*, anti-cancer, anti-angiogenic, apoptotic

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	v
SUMMARY .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
SİMGE ve KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
<b>2.1. Kanser</b> .....	4
<b>2.2. Anjiogenez</b> .....	5
<b>2.2.1. Vasküler Endotelyal Growth Faktör</b> .....	9
<b>2.3. Apoptozis</b> .....	11
<b>2.3.1. Apoptozis ve Kanser Tedavisi</b> .....	16
<b>2.3.2. Poli-ADP-riboz polimeraz</b> .....	17
<b>2.4. Prostat Kanseri</b> .....	18
<b>2.4.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi</b> .....	19
<b>2.4.2. Prostat Anatomisi</b> .....	22
<b>2.4.3. Prostat Kanserinin Etyolojisi</b> .....	24
<b>2.4.4. Prostat Kanser Sınıflaması</b> .....	25
<b>2.5. Doğal Bitkiler ve Kanser Tedavisi</b> .....	25
<b>2.5.1. Acorus Calamus (Hazanbel Otu)</b> .....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
<b>3.1 Hücre kültürünün yapılması</b> .....	33
<b>3.1.1. Kültür için yapılan hazırlıklar</b> .....	33
<b>3.1.2. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması</b> .....	34
<b>3.2. Etanolik Ekstrakt Hazırlanması</b> .....	34
<b>3.3. Hücre sayısını belirleme yöntemleri</b> .....	34
<b>3.3.1. Tripan mavisiyle boyama</b> .....	35
<b>3.3.2. XTT</b> .....	35
<b>3.4. Bölünmüş PARP Ölçümü</b> .....	36
<b>3.5. VEGF-A Protein Düzeyinin Ölçümü</b> .....	37
<b>3.6. Real Time-PCR (RT-PCR) Tekniği ile VEGF-A tayini</b> .....	38

3.6.1. RNA İzolasyonu .....	39
3.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	40
3.6.3. cDNA Sentezi.....	40
3.6.4. RT- PCR .....	41
3.6.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması.....	42
3.7. Deney grupları I.....	43
3.8. Deney grupları II .....	44
3.9. İstatistiksel analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Ekstraktın hücre canlılığına etkisi .....	45
4.2. Ekstraktın Bölünmüş PARP Düzeyleri Üzerine Etkisi .....	47
4.3. Ekstraktın VEGF-A Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi .....	48
4.4. Ekstraktın VEGF-A Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	50
5. TARTIŞMA .....	52
6. SONUÇ .....	56
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	57



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Kimyasal karsinogenez aşamaları.....	5
Şekil 2. 2. Anjiogenez Süreci .....	7
Şekil 2. 3. Apoptozis süreci .....	13
Şekil 2. 4. Apoptozisin ekstrensek ve intrinsek yolları .....	15
Şekil 2. 5. Türkiye’de 2008 yılına ait en sık görülen kanser türlerinin insidansları.....	21
Şekil 2. 6. Türkiye’de 2008 yılına ait erkeklerde en sık görülen beş kanserin yaşa özel hızları .....	21
Şekil 2. 7. Prostat glandı.....	23
Şekil 2. 8. Prostat Zonları.....	23
Şekil 2. 9. Acorus calamus bitkisi .....	28
Şekil 2. 10. Acorus calamus bitkisinde bulunan majör kimyasal bileşenler .....	30
Şekil 4. 1. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları .....	46
Şekil 4. 2. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları.....	46
Şekil 4. 3. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP yüzdeleri.....	47
Şekil 4. 4. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP yüzdeleri.....	48
Şekil 4. 5. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları .....	49
Şekil 4. 6. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları .....	49
Şekil 4. 7. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif VEGF-A ekspresyon düzeyleri. ....	50
Şekil 4. 8. Ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif VEGF-A ekspresyon düzeyleri .....	51

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2. 1.</b> Temel anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörler .....	<b>8</b>
<b>Tablo 2. 2.</b> Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması .....	<b>12</b>
<b>Tablo 2. 3.</b> Amerika’da 2013 yılı Tahmini Kanser Vakaları ve Ölümler .....	<b>20</b>
<b>Tablo 3. 1.</b> gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması .....	<b>40</b>
<b>Tablo 3. 2.</b> cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.....	<b>41</b>
<b>Tablo 3. 3.</b> RT PCR için miks içeriği .....	<b>42</b>
<b>Tablo 3. 4.</b> Çalışmada kullanılan iNOS primerinin dizileri, Tm dereceleri .....	<b>43</b>
<b>Tablo 4. 1.</b> Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları .....	<b>45</b>
<b>Tablo 4. 2.</b> Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP yüzdeleri .....	<b>47</b>
<b>Tablo 4. 3.</b> Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları .....	<b>48</b>
<b>Tablo 4. 4.</b> Ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif VEGF-A ekspresyon düzeyleri .....	<b>50</b>

## SİMGE ve KISALTMALAR

- ADP: Adenozin di fosfat
- AP-1: Aktivatör protein 1
- Apaf: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
- ATP: Adenozin tri fosfat
- BAD: Bcl ilişkili ölüm uyarıcısı protein
- Bax: Bcl ilişkili x proteini
- Bcl-2: B hücreli lösemi/lenfoma 2
- BH: Bcl homoloğu
- Bid: BH3 domain içeren proapoptotik Bcl2 ailesi üyesi
- COX: Siklooksijenaz
- DMSO: Dimetil sülfoksit
- DNA: Deoksiribonükleik asit
- ECM: Ekstraselüler matriks
- FCS: Fetal dana serumu
- FGF: Fibroblast büyüme faktör
- Flt: Fms benzeri tirozin kinaz
- GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
- GC: Gaz kromatografi
- IAPs: Apoptozis inhibitörleri
- ICE: İnterlökin 1 $\beta$  dönüştürücü enzim
- IFN: İnterferon
- IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
- IL: İnterlökin
- Jak: Janus kinaz

- Kaspaz: Sistein aspartik asit-spesifik proteazlar
- kDa: Kilodalton
- KDR: Kinase insert domain reseptör
- LDH: Laktat dehidrogenaz
- LNCaP: Prostat sol supraklaviküler lenf nodu karsinomu
- ME: Merkpto etanol
- MMP: Matriks metalloproteinaz
- NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid
- NF- $\kappa$ B: Nükleer faktör kappa B
- PARP: poli-(ADP-riboz) polimeraz
- PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
- PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
- PI3K: Fosfatidil inozitol 3-kinaz
- PIGF: Plasental büyüme faktörü
- PKB: Protein kinaz B
- PSA: Prostat spesifik antijen
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute
- STAT: Sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon aktivatör proteinleri
- TGF: Transforme edici büyüme faktörü
- TIMP: Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü
- TNF: Tümör nekrozis faktör
- TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptörleri
- VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktör
- XTT: 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolium hidroksit

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan vücudunda 75-100 trilyon arasında hücre bulunmaktadır ve bu nedenle bir veya birkaç hücrenin yaşam boyunca faaliyetleri sırasında anormal bir proliferatif aktivitesi kazanması sürpriz değildir. Bunun yanında kalıtsal bozukluklar da anormal proliferatif aktiviteye yol açabilir (2). Amerikan popülasyonunda yaşam boyu kanser gelişme olasılığı erkeklerde yaklaşık 2’de 1 iken bu oran kadınlarda 3’te 1’dir. Yine malign tümörler sonucu ölümler kalp hastalıkları sonucu ölümlerin ardından ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanseri Türkiye’de erkeklerde görülen kanser türleri arasında en sık görülenidir ve kanser sonucu ölümlerde ikinci sırayı almaktadır.

Tarihsel olarak bakıldığında yeni ilaçların çoğunluğu ya doğal ürünlerden ya da doğal ürünlerden türetilen bileşiklerden elde edilmektedir (48). Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO: World Healty Organisation) tahminlerine göre dünya popülasyonunun yaklaşık %80’inin temel sağlık hizmetleri için birincil olarak sadece geleneksel tıbbi tercih ettiğini bildirmiştir. Amerika’da günümüzde kullanılan ilaçların yaklaşık %50’si doğal kaynaklardan ve özellikle çeşitli bitkilerden elde edilmektedir. Son zamanlarda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde geleneksel tıbbın kullanımı önemli ölçüde artmaktadır (8). Ülkemizde genellikle ‘eğir’ ya da ‘hazanbel’ otu olarak da bilinen Acorus Calamus’un, Hindistan ve uzak doğuda ülkelerinde gıdaların yanında ve tıbbi amaçla kullanımı çok uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu bitkinin antikanser özelliği de olmak üzere çeşitli birçok faydalı özellikleri bildirilmiştir (76).

Yeni kan damarlarının gelişimi olan anjiogenez malign, infektif, proliferatif ve inflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemlidir. Tümör büyümesi ve metastazın anjiogenez bağımlı süreçler olduğu ve anjiogenezisin engellenmesinin hastalığın ilerlemesinin önlenmesi için bir strateji olabileceği bildirilmiştir (29). Bu arada, normal dokuların kanserleşme yolunun anjiogenik kapasite kazanmalarından geçtiği büyük oranda kabul edilmektedir. Dolayısıyla kanser hücrelerinde, pro-anjiogenik ve anti-anjiogenik moleküller arasındaki denge anjiogenez lehine bozulmaktadır. Tümör

hücreleri pro-anjiogenik büyüme faktörleri üretirler. Bu faktörler arasında en önemlisi vasküler endotelial growth faktör (VEGF) olup anjiogenezin bütün aşamalarını hızlandırarak pro-anjiogenik özellik gösterir. VEGF'nin çeşitli tümörlerde yüksek miktarda over-ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tümör anjiogenezisi üzerine VEGF-hedefli yaklaşımlar büyük önem taşımaktadır (30).

Programlı hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinen apoptozis, belirli bir moleküler işlemler serisinin sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda embriyonik gelişim ve erişkin doku gelişiminin sürdürülmesi için gereklidir. Apoptozis ayrıca virüsle enfekte hücreler veya ağır DNA hasarı bulunan hücreler gibi organizmanın bütünlüğünü tehdit eden hücrelerin yok edilmesi için de gereklidir. Apoptozis; hücre küçülmesi, kromatin kondenzasyonu, plazma membran kabarcıklaşması ile apoptotik cisimciklerin oluşumunu içeren benzersiz fenotipik değişikliklerle karakterize olup yürümesi enerji-bağımlı bir süreçtir (10). Nükleer bir enzim olan poly(ADP-riboz) polimeraz (PARP) DNA iplik kırıklarının tamirinde önemli bir rol oynar. Bu enzim, oksidatif hasar veya diğer nedenlerle oluşan DNA iplik kırıklarını tanıyarak bağlanır ve hücrenin DNA hasarından korunmasını kolaylaştırır. Aynı zamanda kaspaz-3'ün bir hedefi olan PARP'ın yıkılımı apoptotik mekanizma süreçlerinden birisidir (12). Bitkisel kimyasalların veya fitokimyasalların kullanılarak malign tümörlerde apoptozisin tetiklenmesi ve bu şekilde kanser tedavisinde kullanılması üzerine odaklanan çalışmalar umut vaat etmektedir.

Prostat kanser hücreleri üzerine acorus calamus bitkisinin herhangi bir etkisinin olup olmadığına yönelik şu ana kadar bilimsel bir veriye ulaşılamadığından ve ülkemizde de alanında uzman olan veya olmayan kişilerce bu bitkinin prostat kanseri üzerine faydalı etkilerinin bulunduğu iddia edilmesi nedeniyle bu bitkinin prostat kanser hücresi üzerine bir etkisinin olup olmadığını bilimsel yöntemlerle araştırmayı amaçladık. Bu çalışmada LNCaP hücrelerinde acorus calamus bitkisinin etanolik ekstraktının hücre canlılığı, anjiogenez ve apoptozis üzerine indükleyici/baskılayıcı etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Hücre canlılığına etkisi 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolium hidrokset (XTT) yöntemi

ile, apoptotik etkisi bölünmüş PARP ölçüm kiti ile, anjiogenik etkisi de VEGF-A'nın protein miktarı ve ekspresyon düzeylerinin ölçülmeleri ile belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

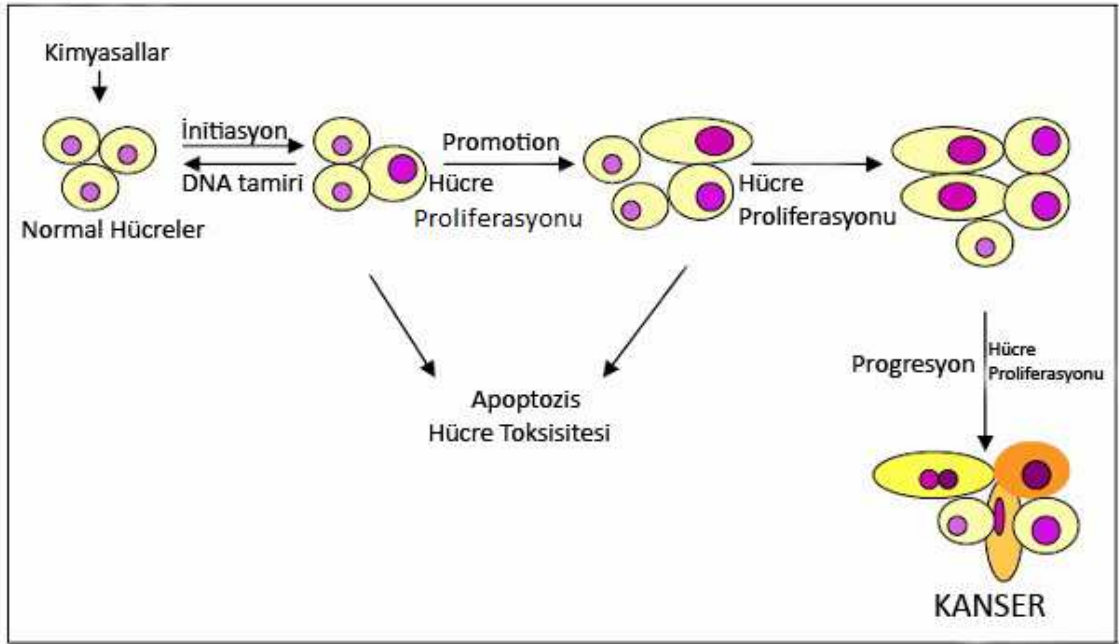
Kanser kelimesinin kökeninin Tıp'ın Babası olarak kabul edilen Yunan hekim Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından konulduğu kabul edilmektedir. Hipokrat "karkinos" ve "karkinoma" terimlerini sırasıyla iyileşmeyen bir şişlik veya ülser oluşumu ile malign iyileşmeyen tümörü tanımlamak için kullanmıştır. Ünlü bir hekim ve filozof olan Galen of Pergamon (MS 129-199), Hipokratın çalışmalarını yeniden canlandırdı ve genişletti. Galen tümörü tanımlamak için ilk defa Latin "cancrum" veya "crab" kelimelerinden türetilen "cancer" kelimesini kullanmıştır. Çünkü Galen tümörlerin yengeç-benzeri şekillenme karakteristiklerine sahip olduklarına inanıyordu (21).

İnsan vücudunda trilyonlarca canlı hücre meydana gelmektedir. Normal vücut hücreleri düzenli bir şekilde büyürler, bölünürler ve ölürlür. Bir insanın yaşamının ilk yıllarında normal hücreler kişinin büyümesini sağlamak için hızlı bir şekilde bölünürler. Kişi yetişkin hale geldikten sonra birçok hücre sadece yıpranmış veya ölen hücrelerin yerini almak için ve yaralanmaları onarmak için bölünürler (3).

Karsinogenez (neoplastik transformasyon), karsinojenlerin çoğunlukla sinyal iletim yollarıyla etkileşimi sonucu belirli bir süreçte gelişen ve birbirini izleyen çok basamaklı hücresel değişikliklerin yer aldığı kontrolsüz hücre çoğalmasdır. Karsinogenez, inisiyasyon (başlangıç), promosyon (artma) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere her biri kendine özgü üç safhaya ayrılır (Şekil 2.1). Başlatıcı etken (inisiyatör) çoğunlukla doğrudan DNA'yla etkileşerek irreversible mutasyona sebep olduğundan genotoksiktir. Proliferasyonu uyaran promotör, DNA dizisini etkilemeyen, fakat fenotipini bozan, çoğunlukla reversibl olan epigenetik değişikliklere yol açar. Ne tek başına promotör, ne de inisiyatör kansere sebep olabilir. İnisiyasyonu takip eden ilerleme safhası, karyotipik değişiklikler, çoğul mutasyonlar ve artmış malignite gücüyle kendini gösteren genomik instabilite durumudur. Bu değişkenlik, tümör



büyükliğünün ve gelişme hızının artması, yayılma, metastaz, anaplazi, ilaç direnci ve bağışıklık denetiminden kaçışla karakterize daha agresif bir fenotip oluşmasına yol açar. Hastalık, normal dokularla karşılaştırıldığında hücre siklusunun beklenilenden aktif ve hücre fraksiyonlarının daha fazla oluşu ile belirlenir (35).



Şekil 2. 1. Kimyasal karsinogenez aşamaları (73)

Yeni damar oluşumu (neanjioenez, neovaskularizasyon) vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus gibi durumlarda söz konusudur. Kontrolsüz anjiogenez ise başta tümör büyümesi ve tümör metastazı olmak üzere, inflamatuvar hastalıklar, kronik inflamasyon, proliferatif retinopati gibi birçok patolojik olayda rol oynar (84). Anjiogenez, tümör gelişimi ve metastaz için gereklidir ve kanser tedavisi için heyecanverici bir hedeftir (87).

## 2.2. Anjiogenez

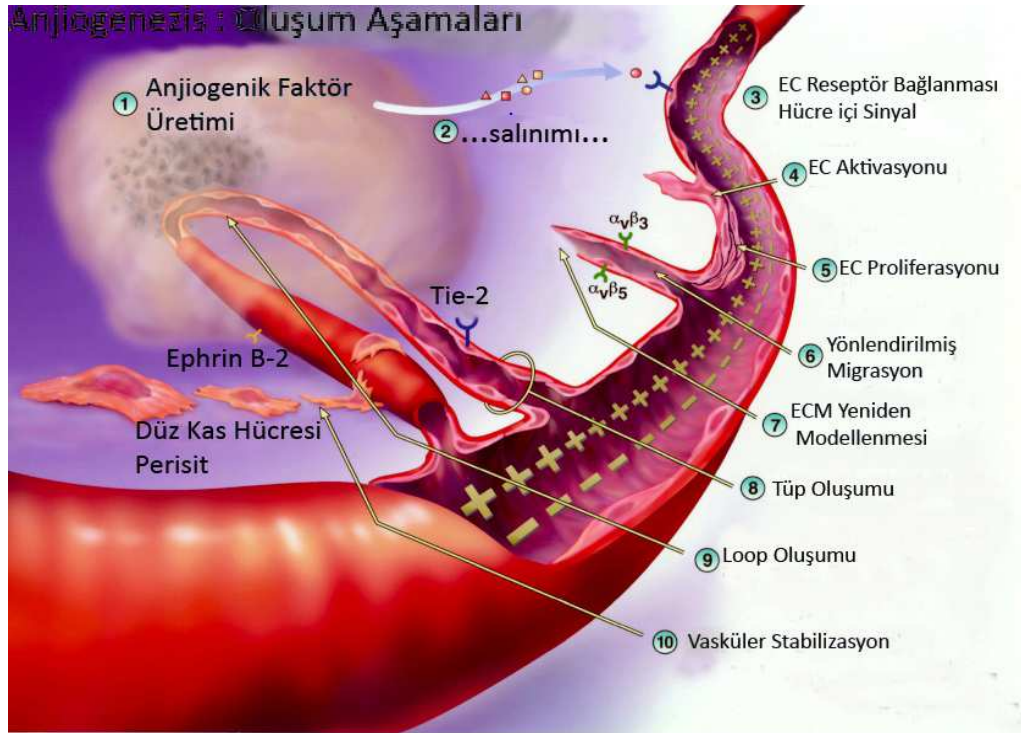
Vasküler endotelial ve destek hücreleri oksijen, besin ve sinyal moleküllerini transport ederken aynı zamanda karbondioksit ve metabolik son ürünlerini hücre, doku

ve organlardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu süreç için karmaşık dallanmış bir dolaşım ağı çok önemlidir (88). Anjiogenez, önceden var olan kapillerlerden çeşitli patolojik durum altında yeni kan damarlarının oluşum sürecidir (64). Anjiogenezle ilgili vaskülogenez, arteriogenez ve lenfanjiogenez süreçlerinin ayırt edilmesi gereklidir. Vaskülogenez başlangıçta embriyonik gelişimin erken dönemlerinde ilkel hücrelerden de-novo yeni kan damarları oluşumunu ifade etmektedir. Ancak son zamanlarda kemik iliğinde ve dolaşımında bulunan endotelial prekürsörlerinin yetişkin anjiogenezini önemli ölçüde etkilediğinin bulunması durumu karışık bir hale getirmiştir. Genel olarak kullanılan anjiogenez terimi küçük kan damarlarının oluşumu anlamına gelmekte ve bu nedenle yeni arterlerin oluşumu olan arteriogenezden ayırt edilmelidir. Yine de bazı ajanlar (VEGF gibi) anjiogenezini indükleyerek arteriyal kan damarlarının oluşumuna neden olabilir (26).

Anjiogenez, kan damarlarındaki endotelial hücreler aracılığıyla gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Nadiren bölünen pasif endotelial hücrelerin aksine, anjiogenez endotelial hücreleri; metalloproteinazlar ve diğer matriks degrade edici enzimlerin sekresyonu, yeni oluşturulan alanlara hücre migrasyonu, endotelial hücre bölünmesi ve proliferasyonu ile damar oluşumu gibi bir seri kompleks olaylar dizisi geçirirler (Şekil 2.2). Bu süreçler, fibroblast growth faktör (FGF), vasküler endotelial growth faktör (VEGF), anjiopietinler, integrin aktivatörleri gibi uyarıcılar ile trombospodin, anjiostatin ve endostatin gibi inhibitörleri içeren iyi düzenlenmiş süreçlerdir (Tablo 2.1) (13).

Damar endotelini döşeyen kolajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile anjiogenez süreci başlar. Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Dokularda üretilip salgılanan anjiogenez büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiogenezle ilişkili büyüme faktörleri, yakınlarındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlerine bağlanırlar. Büyüme faktörleri ile aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen

ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkılımına neden olurlar. ECM'nin enzimatik yıkılımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme ile invajinasyon veya köprü oluşumu şeklinde bölünmeler izler. Anjiogenik uyarı ile proteolitik yıkım ve endotel hücrelerin aktivasyonu gerçekleşir. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç ederler ve çoğalırlar. Bu süreçte en etkili anjiogenik faktör vasküler endotel büyüme faktörü VEGF'dir. Endotel hücre çoğalmasının ardından ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluştuğundan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma meydana gelir ve bu sayede daha ileri düzeyde yayılması mümkün olur. ECM proteolizinin aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı meydana getirirler. Damar olgunlaştıktan sonra anjiogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiogenez inhibitörlerinde bir artış gözlenir. Böylece damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (97,99).



Şekil 2. 2. Anjiogenez Süreci (40)

**Tablo 2. 1.** Temel anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörler

	<b>Pro-anjiogenik</b>	<b>Anti-anjiyogenik</b>
<b>Ekzojen ajanlar</b>		Linomide Karboksiamido-triazole Nötralize antikorları Fumağillin analogu MMP inhibitörleri COX-2 inhibitörleri
<b>Endojen ajanlar</b>	Matriks metalloproteinleri (MMPs) <b>VEGF</b> Temel fibroblast büyüme faktörü 2 (bFGF-2) Fibroblast büyüme faktörü 4 (FGF-4) Transforme edici büyüme faktörü $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) İnterlökin 8 (IL-8) İnterlökin 6 (IL-6) İnterlökin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) Sikloksijenaz 2 (COX-2) Nitrik oksit (NO) Tümör nekrozis faktör (TNF), İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)	Metalloproteinaz doku inhibitörü 1(TIMP-1) İnterlökin-10 (IL-10) Anjiyostatin Endostatin Prostat spesifik antijen (PSA) İnterferon (IFN)

Patolojik ve normal anjiogenezis arasında iki önemli farklılık bulunmaktadır. Birincisi; hastalıklı dokuda, normal dokudaki neovaskülarizasyonu devre dışı bırakan düzenleyici mekanizmalar normal çalışmamaktadır, pozitif ve negatif anjiogenez regülatörleri arasındaki dengede pozitif regülatörlere doğru bir değişim söz konusudur. Patolojik ve normal anjiogenez arasındaki ikinci önemli farklılık ise hastalıklı dokudaki damar oluşumunun oldukça düzensiz ve dağınık olması ve damar duvarlarında çok sayıda açıklık bulunmasıdır. Tümör damarlarının düz kas hücreleri ve perisitler yoluyla olgunlaşmaması nedeniyle tümör içerisinde sızıntı yapan damar oluşumuna yol açar. Bu fenomen VEGF'nin keşfi için önemlidir (13).

Tümör anjiogenezi; kanser hücreleri, normal endotel hücreleri, ekstrasellüler matriks proteinleri ve çoklu stimülatör ve inhibitör faktörler arasındaki etkileşimi içeren karmaşık bir süreçtir. Tümör hücreleri çeşitli endotel hücre mitojenleri salgırlar ve bunlardan basic fibroblast growth faktör (bFGF) ile VEGF en iyi karakterize edilenleridir. Bunların düzeyleri çeşitli solid tümörlü hastaların serum ve idrarlarında yükselmektedir (60). Anjiogenez, solid tümörlerin progresyonundaki önemli rolünden dolayı antikanser kemoterapi için çekici bir hedef haline almıştır (105). Solid tümörler anjiogenez bağımlıdır, bu nedenle prostat kanseri kontrolsüz büyümesini devam

ettirebilmek için yeni damar oluşumuna ihtiyaç duyar. Prostat kanseri gelişiminde birkaç adım vardır; yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi ile başlar ve fokal karsinomaya doğru ilerler, daha sonra invaziv karsinoma oluşur ve sonuçta metastatik hastalığa dönüşür. Bu nedenle her bir evredeki hastalığın progresyonunu ve moleküler olayları takip etmek önemlidir. Anjiogenez uyarıcı faktörler olan platelet kaynaklı büyüme faktör (PDGF), transforme edici büyüme faktör (TGF) ve VEGF prostat kanserinde artış göstermektedir. Prostat kanseri ilerledikçe anjiogenezde belirgin bir artış gözlenmektedir (62,65).

Anjiogenez, solid tümörlerin gelişimindeki başlıca rolü nedeniyle antikanser kemoterapi için çekici bir hedef haline gelmiştir. Anti-anjiogenik ajanların bazıları klinik deneme aşamasında iken çoğunluğu halen prelinik aşamadır. Bununla birlikte anjiogenez inhibitörleri tümör olmayan endotelial hücrelerde intrinsek sitotoksikite, yara iyileşmesinde bozma, kanama, hipertansiyon, proteinüri ve tromboz gibi kardiyovasküler komplikasyonlara neden olabilmektedir (14). Buna ek olarak tümör anjiogenez sürecindeki sinyal yollarını hedef alan inhibitörlerin tek bir yolağı etkilemesi yetersiz olabilir ve bu durumda direnç yol açar. Bu problemler minimal yan etki ve toksisiteye sahip, çok hedefli ajanların gelişiminin acil ihtiyacını vurgulamaktadır (27,105).

### **2.2.1.Vasküler Endotelial Growth Faktör**

Genellikle VEGF-A olarak adlandırılan VEGF, bir platelet kaynaklı growth faktör (PDGF) homologudur ve 45 kDa ağırlığında heparin bağlayıcı homodimerik bir glikoproteindir (98). Anjiogenik growth faktör ailesinin ilk üyesi olan VEGF-A'nın keşfi kanser araştırmaları için yeni perspektifler açmıştır. İlk defa 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından kobay tümörlerinden tanımlanmıştır. Kobay derisinde vasküler sızıntı oluşturduğu için de vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmiştir (94). Vasküler permeabilite faktörü olarak da adlandırılan VEGF-A, VEGF ligand ailesinin en iyi araştırılmış ve anlaşılacak üyesidir. VEGF'in özellikle

damar oluşumunda önemli rol oynadığı ve endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Yıllar geçtikçe de VEGF ailesi önemli ölçüde genişlemiştir (15).

Anjiogenezis sürecindeki sinyal mekanizmalarından belki de en yaygın olarak inceleneni VEGF ve reseptörleridir. VEGF-A, endotelial hücrelerde eksprese edilen ve hücre geçirgenliğini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını regüle eden VEGFR1 ve VEGFR2 gibi iki ilişkili reseptör tirozin kinazlara bağlanarak hücreleri aktive eder. VEGF'in başlıca iki önemli biyolojik fonksiyonları vasküler endotelial hücre proliferasyonunun stimülasyonu ile endotelial hücrelerin vasküler geçirgenliğinin artırılmasıdır. VEGF, endotelial hücrelerin geçirgenliğini artırarak ve endotelial adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyerek pro-inflamatuar sitokin gibi fonksiyon gösterir. Hücreler yüksek miktarda interlökin 8 (IL-8) eksprese ederek endotelial hücrelerde VEGF reseptörlerinin fosforilasyonunu indüklemektedir. Bu durumda IL-8'in majör rolünün, endotelial hücre büyümesinin uyarılmasını VEGF sekresyonu aracılığıyla gerçekleştirdiği anlamına gelmektedir. Kanser hücre proliferasyonunda anjiogenik süreç önemli bir rol oynar. Bu nedenle prostat kanser hücreleri tarafından VEGF sekresyonunun artması, hücre canlılığının, çoğalmasının ve büyümesinin artışı için gereklidir (22,28,30).

İnsan VEGF ailesi beş üye içerir; VEGF (veya VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental growth faktör (PlGF). Bu proteinlerin her biri biyosentez esnasında parçalanan bir sinyal sekansı içerirler. Ayrıca, bunlara karşılık gelen pre-mRNA'lardaki alternatif bağlanma sonucu VEGF, VEGF-B ve PlGF'in birden fazla izoformu oluşur. VEGF ailesi ligandları için üç tane reseptör protein-tirozin kinaz (VEGFR1/Flt-1(fms-benzeri tirozin kinaz 1), VEGFR2/Flk-1/KDR (fetal karaciğer kinaz 1/kinaz eklenmiş domain içeren bölge) ve VEGFR3/Flt-4 (fms-benzeri tirozin kinaz 4) ve iki tane non-enzimatik reseptör (nöropilin 1 ve 2) bulunmaktadır. Ayrıca çeşitli VEGF ailesi ligandları plazma membranında ve ekstraselüler matrikste bulunan heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanır (34,88).

VEGF anjiogenez tedavisi için bir hedef olarak dikkat çekmiştir. VEGF ekspresyonu hipoksi ile up-regüle olmaktadır ve normal vasküler gelişim için en önemli anjiogenik faktördür (13). Radikal prostatektomi uygulanan hastalarda operasyon öncesi bulunan yüksek serum ve idrar VEGF düzeyleri ile hastalığın progresyonu arasında korelasyon gözlenmiştir. Serum VEGF düzeyi prostatektomi sonrası azalmıştır. Metastatik prostat kanserli hastalarda serum ve idrar VEGF konsantrasyonu normal popülasyona göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (60,71,96).

### **2.3. Apoptozis**

Çok hücreli canlıların ömürleri boyunca döllenenmeden başlayarak mitoz, farklılaşma ve ölüm olayları büyük önem taşır. Bir hücrenin yaşaması, bölünmesi, farklılaşması ya da ölmesi konusundaki kararı hücre içi ve dışından gelen uyarılar belirler. Hücre ölümü genellikle apoptoz veya nekroz şeklinde olmaktadır.

Nekroz mekanik bir hasardan ya da toksik kimyasal ajanlara maruz kalmaktan ileri gelirken apoptozis ise fizyolojik ya da patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş veya potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılması için başvuru olan bir hücre intihar mekanizmasıdır. Nekroz ve apoptoz arasındaki farklılıklar tablo 2.2’te özetlenmiştir (59).

**Tablo 2. 2.** Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (104)

<b>Karakteristik</b>	<b>Nekroz</b>	<b>Apoptozis</b>
<b>Neden olan faktörler</b>	Şiddetli oksidatif stres İskemi Hipertermi Hipoksi Yüksek konsantrasyonda toksik maddeler Kemoterapi	Orta düzeyde oksidatif stres Büyüme faktörlerinin yokluğu HIV Kemoterapi İridasyon Ölüm reseptörlerinin indüksiyonu
<b>Morfolojik karakteristikler</b>	Kromatin çökmesi Membran hasarı Organellerin disintegrasyonu Hücre şişkinliği Hücre lizisi Apoptozisin geç dönemlerinde ikincil nekroz oluşabilir.	Sitotoksik T lenfositler Kromatin yoğunlaşması Blebler bulunan bozulmamış hücre membranı (ancak membran in vitro olarak geç aşamalarda hasar alabilir.) Hücre büzülmesi Apoptotik oluşumlar
<b>Biyokimyasal / immunolojik karakteristikler</b>	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerektirmez. DNA agar jel elektroforezde smear yapı gösterir. Total hücre ölüm markerları (LDH, M65) salınır. Lizozomal enzimler salınır ve yangı şekillenir.	ATP gereklidir. İnternükleozomal DNA fragmentasyonu (agar jel elektroforezde ladder görünüm) Caspase-cleaved cytokeratin 18 (M30 antijen) salınır. Yangı şekillenmez.
<b>Belirleme metotları</b>	M65 ELISA assay (hem nekroz hem de apoptozis belirlenir.) Laktat dehidrojenaz (LDH) belirlenmesi Sitokrom c salınımı	M30 ELISA assay Kaspaz-3 aktivasyonu Flow sitometride Sub G <sub>1</sub> piki

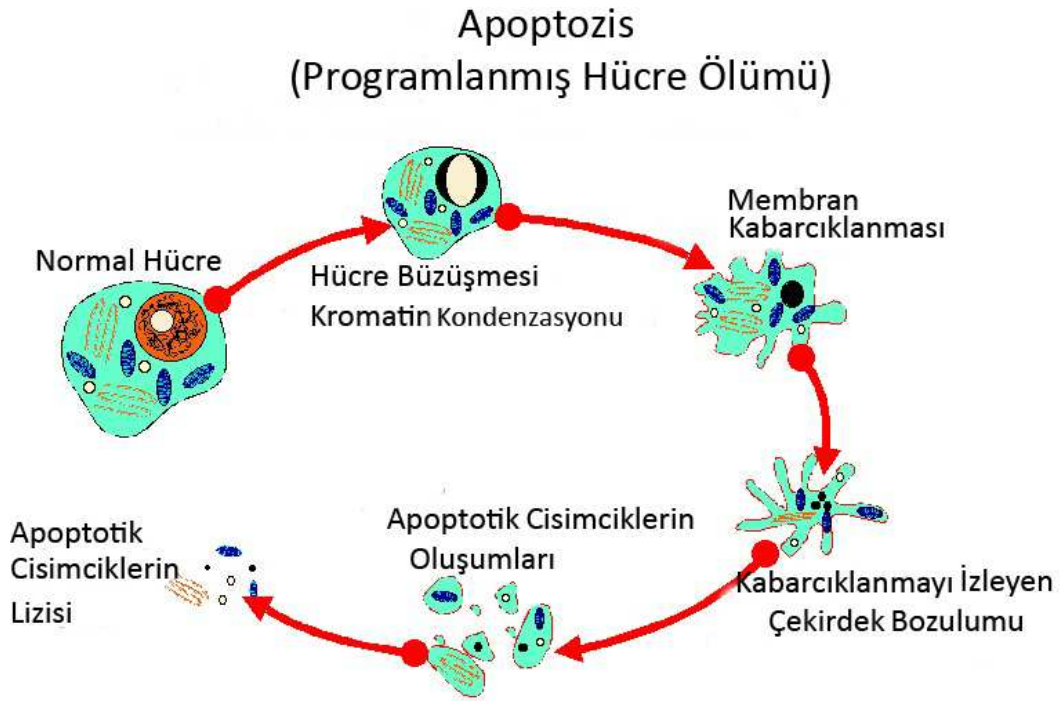
Apoptozis ilk olarak 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından tanımlanmış ve Yunanca'da "ayrı düşmek" anlamına gelen 'apo' ve 'ptozis' sözcüklerinin birleştirilmesi sonucu isimlendirilmiştir (53). Şimdi hücre ölümü konusunda dönüm noktası kabul edilen bu çalışmada gelişimsel ve homeostatik hücre ölümünün vücut tarafından klasik, yanlışlıkla veya nekroz yoluyla mı kontrol edildiği açıklanmaktadır.

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis normal embriyonik gelişim, doku homeostazisi ve immün sistem regülasyonu boyunca evrimsel olarak korunmuş ve vazgeçilmez bir süreçtir (108). Ökaryotik hücreler çoğalırlar, belirli bir süre hayatta kalırlar ve sonunda ölürler. Hücrelerin ömrü hücrenin tipine bağlı olarak değişir. Örneğin, bağırsak hücrelerinin ömrü 3-5 gün iken derideki hücreler yaklaşık 20-25 gün



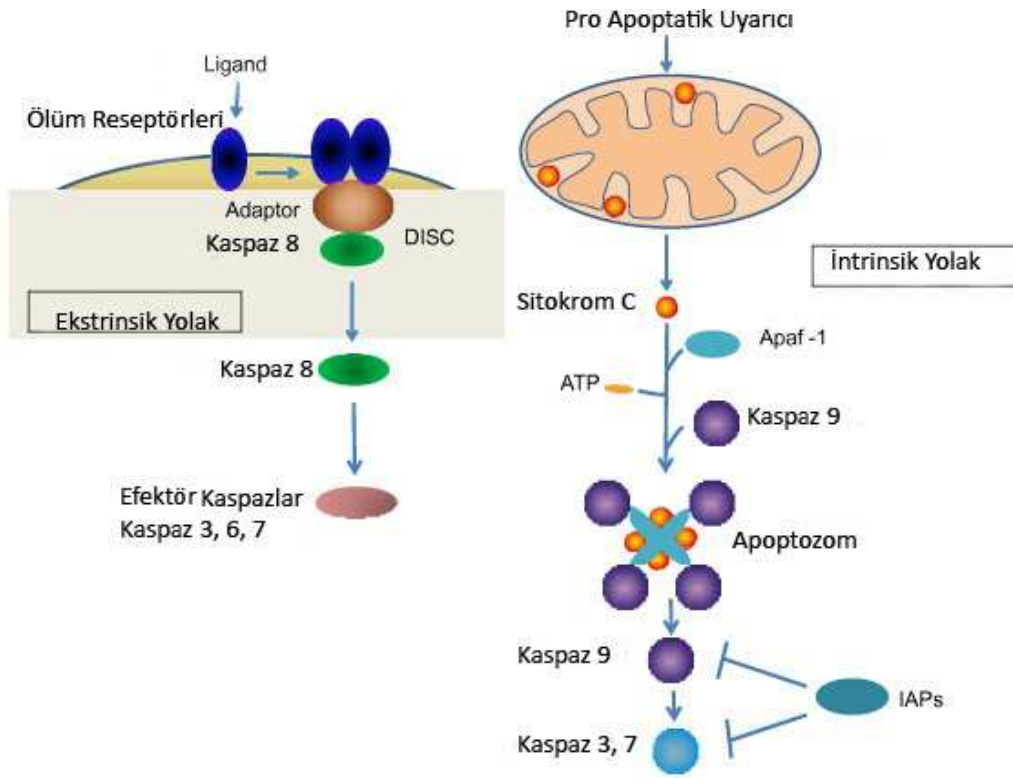
ömre sahiptirler. Ancak, miyokardiyal kas hücreleri ve nöronlar organizmanın ömrü boyunca hayatta kalırlar (104).

Apoptozis, bazı belirgin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile karakterizedir. Morfolojik özellikler olarak; hücre büzüşmesi, membran kabarcıklaşması, kromatin yoğunlaşması, kromatin marginasyonu ile sitoplazma daralması ve yoğunlaşması olarak sıralanabilirken (Şekil 2.3) biyokimyasal özellikler olarak belirgin merdivenler şeklinde DNA fragmentasyonu veya poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) ve nükleer laminler gibi apoptotik markırların degradasyonu gösterilebilir. Embriyonik gelişim, doku ve organların homeostatik dengesi, immün sistem olgunlaşması, nörolojik dejenerasyon, otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar, ateroskleroz etiyolojisi, onkogenез ve tümör gelişimi gibi birçok biyolojik ve patolojik süreçlerle apoptozisin ilişki olduğu gösterilmiştir (66,102).



Şekil 2. 3. Apoptozis süreci (38)

Apoptozisin yürüyebilmesi öncelikli olarak aspartik asit rezidülerine özgüllüğe sahip bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlar aracılığıyla. Kaspaz aracılı apoptozis için ölüm sinyallerinin iletilmesinde ekstrensek ve intrinsek yollar olmak üzere belirgin olarak iki farklı yol vardır. Ekstrensek yolak hücre yüzeyiyle, intrinsek yolak mitokondriyal olaylarla ilişkilendirilmiştir. Ekstrensek yolak; tümör nekrozis faktör reseptörleri (TNFR) süperailisinin veya CD95'in (FAS) kendisine ait ligandlar bağlanarak aktive olması ve sonuçta membran ilişkili sinyal kompleksleri olan prokaspaz 8 ve 10'un aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu kaspaz aktivasyonu kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları doğrudan aktive ederek veya mitokondriyal sitokrom c'nin serbest bırakılmasında rol oynayan Bid'in (BH3 domaini içeren proapoptotik Bcl2 ailesi üyesi) bağlanmasını sağlayarak dolaylı yoldan apoptozisi artırır. İntrinsek yolak ise çeşitli formlardaki hücre stresle doğrudan aktive olarak mitokondriyal sitokrom c'nin sitozole salınmasına neden olur. Daha sonra bu sitozolik sitokrom c, Apaf-1'e bağlanarak oligomerizasyonu tetikler. Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerjiye gereksinim duyduğunu açıklamaktadır. Oluşan apoptozom prokaspaz 9'u aktive eder ve sonuçta bu da efektör kaspazlar olan kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi aktive eder (Şekil 2.4) (108).



Şekil 2. 4. Apoptozisin ekstrensek ve intrinsek yolları (43)

Apoptozis, kalsiyum gibi iyonları, c-myc, Bcl-2/Bax, Fas, DR5 gibi genleri, p53, kaspazlar, apoptozis inhibitörleri (IAPs) gibi proteinleri ve mitokondri ile endoplazmik retikulum gibi organelleri içeren çok sayıda modülatör tarafından regüle edilmektedir(23,69). Bazı modülatörler hücre çeşidine özgünken bazıları uyarıcının tipine bağlı olarak değişir. Apoptotik proses hücre içine sürekli kalsiyum girişi ile karakterize edilmesine rağmen kalsiyum girişi apoptozis için şart değildir. Ayrıca, hücrenin hayatta kalması Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranlarına bağlıdır (9, 104). Apoptozun düzenlenmesi Bcl-2/Bax gen ailesi ile de sağlanmaktadır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptoz baskılayıcısıdır (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Proapoptotik genler: Çoklu domain içerenler (BH1, BH2 ve BH3 domainleri içerenler, ör; Bax, Bak ve Bok) ve yalnız BH3 domaini içerenler (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bim, Bid gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir (32,52).

### 2.3.1. Apoptozis ve Kanser Tedavisi

Günümüzde kullanılan antikanser ajanların çoğu tümör hücrelerini seçici olarak öldürmek üzere tasarlanmıştır. Yakın zamana kadar ilaç etkisi üzerine yapılan birçok araştırma ilacın hücre içi hedefi, ilaç-hedef etkileşimi ile oluşan hücresel hasarın niteliği veya ilacın hedefle etkileşimini engelleyen direnç mekanizmaları üzerine odaklanmıştır. Şimdi ise antikanser ajanların apoptozisi artırdığı ve apoptotik süreçteki bir bozulmanın tedavinin duyarlılığını azaltabileceği iyi bir biçimde bilinmektedir (90). Farklı primer hedeflere sahip ajanlar benzer mekanizmalarla apoptozisi artırabilirken apoptotik süreçteki mutasyonlar çoklu ilaç direnci oluşturabilirler.

Hücre yaşaması ve bölünme prosesi apoptozisin inhibisyonunu gerektirir ve bu süreçte büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinler aracılığıyla aktif kaspazlar inhibe edilerek aktivasyonları engellenir. Hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozisi gibi önemli hücresel proseslerin regülasyonu fosfoinozid 3 kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (PKB veya Akt) gibi sinyal yollarıyla düzenlenmektedir. PI3K yolağının aktivasyonu Akt aktivasyonuna neden olur ve proapoptotik genlerden Bad inhibe olur (75). Bu seri aktivasyon sonucunda kaspaz 9'un inhibe olmasıyla ve apoptotik proses de inhibe olur. Benzer şekilde protein kinaz-c de Bad inhibisyonuna neden olmaktadır (56). Eğer bu hayatta kalma yollarının herhangi birisi çok fazla aktive olursa sonuçta apoptoza karşı bir direnç gelişir. Bu durum malignitelerin önemli bir özelliğidir (104).

Antikanser ajanlar tümör hücrelerinde olduğu kadar normal hücrelerde de apoptozisi artırmaktadır. Tümörlerdeki apoptozisi tespit eden birçok patolojik apoptotik hücre ölümünün normal dokularda da arttığını belirlemişler ve bu sürecin kemoterapi ile ilişkili 'toksikiteye' katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (93). Tüm bu bilgiler ele alındığında apoptotik sinyal yollarının aktive edilmesiyle birlikte büyüme faktör sinyal yollarının da inhibisyonu ile sadece hedef hücrede etki gösteren yeni kanser tedavileri güçlü bir strateji olarak görünmektedir.

### 2.3.2. Poli-ADP-riboz polimeraz

Poli-ADP-ribozilasyon, nükleer proteinlerin posttranslasyonel bir modifikasyondur ve ökaryotik hücrelerin DNA hasarının saptanması ve tamirinde, transkripsiyonel regülasyonda, kromatin modifikasyonunda, mitotik aparat oluşumunda ve hücre ölümünde çeşitli hücresele fonksiyonlarda kritik rol oynar, hücrede oluşan DNA hasarının hızlıca tamir edilmesini kolaylaştırır. Poli-ADP-ribozilasyon, aynı zamanda kaspaz-3'ün bir hedefi olan nükleer bir enzim poli-ADP-riboz polimeraz (PARP; EC: 2.4.2.30) tarafından katalizlenir ve nikotinamid adenin dinükleotid'den (NAD) ADP-riboz ünitesini belirli bir rezidüsüne transfer ettikten sonra bunu hedef proteine aktarır (91).

PARP, 116 kDa ağırlığında nükleer bir poli-ADP-riboz polimerazdır. Bu protein birçok interlökin 1 $\beta$  dönüştürücü enzim (ICE)-benzeri kaspazlar tarafından parçalanabilir ve in-vivo ortamda kaspaz 3'ün en önemli hedefidir. İnsanlarda PARP yıkılımı Asp214 ve Gly215 arasında gerçekleşir ve PARP'ın amino terminal DNA bağlanma domaini (24 kDa) ile karboksi terminal katalitik domainine (89 kDa) ayrılır. Enzimin amino terminal domaini tek veya çift sarmal DNA kırıklarına bağlanır (17,89). İki çinko parmak aracılığıyla gerçekleşen bağlanma, karboksi terminal NAD-bağlayıcı domainin katalitik merkezinde dramatik bir aktivasyona neden olur. Histonlar ve PARP'ın kendisi de dahil olmak üzere çeşitli "alıcı" proteinlerin poly-ADP-riboz ile kovalent modifikasyonu in-vivo ve in-vitro olarak tespit edilmiştir. PARP'ın oto-modifikasyonu DNA bağlanma ve katalizör bölge arasındaki bir protein domaininde meydana gelir. PARP'ın DNA-baz onarımına katılımı net olmakla birlikte ilgili moleküler mekanizmalar halen tartışılmaktadır (72).

Onsekiz tane PARP ailesi üyesi tespit edilmiştir, ancak sadece PARP-1 ve PARP-2 DNA'nın hasarlı bölgesine lokalize olmasını kolaylaştırıcı DNA-bağlayıcı domaini içermektedir (103). PARP-1, tek zincir kırıklarının tamiri (single strand break repair; SSBR), çift zincir kırıklarının tamiri (double strand break repair; DSBR) ve baz eksizyonlarının onarılması (base excision repair; BER) gibi çok sayıdaki DNA tamir

yolaklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. BER'in moleküler mekanizması lokal kromatin gevşemesi aracılığıyla enzimin otomodifikasyonunu içerir. Bu otomodifikasyon, histonların poli-ADP-ribozla kovalent modifikasyonu veya non-kovalent etkileşimleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu durum diğer DNA tamir proteinleriyle iletişimle de regüle edilebilir. Ayrıca PARP-1 veya poli-ADP-riboz hasarlı DNA bölgesinde XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1) gibi tamir proteinlerine doğrudan ihtiyaç duyabilir (67, 68). PARP ailesinin diğer bilinen bir üyesi olan PARP-2 sadece DNA zincirindeki kırılmalarla aktive olmaktadır. PARP-2, tamir sürecinin daha sonraki basamaklarıyla ilişki olduğu düşünülmektedir. DNA onarımındaki rolünün yanında PARP-2'nin spermatogenez, adipogenez ve T-hücre gelişimi gibi çeşitli proseslerde görevi olduğu gösterilmiştir (107). Hücrelerde canlılığın korunması için PARP önemlidir, PARP'ın parçalanması hücrenin bütünlüğünün bozulmasını kolaylaştırır ve bölünmüş PARP ölçümü apoptozise giden hücreler için bir markır olarak görev yapar (74).

#### **2.4. Prostat Kanseri**

Prostat kanseri batı ülkelerde en yaygın nonkutanöz malignite olmaya devam etmektedir ve akciğer kanserinden sonra erkeklerde kanser sonucu ölümlerin ikinci nedenidir (77). Bu istatistiklere rağmen mevcut tedavi yöntemleri ile hastaların yaşam sürelerinin uzatılması konusunda çok az ilerleme kaydedilmiştir (78). Son 20 yıl içinde birçok araştırmacı tarafından prostat kanserinin altında yatan mekanizmayı belirleyebilmek için çok çaba sarf edilmiştir. Bu konuda çok miktarda veri kaydedilmesine rağmen karsinogenez mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (33). Morfolojik olarak prostat kanserinin teşhisi zordur, çünkü malign hastalık ipuçları göze çarpmayabilir ve bu nedenle kanser tanısının atlanması riski de artmaktadır (19). Hastalık organa sınırlı erken dönemde teşhis edildiğinde prostat kanseri radikal prostatektomi, kemoterapi, radioterapi ve hormon tedavisi ile potansiyel olarak tedavi edilebilir. Ancak ilk tedaviden sonra hastalarda nüks etme oranı yaklaşık % 30 olarak hesaplanmıştır (16,83).

Alternatif ilaçlar son 10 yılda büyük önem kazanmıştır. Yaklaşık 30 yıldır kansere karşı kuvvetli bir savaş açılmasına rağmen kansere karşı güvenilir ve kesin bir tedavinin bulunamamış olması toplumu kendi sağlığını korumaya yöneltmiştir. Bu nedenle hastalar hayata tutunabilmek için alışılmamış medikal tedavilere yönelmiştir. Genel popülasyonda sıra dışı/geleneksel olmayan tedavi yöntemlerinin kullanılması son yıllarda önemli ölçüde artış göstermiştir (50).

#### **2.4.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi**

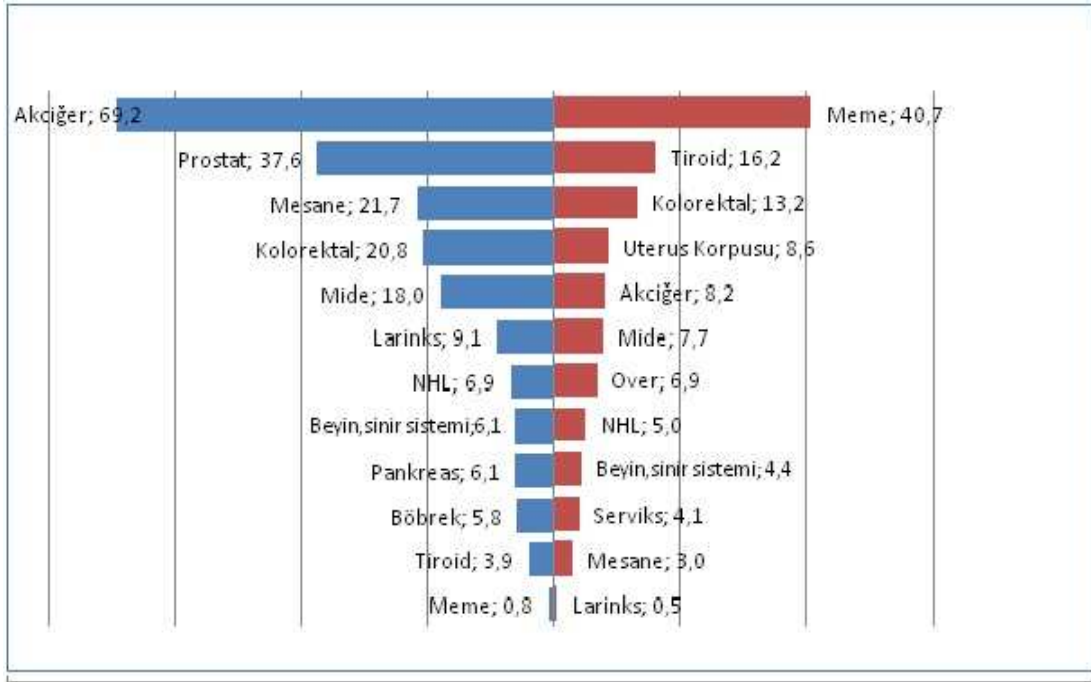
Kanser dünyada kalp hastalıklarından sonra ikinci en yaygın ölüm nedenidir. Amerikan Kanser Derneği 2013 yılında yaklaşık 1.660.290 yeni kanser vakasının teşhis edilmesini öngörmektedir. Yine 2013 yılında 580.350 Amerikalının kanserden ölmesi beklenmektedir ki bu rakam günde yaklaşık 1600 kişi anlamına gelmektedir. Amerikan Kanser Derneğinin 2013 yılı tahminlerine göre erkekler arasında görülme sıklığı en fazla olan kanser türü %28 ile prostat kanseridir ve kanser sonucu beklenen ölümlerde %10 ile akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Tablo 2.3) (4).

**Tablo 2. 3.** Amerika’da 2013 yılı Tahmini Kanser Vakaları ve Ölümler (4)

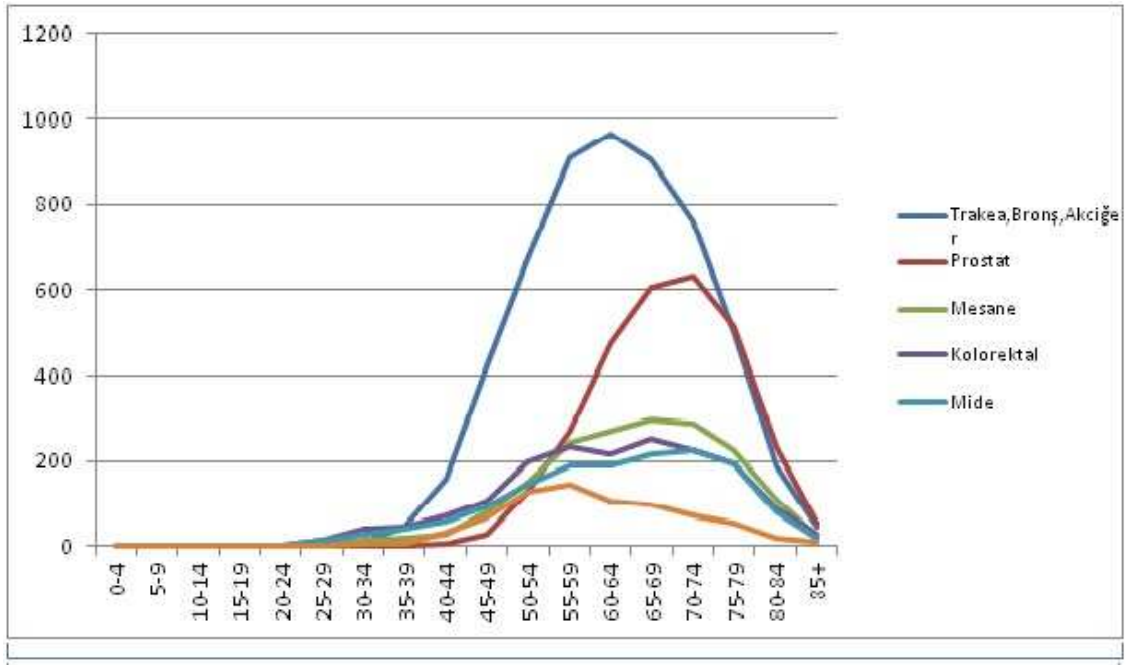
<b>Yeni Kanser Vakaları ve Ölümler – 2013 Tahminleri</b>			
<b>Tahmin edilen yeni vakalar</b>		<b>Tahmin edilen ölümler</b>	
<b>Erkek</b>	<b>Kadın</b>	<b>Erkek</b>	<b>Kadın</b>
Prostat 238,590 (%28)	Meme 232,340 (%29)	Akciğer & Bronşlar 87,260 (%28)	Akciğer & Bronşlar 72,220 (%26)
Akciğer & Bronşlar 118,080 (%14)	Akciğer & Bronşlar 110,110 (%14)	Prostat 29,720 (%10)	Meme 39,620 (%14)
Kolon & Rektum 73,680 (%9)	Kolon & Rektum 69,140 (%9)	Kolon & Rektum 26,300 (%9)	Kolon & Rektum 24,530 (%9)
İdrar kesesi 54,610 (%6)	Corpus uteri 49,560 (%6)	Pankreas 19,480 (%6)	Pankreas 18,980 (%7)
Deri melanomu 45,060 (%5)	Tiroit 45,310 (%6)	Karaciğer & intrahepatik safra kanalı 14,890 (%5)	Yumurtalık 14,030 (%5)
Böbrek & Renal pelvis 40,430 (%5)	Non-Hodgkin lenfoma 32,140 (%4)	Lösemi 13,660 (%4)	Lösemi 10,060 (%4)
Non-Hodgkin lenfoma 37,600 (%4)	Deri melanomu 31,630 (%4)	Yemek borusu 12,220 (%4)	Non-Hodgkin lenfoma 8,430 (%3)
Oral kavite & farinks 29,620 (%3)	Böbrek & Renal pelvis 24,720 (%3)	İdrar kesesi 10,820 (%4)	Corpus uteri 8,190 (%3)
Lösemi 27,880 (%3)	Pankreas 22,480 (%3)	Non-Hodgkin lenfoma 10,590 (%3)	Karaciğer & intrahepatik safra kanalı 6,780 (%5)
Pankreas 22,740 (%3)	Yumurtalık 22,240 (%3)	Böbrek & Renal pelvis 8,780 (%3)	Beyin & sinir sistemi 6,150 (%2)
Tüm bölgeler 854,790 (%100)	Tüm bölgeler 805,500 (%100)	Tüm bölgeler 306,920 (%100)	Tüm bölgeler 273,430 (%100)

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi’nin 25/01/2013 tarihinde yayınlanan raporunda, prostat kanseri 2008 yılında erkeklerde görülen tüm kanserler içerisinde %37,6 oranıyla ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 2.5). Prostat kanseri, insidansı yaşla artan bir hastalık olup, ülkemizde en sık 55-80 yaşlarında görülmektedir (Şekil 2.6).





Şekil 2. 5. Türkiye’de 2008 yılına ait en sık görülen kanser türlerinin insidansları (42)



Şekil 2. 6. Türkiye’de 2008 yılına ait erkeklerde en sık görülen beş kanserin yaşa özel hızları (yüz binde), (42)

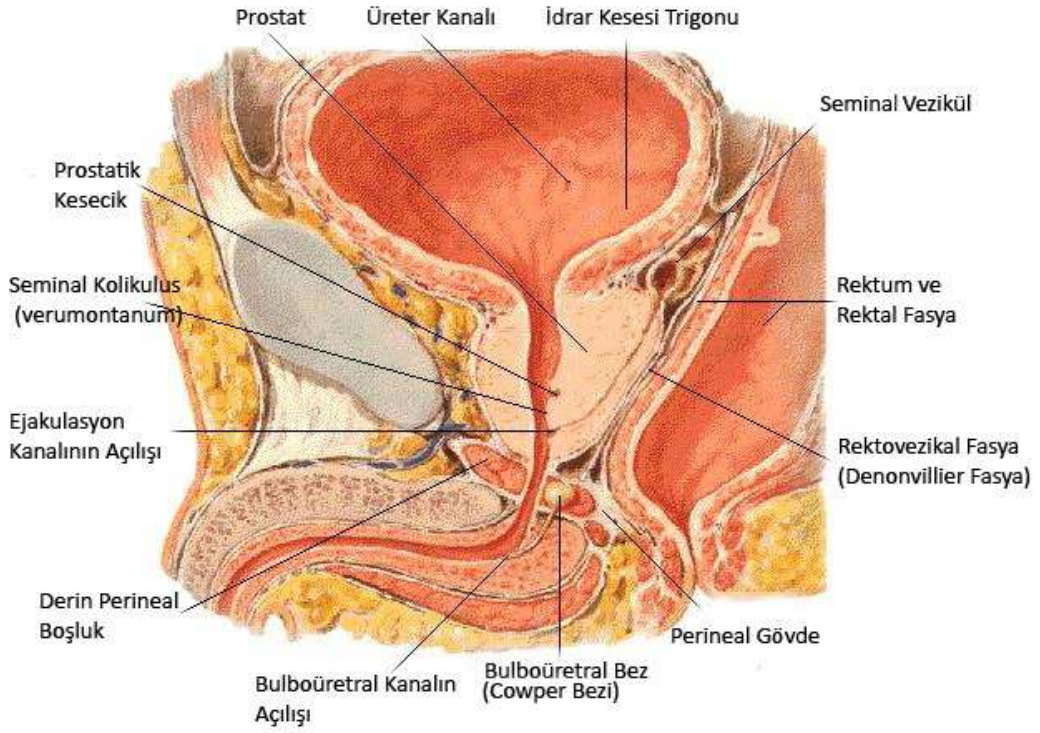
### 2.4.2. Prostat Anatomisi

Prostat mesanenin hemen alt bölümünde bulunan fibromusküler ve glandüler yapıda bir organdır. Normal prostat yaklaşık 18-20 gram ağırlığındadır ve aşağı yukarı 2.5 cm uzunluğundaki posterior üretrayı içerir. Önden puboprostatik bağlar, alt yüzden ürogenital diyaframla desteklenir. Prostata arka yüzden giren ejakülatuvar kanallar veru montanum içinden eğimli geçerek çizgili eksternal üriner sfinkterin hemen proksimalinde posterior üretraya boşalır (Şekil 2.7).

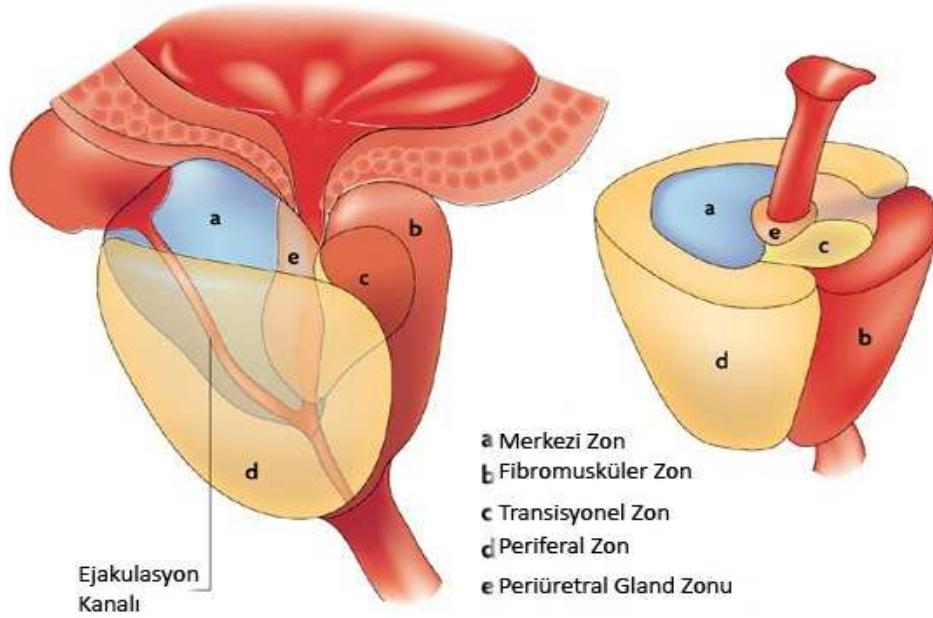
Prostat kanserinin histopatolojik incelemesiyle en iyi prognostik indikatörü Gleason evrelemesidir ancak numune alma sorunları ve morfolojik olarak identik prostat kanser vakalarının farklı şekilde davranmaları nedeniyle gözlemciler arasında evreleme farklılıkları oluşabilmektedir (45).

McNeil'e göre prostatın periferik, santral, transizyonel, preprostatik sfinkterik zonu ve bir anterior segmenti vardır (Şekil 2.8) (70). Prostatın içinden geçen geçen üretra segmentine prostatik üretra denir. İç yüzeyi mesane boynuna doğru devam eden uzunlamasına kas tabakasıyla kaplıdır. Prostat bezi esasen mesanenin dış uzunlamasına kaslarından gelen yoğun düz kas yapılanmasına sahiptir. Bu kas yapılanması erkeklerde arka üretranın gerçek istemsiz düz kas sfinkterini oluşturur.

Prostat bezi senfiz pubis arkasında bulunur. Arküst yüzeyinde vas deferensler ve seminal veziküllerle komşudur. Arka yüzde Douglas çıkmazının serozal kalıntıları olan ürogenital diyaframa kadar uzanan iki Denonvilliers fasyasıyla prostat rektumdan ayrılır (101).



Şekil 2. 7. Prostat glandı (37)



Şekil 2. 8. Prostat Zonları (44)

### 2.4.3. Prostat Kanserinin Etiyolojisi

Prostat kanseri etiolojisi tam olarak bilinmemektedir. Pek çok faktör tek veya beraberce etkili olabilir:

**Familyal Yatkınlık:** Birinci dereceden yakınlarında prostat kanseri olanlarda genel populusyona nazaran 2.1-2.8 kat fazla kanser tespit edilme riski vardır.

**Yaş:** 40 yaşın altındaki erkeklerde görülme sıklığı çok azken yaş ile birlikte insidans gittikçe artarak 70'li yaşlarda en üst seviyeye çıkar (101).

**Diet:** Yağlı dietle beslenenlerde cinsiyet hormonu oluşumunun fazla olduğu ve sirkülasyonda dolaşan androjen seviyesinin yükselmesi sorumlu tutulmuştur. Bu insanlarda prostat kanserinin vejeteryanlara göre 1.5-2 misli fazla görüldüğüne işaret etmiştir. Diyetteki yağ oranının önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalarda yüksek oranda sebze içeren dietlerle veya balıkla beslenenlerde prostat kanser riskinin azaldığı bildirilse de elde edilen kanıtlar henüz ikna edici değildir (58).

**Vazektomi:** Vazektomi ve prostat kanseri arasında bir ilişki olabileceğini gösteren pek çok yayın mevcut ise de, bu olay vazektomi yapılanların düzenli sağlık kontrolüne gitmeleri sonucu 1.5-2 kat daha fazla prostat kanseri tespit edilmesindedir.

**Meslek ve Sosyoekonomik Faktörler:** Kadmiyumla ilgili yerlerde çalışanlarda risk bulunabilmesine rağmen diğer mesleklerin önemli bir etkisi yoktur.

**Hormonlar:** Prostatın kendisi bir endokrin gland olmamakla beraber, embriyolojik gelişimi dahil hayatın her döneminde hormona hassastır. Her türlü hormondan etkilenir ise de, prostatik hücre proliferasyonu ve gelişiminde en önemli ve en etkin olanı androjenlerdir. Huggins ve Hodges'in 1941 yılında metastatik prostat kanserli hastalarda orkiektomi ve östrojen tatbikinin kanseri ve metastazları geriletmesini hatta

geçici olarak yok etmesini göstermesinden beri, prostat kanseri ile androjen-östrojenlerin ilişkisi bilinmektedir (5).

#### **2.4.4. Prostat Kanseri Sınıflaması**

Prostat kanserlerinin %97'si adenokarsinomlar olup %1.5 transizyonel hücreli kanser ve squamöz hücreli kanser olarak epitelyal kaynaklı, %1'i ise nonepitelyal olan sarkomlardan ibarettir. Adenokarsinomlar, glandın periferindeki asinileri döşeyen epitel hücrelerinden kaynaklanırlar (100).

#### **2.5. Doğal Bitkiler ve Kanseri Tedavisi**

Kanseri, tüm dünyada önde gelen ölümlü nedenlerinden birisidir. Kanseri tedavisinde çeşitli kemoterapötikler, sitotoksik ve immünomodilatör ajanlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar çok pahalı olmasının yanı sıra ciddi yan etkilere de sahiptir. Günümüzde Batı tıbbında kanseri tedavisi için sadece sınırlı sayıda bitkisel ürünler kullanılmaktadır. Bununla birlikte kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan taxol ve bazı alkaloidler gibi antikanseri ilaçlar tıbbi bitkilerden elde edilmektedir. Son 50 yıldır kanserin temel biyolojisinin anlaşılması konusunda büyük gelişmeler yaşanmıştır. Bunların en önemlilerinden birisi belirli hücre sinyal yollarının baskılanmasının tümör gelişimini baskılayabileceğinin anlaşılması olmuştur. Bu sinyal yolları şunlardır (1):

- a) NF-κB aktivasyon yolağı
- b) AP-1 aktivasyon yolağı
- c) Proliferasyon ve apoptozis
- d) Büyüme faktör aktivasyon yolağı
- e) JAK-STAT yolağı
- f) Çoklu-ilaç rezistansı
- g) COX-2
- h) Anjiogenezis
- i) Siklinler

Bundan yaklaşık 200 yıl önce bir bitkiden ilk farmakolojik olarak aktif bir bileşik izole edildi; haşhaş kabuğunda üretilen morfin. Bu durumla birlikte bitkilerden ilaçların üretilmesi, denenmesi ve uygulanabilir etkin dozları üzerinde çalışmaların yapıldığı bir dönem başladı. İkinci dünya savaşından sonra penisilin keşfi nedeniyle mikroorganizmalardan yeni antibiyotikler üzerine geniş çaplı araştırmalar gerçekleştirildi. 1990'larda ilaçların yaklaşık %80'i ya doğal ürünlerdi ya da onlardan esinlenerek üretilen analoglarıydı. Antibiyotikler (ör; penicillin, tetracycline, erythromycin), antiparasitikler (ör; avermectin), antimalaryaller (ör; quinine, artemisinin), lipid kontrol ajanları (ör; lovastatin ve analogları), organ transplantasyonu için immünoşpresanlar (ör; cyclosporine, rapamycins) ve antikanser ilaçlar (ör; taxol, doxorubicin) tıpta bir devrim yarattı. 20. yüzyılın başlarında ortalama yaşam süresi 40 yıl iken bugün 77 yıla kadar çıkmıştır. (36,61). Tıbbi ve farmakolojik olarak aktif içeriklerinden dolayı bitkilere olan ilgi hızla artmaktadır. Bitkiler, alkaloidler, fenoller, flavanoidler ve terpenoidler veya izoprenoidler gibi çok fazla doğal bileşik içermektedirler. Bu doğal bitkisel ürünlerin antibakteriyel, antifungal, insektisit ve herbisit gibi çeşitli kullanışlı biyolojik aktivitelerdeki rolleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır (20).

Ayurveda hastalıkların önlenmesi ve tedavisi, bedensel ve ruhsal sağlığın korunması gibi tıbbi uygulamaları ve inançları içeren geleneksel bir Hint ilaç sistemidir ve yerli kültürün bir parçasıdır. Yaklaşık 25 asır önce Hipokrat 'Bırak yiyeceğin ilacın ve ilacın yiyeceğin olsun' demiştir (1).

Ayurvedik tıbbi ürünler yüzyıllar boyunca zamanla test edilmişlerdir ve son zamanlardaki kimyasal, farmakolojik ve klinik araştırmalar ile de birçok bitkisel ürünün yararlı özellikleri ve kullanılabilir olduklarını kanıtlanmıştır (79). Ayurvedik tıpta kullanılan bileşenler tek bir ilaç molekülü olarak veya bir bütün olarak yeni farmasötik bileşiklerin ve çok modelli (batı ve ayurvedik tedavi kombinasyonu) tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için bir temel sağlamaktadır. İlaç keşfinin nihai hedefi güvenli ve etkili çözümler üretmektir. Bitkisel veya bitkilerden üretilen geleneksel Hint ve Çin ilaçlarının ortaya koyduğu büyük başarı daima ilgi çeken bir yaklaşım olmuştur.

Ayurvedik bitkiler ya da kanıtlanmış bitkisel formülasyonlar standart ilaç keşfi için bir zemin hazırlamıştır. Gerçekten de gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere birçok ülkedeki ilaç şirketleri yalnızca geleneksel ilaç olarak bilinen terapötik yöntemlerden umut verici yeni stratejiler benimsemektedirler. Çok sayıdaki ayurvedik ilaç keşfinin potansiyel yararları öngörülmesine rağmen önceden mevcut olan standardize yaklaşımlarla ilaç keşfindeki büyük zorluklar nedeniyle radikal değişiklikler gereklidir (7, 46).

### **2.5.1. Acorus Calamus (Hazanbel Otu)**

Acoraceae ailesi yaklaşık 110 cins ve 1800'den fazla tür içeren geniş bir ailedir. Aile üyeleri köksaplı veya yumrulu bitkilerdir. Dere ve göl kıyıları ile nemli ve bataklık bölgelerde yetişir (86). *Acorus calamus* Linn (AC) Acoraceae ailesine üye bir bitkidir ve ülke ve yöreye bağlı olarak çok farklı adlandırmaları bulunmasına rağmen genellikle 'tatlı kamyş', 'eğir kökü' veya 'hazanbel otu' olarak bilinmektedir. İbni Sina (980-1037) el-Kânûn fi't-Tıbb" (Tıp Kanunu) adlı eserinde bu bitkiden 'azak eğiri' olarak bahsetmiştir (106). Hindistan ve Çin'de bu bitkinin tıbbi amaçla kullanımı çok uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Kokulu yaprak ve kökleri geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır. Bu bitkiden elde edilen yağ oksijenize seskiterpenler bakımından eşsiz bir kaynaktır. Kurutulmuş toz haline getirilmiş kökleri acı bir tada sahiptir ve zencefil, tarçın ve Hindistan cevizi yerine koku verici olarak kullanılmaktadır.

Hazanbel otu doğu ülkelerinde oldukça yaygın olmakla birlikte menşeinin Hindistan veya Arabistan olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca Avrupa, Güney Rusya, Kuzey Küçük Asya, Çin, Japonya, Burma, Sri Lanka, ve Kuzey Amerika başta olmak üzere birçok ülkede bulunmaktadır. Hazanbel otu uzun dallı, silindirik köklü, yaklaşık 2 cm çapında, yaprakları 0.7-1.7 cm genişliğinde, pürüzsüz, sarı-yeşil renklere çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 2.9) (8).



Şekil 2. 9. Acorus calamus bitkisi (39)

#### TAKSONOMİ

Alem: Plantae

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Liliopsida

Takım: Acorales

Aile: Acoraceae

Cins: Acorus

Tür: A. calamus

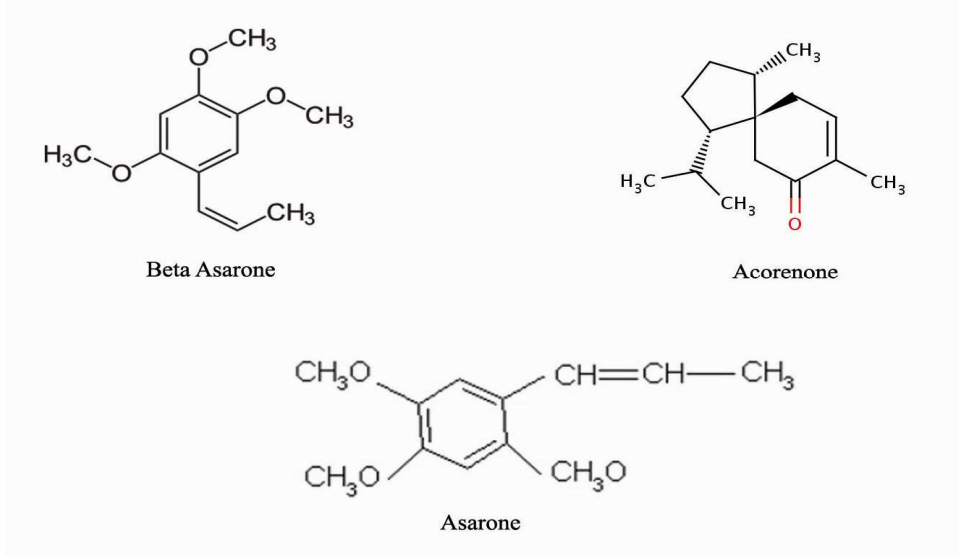


Hazanbel otu Hindistan ve Çin’de geleneksel şekilde; emetik ve mide koruyucu olarak, dispepsi, kolik ağrı, azalıp çoğalan ateş, nervöz şikayetler, bronşit ve dizanteri tedavilerinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin kökü ve elde edilen yağlarla yapılan çalışmalarda antifungal, antibakteriyel, antiselüler ve immüno-supresif, antidiyareik, dislipidemik, nöroprotektif, antioksidan, hipolipidemik ve yara iyileşmesi üzerine etkileri bulunmuştur (20,47,95).

Gittikçe artan bir şekilde bireyler tamamlayıcı ve alternatif tedaviyi benimsemektedir, bu nedenle şifalı bitkilerden üretilen ürünlerin klinik olarak güvenli ve faydalı olduklarının tespiti önemlidir. Bitkisel preparatların standardizasyonu, bilinen aktif bileşenlerinin optimal konsantrasyonlarının bildirilmesi ve aktivitelerinin korunması önemlidir. Doğu ülkelerinde geleneksel şekilde birçok hastalık için kullanılmalarına rağmen batıda bitkisel ilaçlar esas olarak gaz, şişkinlik, kolik ve zayıf sindirim işlevi gibi sindirim problemleri için kullanılmaktadır. Az miktarda kullanıldığında mide asiditesini azaltırken fazla miktarda kullanımının yetersiz asit üretimini artırması aynı bitkinin farklı dozlarının farklı sonuçlara neden olabileceğine iyi bir örnektir. Ekstrak iyi bir sedatif özelliğe sahiptir ve epilepside kullanılır, bunun yanında kediotu ve hint sümbülü bitkileriyle birlikte iyi bir sakinleştirici özelliği vardır. Eğir kökünden izole edilen lektinlerin mitojenik aktiviteye gösterdikleri ve farelerde kanser hücrelerinin büyümeleri üzerine potansiyel inhibitör etkileri gösterilmiştir (6,8).

Hazanbel otunun temel bileşenleri monoterpenler, seskiterpenler, fenilpropanoidler, flavanoidler, quinin ve uçucu bileşiklerden  $\alpha$ - ve  $\beta$ -asarone’dur (55). Kök sapsarı da şeker ve yağ asitleri içeriği ve kompozisyonu bakımından incelenmiştir. Karışık yağ asitlerinin kompozisyonu gaz kromatografi (GC) ile analiz edilmiş, metil ester içerikleri; myristic (%1.3), palmitic (%18.2), palmitoleic (%16.4), stearic (%7.3), oleic (%29.1), linoleic (%24.5) and arachidic (%3.2) olarak bulunmuştur. Şeker içerikleri kağıt kromatografisiyle belirlenmiş ve gerçek örnekler kullanılarak doğrudan karşılaştırma yapılarak teyit edilmiştir. Dansitometreyle belirlenen şeker oranları; maltoz (%0.2), glukoz (%20.7) ve fruktoz (%79.1) olarak bildirilmiştir. Acorus calamusun esansiyel yağ kompozisyonu GC ve GC/MS ile analiz edilmiş. Kurutulmuş

köksaplarında yağ içeriği %1.20 ±0.12, yapraklarında ise %0,56 ile %1,01 aralığında bulunmuştur. Beta-asarone %27.4-%45.5'lik oranıyla yapraklardaki majör bileşen olmakla birlikte köksaplarında %20.86 ile acorenone en fazla bulunan bileşendir, bunu %12.75'lik oranla isocalamendiol izlemektedir (Şekil 2.10). Monoterpen hidrokarbonların yanı sıra sequestrine ketonlar, (trans- or alfa) Asarone (2,4,5-trimetoksi-1- propenilbenzen), ve Beta-asarone (cis- izomer) ve öjenol de tespit edilmiştir (8).



Şekil 2. 10. Acorus calamus bitkisinde bulunan majör kimyasal bileşenler (81)

Acorus calamus bitkisinden tanımlanan bileşikler şu şekilde sıralanabilir;

### Fenilpropanoidler:

- isoöjenol metil eter,
- $\gamma$ - asarone (1,2,4-trimetoksi-5(2- propenil)benzen),
- cis-asarone (cis-1,2,4-trimetoksi-5(2-propenil) benzen),
- Trans-asarone (trans-1,2,4-trimetoksi-5(2-propenil)benzen,
- Acoramone (1,2,4-trimetoksi-5(2-propanoil)benzen (veya) 1(2,4,5 trimetoksifenil)-propan-2-one),

- asarylaldehyde (2,4,5-trimetoksi benzalhid), Z-3-(2,4,5trimetoksi fenil)-2-propenal,
- 2,3-dihidro-4,5,7-trimetoksi-1-etil-2-metil-3-(2,4,5-trimetoksi fenil)inden.

### **Seskuiterpenler:**

- Shyobunone,
- Epishyobunone,
- 2,6-diepishyobunone,
- Isocalamendiol,
- Acoragermacrone,
- Preisocalamendiol,
- Calamusenone.

### **Monoterpenler:**

- $\alpha$ - ve  $\beta$ -pinenler,
- myrcene,
- Cymene-para,
- Terpinen-alfa,
- Phellandrene-beta,
- Terpinene-gamma,
- Terpinolene,
- Thujane,
- Limonene.

**Ksanton glikozitler:**

- 4, 5, 8-trimetoksi ksanton-2-O-  $\beta$  -D-glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)-O-  $\beta$  -D-galaktopiranozid.

**Flavon:**

- 5, 7-dihidroksiflavonol (Galangin)

**Lignan:**

- Acoradin

**Steroid:**

- $\beta$  -Sitosterol

**İnorganik içerik:**

- okzalat ve kalsiyum

**Triterpenoid saponinler:**

- 1  $\beta$ , 2  $\alpha$ , 3  $\beta$ , 19  $\alpha$  -tetrahidroksiurs-12en-28-oicasit-28-O { -  $\beta$  -D-glukopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)}  $\beta$  - D- galaktopiranozid,
- 3  $\beta$ , 22  $\alpha$ , 24, 29-tetrahidroksiolean-12-en-3-O-{-  $\beta$  -D arabinosil(1 $\rightarrow$ 3)}-  $\beta$  -D-arabinopiranozid (81).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre kültürünün yapılması

Hücre kültürü fizyolojik ve patolojik olayların araştırılması, sinyal mekanizmalarının açıklanması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarının aydınlatılabilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çoğu hücre kültürleri için %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile temel olarak hiperoksit nemli bir ortamdır. Hücreler bu in vitro ortama uyum sağladığı sürece gelişir ve çoğalırlar. Çalışmamızda insan prostat kanser hücre dizisi (LNCaP, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bayram YILMAZ'ın armağanıdır) kullanılmıştır.

##### 3.1.1. Kültür için yapılan hazırlıklar

Toz halinde steril şişelerde bulunan Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, Sigma) bir litrelik steril ve deiyonize su içine eklenerek çözüldü. Bu besi ortamı, önceden steril edilmiş şişelere 0,22 mikrolitrelik filtrelerden enjektör yardımı ile geçirilerek sterilize edildi ve buzdolabında +4 °C'de saklandı. Fetal dana serumu (Fetal calf serum = FCS, Sigma) ve penisilin + streptomisin (Sigma) 3 ml'lik hacimlere bölünerek buzdolabında -20 °C'de saklandı. Acorus calamus kökünün etanolik ekstraktından 0,384 gram tartılarak 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözüldü ve üzerine 2 ml RPMI-1640 medium ilave edilerek 128.000 µg/ml'lik stok çözelti hazırlandı. Her deneyden önce taze olarak hazırlanan bu stok çözeltiden deneyde kullanılacak ekstrakt dozları yine RPMI-1640 medium ile dilüe edilerek hazırlandı. Dilüe edilerek hazırlanan dozlarda DMSO oranı %1'den daha az olacak şekilde belirlendi.

### **3.1.2. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması**

Canlı olarak kültür flaskı içerisinde getirilen hücreler mediumu değiştirilerek bir gece inkübatörde bekletildi. Daha sonra RPMI-1640, %10 FCS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika ve 4 °C'de 5 dakika döndürüldü. Üstteki medium atılarak dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekilerek 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve %100 nem içeren inkübatöre kondu. İnkübatörde bulunan flasklar, ilk iki gün yerinden oynatılmamak koşuluyla, kuluçka süresince inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları gözlemlendi. Eskiye besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak, içerisinde 0.1 mL penisilin + streptomisin, 1mL FCS ve 8.9 mL RPMI-1640 bulunan besiyeriyle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra deneye alındı.

### **3.2. Etanolik Eksrakt Hazırlanması**

Acorus calamus kökünün etanolik ekstraktı Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde (AÜBİBAM) hazırlandı. 30 g kurutulmuş ve toz haline getirilmiş bitki kökü 250 ml %70 etanol ile 12 saat ekstre edildi. Ekstrelerdeki etanol vakum altında uzaklaştırılarak kalan sulu ekstreler liyofilizasyon yöntemi ile kurutuldu. Eğir otu kökü etanol ekstresinin verimi %28.29 olarak bulundu.

### **3.3. Hücre sayısını belirleme yöntemleri**

Hücre sayısını belirlemek için tripan mavisi ile boyama yöntemi ve XTT yöntemi uygulandı.

### 3.3.1. Tripan mavisiyle boyama

Tripan mavisiyle boyama yönteminde ölü hücreler tripan mavisi ile boyanırken, canlı hücreler hücre zarları sağlam olduğu için boya ile boyanmamaktadır. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Daha sonra flasklar  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda kalan hücreler 5 dakika %0,25 tripsin (Sigma) ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve +4 °C'de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte alan sıvı kısım atıldı ve sayım kabı içerisine 0,2 mL altta kalan iyice karıştırılan hücre çözeltisinden, 0,3 mL HBSS ve en son 0,5 mL tripan mavisi (Sigma) koyarak 1 mL'ye tamamlandı. Beş dakika beklendikten sonra sayım kabı içinden alınan 10 µL örnek CEDEX XS (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science) marka hücre sayım aletinde sayılarak 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi.

### 3.3.2. XTT

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra flask tabanında kalan hücreler tripan mavisiyle boyama yöntemi ile sayılarak 1 ml'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi ve her bir kuyucuğa  $1 \times 10^4$  hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat ayrı ayrı 0, 250, 500, 750, 1000, 1250 µg/ml ekstrakt dozları ile muamele edildikten sonra 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-suülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolium hidrokisit (XTT) yöntemi uygulandı.

Ekstraktın hücreler üzerindeki sitotoksitesisi Scuderio P.A. tarafından tanımlanan XTT (Cell Proliferation Kit, Biological Industries) spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (92). Her 200 µl besiyeri için 100 µl XTT çözeltisi eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından 450 nm'de oluşan suda çözünebilir formazan boya absorbansı okuması Trinity Biotech Captia Reader cihazında yapıldı. (Trinity Biotech PLC, Bray CO. Wicklow, IRELAND). Canlı hücrelerin

mitokondrisinde oluşan ve XTT ürünü olan suda çözünebilir formazan yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden, ekstrakt verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

XTT yöntemiyle elde edilen sonuçlarla çizilen grafikten LNCaP hücreleri için IC50 değeri hesaplandı ve ekstraktın apoptozis ve anjiogenez üzerine olan etkilerini belirleyebilmek için IC50'nin altında iki konsantrasyon ile IC50'ye çok yakın bir konsantrasyon olmak üzere üç farklı doz belirlendi.

### **3.4. Bölünmüş PARP Ölçümü**

PARP 116 kDa'luk bir nükleer poli-ADP-riboz polimeraz'dır ve çoğunlukla çevresel strese karşı DNA tamirinde görev alır. İnsanlarda PARP yıkılımı Asp214 ve Gly215 arasında gerçekleşir. PARP'ın parçalanması hücrenin bütünlüğünün bozulmasını kolaylaştırır ve apoptozise giden hücreler için bir markır olarak görev yapar.

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra flask tabanında kalan hücreler tripan mavisıyla boyama yöntemi ile sayılarak 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi ve her bir kuyucuğa  $1 \times 10^5$  hücre gelecek şekilde 24 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. 24 saat sonra LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat ayrı ayrı 0, 250, 500, 750 µg/ml ekstrakt dozları ile muamele edildi. Medium uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı, 0.5 ml soğuk 1mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF) içeren lizis buffer eklendi ve 5 dk buz üzerinde bekletildi. Lizise uğramış hücreler başka bir tüpe alındı ve buz üzerinde sonike edildi.



10 dk +4 °C’de santrifüj edildikten sonra hücre lizatı bulunan süpernatant başka bir tüpe alınarak –80 °C’de çalışılıncaya kadar (1 hafta) saklandı. Hücre lizatından PARP ölçümü için PathScan Cleaved PARP (Asp 214) Sandwich ELISA Kiti (Cell Signaling Technology Inc) kullanıldı. Elisa prosedürü şu şekildeydi:

1. Kit içerisinde bulunan 100 µl numune dilüenti üzerine 100 µl hücre lizatı eklenip 10 saniye vorteksle karıştırılarak dilüe edildi.
2. Dilüe edilen hücre lizatından 100 µl alınarak kuyucuklara pipetlendi ve üzeri kapatılarak +4 °C’de gece boyu (16 saat) inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonuyla 4 kez yıkandı.
4. 100 µl detection antibody ilave edilerek 1 saat 37 °C’de inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonuyla 4 kez yıkandı.
6. 100 µl HRP-linked secondary antibody ilave edilerek 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonuyla 4 kez yıkandı.
8. 100 µl TMB-substrat ilave edilerek 10 dakika 37 °C’de inkübe edildi.
9. 100 µl Stop solüsyonu konularak reaksiyon durduruldu.
10. 450 nm’de 3 ölçüm sonucunun absorbanlarının ortalamaları alınarak PARP oranları belirlendi.

### 3.5. VEGF-A Protein Düzeyinin Ölçümü

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra flask tabanında kalan hücreler tripan mavisıyla boyama yöntemi ile sayılarak 1 ml’de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi ve her bir kuyucuğa  $1 \times 10^5$  hücre gelecek şekilde 24 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. 24 saat sonra LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat ayrı ayrı 0, 250, 500, 750 µg/ml ekstrakt dozları ile muamele edildi. Besiyeri ayrı bir tüpe alındı ve flasklarda kalan hücreler 5 dakika %0,25 tripsin (Sigma) ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve besiyeri bulunan tüpe aktarılarak +4 °C’de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. Santrifüj sonrası mediumdan VEGF-A protein düzeyini ELISA yöntemi ile çalışmak

üzere ayrı ayrı toplanarak kapaklı bir tüpe alındı ve -80 °C'de çalışılıncaya kadar (1 hafta) saklandı. Hücre pelleti Real Time PCR tekniği ile VEGF-A tayininde kullanıldı. VEGF-A protein ölçümü için eBioscience Human VEGF-A ELISA Kiti (Bender MedSystems GmbH, Austria) kullanıldı. ELISA ölçüm prosedürü şu şekildeydi:

1. Mikrokuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı.
2. 50 µl numune dilüenti ve 50 µl numune ile standartlar kuyucuklara pipetlendi.
3. Plağın üzeri kapatılarak 2 saat oda ısısında shakerda 400 rpm'de inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonuyla 6 kez yıkandı.
5. 100 µl Biotin-konjugat ilave edilerek 1 saat oda ısısında shakerda 400 rpm'de inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonuyla 6 kez yıkandı.
7. 100 µl Streptavidin-HRP ilave edilerek 1 saat oda ısısında shakerda 400 rpm'de inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 400 µl yıkama solüsyonuyla 6 kez yıkandı.
9. 100 µl TMB substrat ilave edilerek 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.
10. 100 µl Stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.
11. 450 nm'de okuma yapılarak VEGF konsantrasyonları belirlendi. Sonuçlar pg/ml olarak verildi.

### **3.6. Real Time-PCR (RT-PCR) Tekniği ile VEGF-A tayini**

Deney süresi sona erdiğinde hücreler kuyucuklardan toplandı ve santrifüj işlemi ile pellet haline getirildi. Hemen sonrasında RNA izolasyonu işlemine geçildi.

### 3.6.1. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için RNeasy protect mini kit 50 ve cDNA sentezi için QuantiTect Reverse Transcription cDNA kiti (Qiagen, Manheim, Germany) kullanılmıştır.

1. Pellet 600 µl Buffer RLT+6 µl β-mercaptoethanol (β-ME) çözeltisi içerisinde vortex ile karıştırıldı ve homojenize edildi.

2. Homojenizasyon işleminden sonra 3 dakika 13.000 rpm devirde santrifüj edildi.

3. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve üzerine 600 µl %70'lik etanol eklendi. Daha sonra pipetle dikkatli bir şekilde karıştırıldı.

4. Ependorf tüpü içerisindeki süpernatanın 700 µl'si kolonlara (RNeasy mini spin colon 2 ml) yüklendi. Daha sonra 20 saniye 8.000 g'de santrifüj edildi ve alttaki toplama tüpünde kalan süzüntü döküldü. Süpernatanın geri kalanı tekrar kolonlara yüklendi ve yeniden 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirildi kolonlara (RNeasy mini spin colon) 700 µl Buffer RW1 eklendi. Böylece kolon istenmeyen parçalardan temizlenmiş oldu. Sonra 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

6. Altteki toplama tüpü döküldü ve kolon üzerine 500 µl Buffer RPE eklenip 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

7. Aynı işlem tekrarlanarak 2 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

8. Alttaki toplama tüpü döküldü ve kuruması için 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.

9. Alttaki toplama tüpü atıldı ve kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklendi ve 1 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

10. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80 °C’de saklandı.

### 3.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA’nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 1,5 µl RNA (Thermo Scientific, Nanodrop 1000, USA) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

### 3.6.3. cDNA Sentezi

Önce genomik DNA (gDNA) uzaklaştırmak için tablo 3.1’de gösterildiği gibi toplam hacim 14 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve Thermal Cycler PCR’da (Qiagen, Manheim, Germany) 42 °C’de 2 dk olacak şekilde programlanıp gDNA uzaklaştırıldı.

**Tablo 3. 1.** gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.

<b>Karışım</b>	<b>Miktar ( µl )</b>
gDNA wipeout	2
Örnek RNA’sı	X
RNAase free water	12- X
<b>Toplam</b>	<b>14</b>

gDNA'sı uzaklaştırılmış örnekler, tablo 3.2'de gösterilen oranlarda hazırlanan karışımdan 6 µl eklenerek Thermal Cycler PCR'da 42 °C'de 15 dk ve 4 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanıp cDNA oluşturuldu.

**Tablo 3. 2.** cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.

<b>Karışım</b>	<b>Miktar ( µl )</b>
Quantiscrypt Reverse Transcriptase	1
Quantiscrypt RT Buffer 5X	4
RT primer mix	1

Thermal cycler koşulları;

42 °C'de 15 dk

4 °C'de 10 dk

#### **3.6.4. RT- PCR**

VEGF-A (hedef gen) ve GAPDH (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak Roche Nano Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile ölçüldü. RT-PCR için tablo 3.3'deki karışım hazırlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

**Tablo 3. 3.** RT PCR için miks içeriği.

<b>Karışım</b>	<b>Miktar ( µl )</b>
Reconstituted primer /probe miks (iNOS veya GAPDH)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade water	4
<b>cDNA</b>	<b>5</b>
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

Toplam 20 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C’de	10 dk	} 50 döngü
95° C’de	20 sn	
55° C’de	30 sn	
72° C’de	20 sn	

Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software ile analiz edildi.

### **3.6.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması**

VEGF-A (hedef gen) ve GAPDH (referans gen) primer dizileri Gene Research laboratories (PrimerDesign, U.K) tarafından dizayn edildi. NCBI Gene veritabanı erişim numaraları ve ampikon uzunlukları tablo 3.4’de verilmiştir.

**Tablo 3. 4.** Çalışmada kullanılan iNOS primerinin dizileri, Tm dereceleri.

Gen	No		Oligonükleotid Dizisi	Tm
VEGF-A	NM_001025366	Sense Primer	CCAGGAAAGACTGATACAGAACG	7,6
		Anti-Sense Primer	GGTTTCTGGATTAAGGACTGTTC	5,9

### 3.7. Deney grupları I

Acorus calamus etanolik ekstraktının hücre çoğalması üzerindeki etkisinin XTT yöntemi ile belirlenmesi için aşağıda belirtilen gruplar oluşturuldu. Belirtilen ekstrakt konsantrasyonları LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat ayrı ayrı uygulandı. 24 saat için her grup 8 örnek ve 48 saat için de her grup 8 örnek olacak şekilde oluşturuldu ve 3'er kez tekrar edilerek toplamda her grup için 24 tekrar gerçekleştirildi.

1. grup : Kontrol grubu, sadece besiyeri uygulandı.
2. grup : 250 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=24)
3. grup : 500 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=24)
4. grup : 750 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=24)
5. grup : 1000 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=24)
6. grup : 1250 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=24)

### 3.8. Deney grupları II

XTT ölçümü sonucu canlı hücre sayısı ile kullanılan ekstrakt dozları arasında grafik çizildi. Hücrelerin %50'sinin inhibe olduğu konsantrasyon (IC50) değeri olarak 732,76 µg/ml belirlendi, ardından acorus calamus etanolik ekstraktının hücrenin apoptozis ve anjiogenezisi üzerindeki etkileri PARP ve VEGF-A ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi için aşağıda belirtilen gruplar oluşturuldu. Belirtilen ekstrakt konsantrasyonları LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat ayrı ayrı uygulandı. 24 saat için her grup 3 örnek ve 48 saat için de her grup 3 örnek olacak şekilde oluşturuldu.

1. grup : Kontrol grubu, sadece besiyeri uygulandı.
2. grup : 250 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=3)
3. grup : 500 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=3)
4. grup : 750 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=3)

### 3.9. İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistics Program for Social and Science) programı ile gerçekleştirildi. Çalışmada yapılan bütün ölçümler üç kez tekrar edildi ve sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda one-way ANOVA varyans analizi uygulandı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.



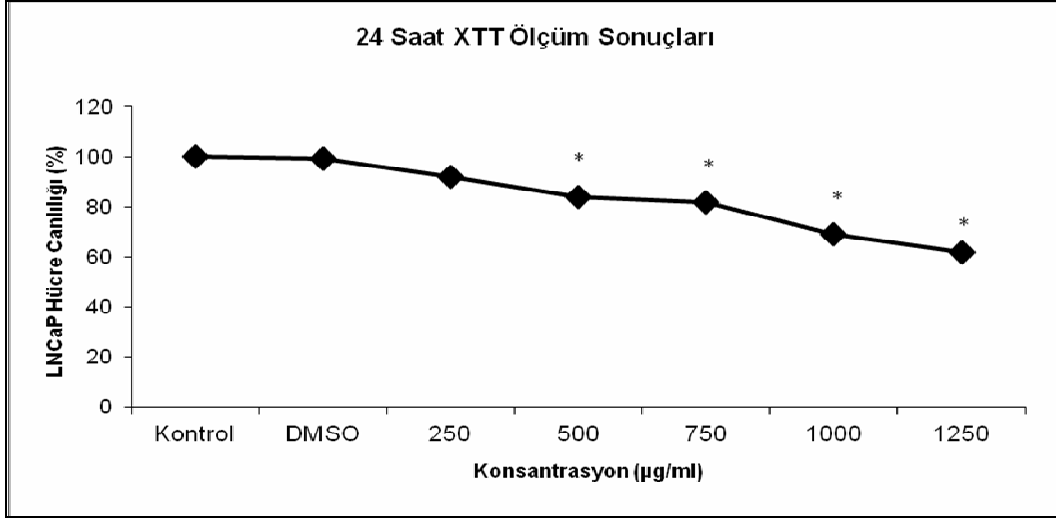
## 4. BULGULAR

### 4.1. Ekstraktın hücre canlılığına etkisi

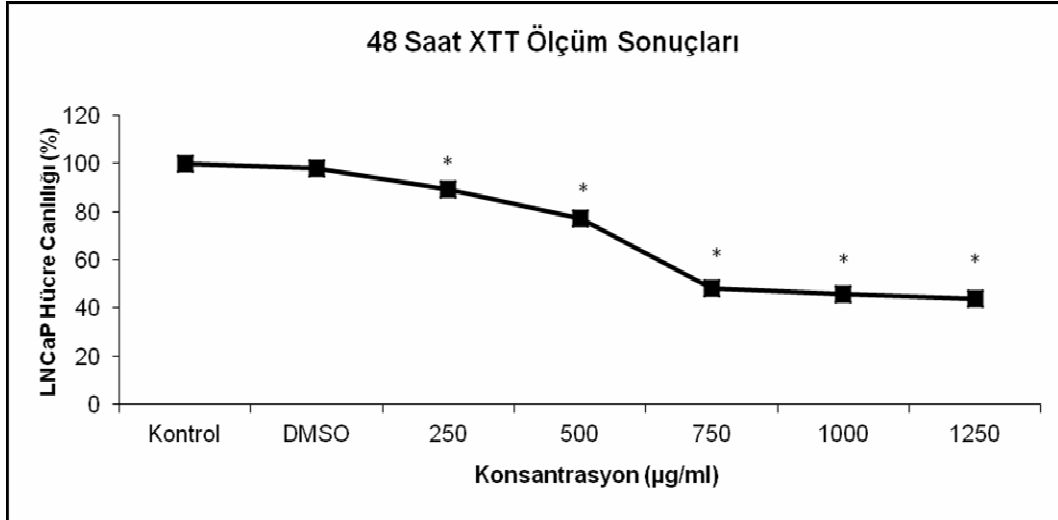
Ekstraktın hücre canlılığı üzerine olan etkisi XTT yöntemiyle belirlendi. Çözücü olarak kullanılan en yüksek %1 oranında bulunan DMSO hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadı. LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle 250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml ekstrakt uygulaması sonucunda elde edilen yaşayan hücre oranları kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %92, %84, %82, %69 ve %62 olarak hesaplandı (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). 48 saatte ise 250, 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml ekstrakt dozlarında elde edilen yaşam oranları kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %89, %77, %48, %46 ve %44 olarak bulundu (Tablo 4.1 ve Şekil 4.2). Bu sonuçlara göre 48 saat için IC50 değeri 732,76 µg/ml olarak bulundu.

**Tablo 4. 1.** Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre \*: p<0.001.

Gruplar	Yaşayabilen hücre oranı (%±SD)	
	24 saat	48 saat
Kontrol	100±10,9	100±8,6
DMSO	99±9,1	98±8,9
250 µg/ml	92±5,9	89±8,3*
500 µg/ml	84±8,8*	77±8,4*
750 µg/ml	82±6,3*	48±3,1*
1000 µg/ml	69±7,9*	46±2,8*
1250 µg/ml	62±5,3*	44±3,6*



**Şekil 4. 1.** Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.001$ .



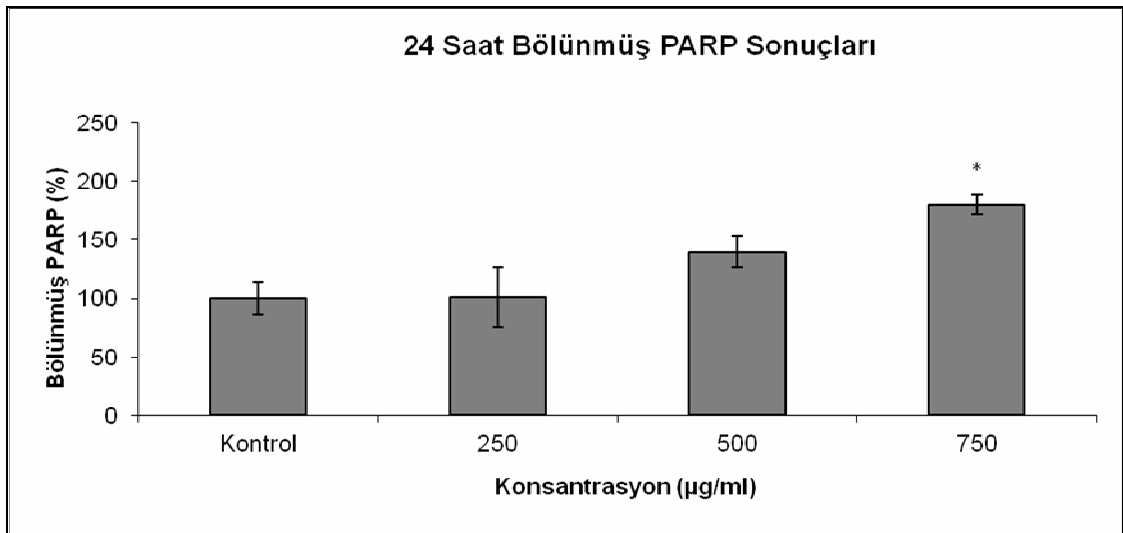
**Şekil 4. 2.** Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.001$ .

## 4.2. Ekstraktın Bölünmüş PARP Düzeyleri Üzerine Etkisi

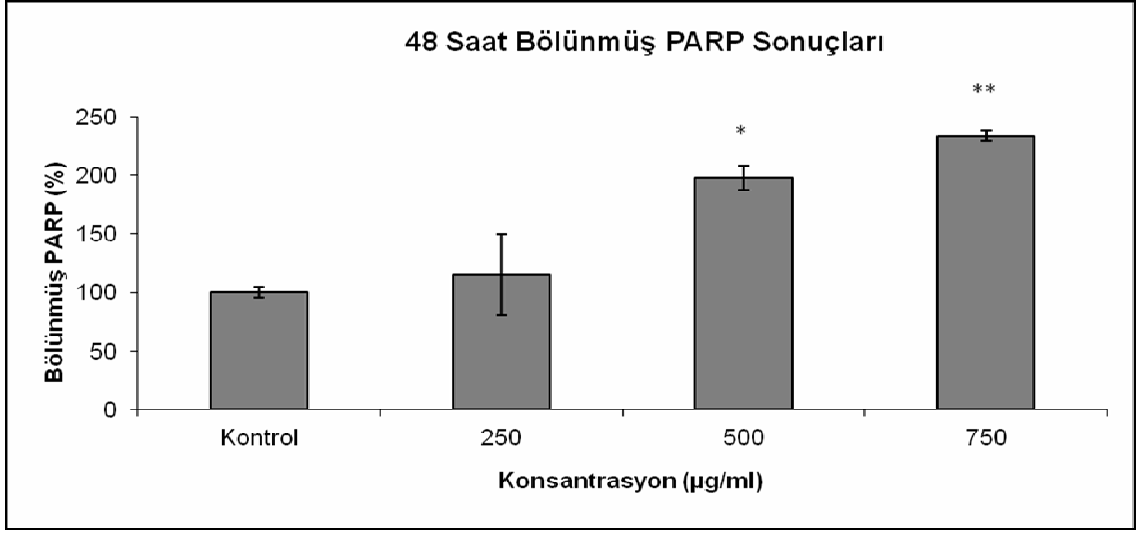
LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle 250, 500 ve 750 µg/ml ekstrakt uygulaması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP miktarı kontrol grubuyla oranlandığında sırasıyla %101, %140 ve %180 olarak hesaplandı (Tablo 4.2 ve Şekil 4.3). 48 saatte ise 250, 500 ve 750 µg/ml ekstrakt dozlarında kontrol grubuna oranla elde edilen bölünmüş PARP düzeyleri %115, %198 ve %244 olarak bulundu (Tablo 4.2 ve Şekil 4.4).

**Tablo 4. 2.** Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP yüzdeleri. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.01$ . \*\*:  $p < 0.001$ .

Gruplar	24 saat (%±SD)	48 saat (%±SD)
Kontrol	100±13,9	100±4,5
250 µg/ml	101±25,6	115±34,8
500 µg/ml	140±13,5	198±10,1*
750 µg/ml	180±8,7*	244±3,3**



**Şekil 4. 3.** Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP yüzdeleri. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.01$ .



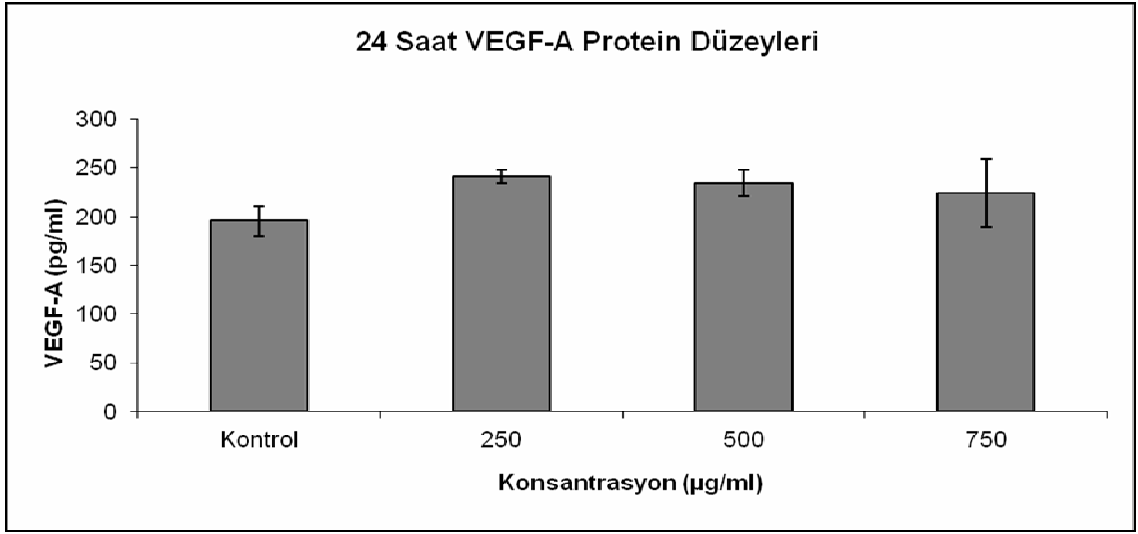
**Şekil 4. 4.** Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda ölçülen bölünmüş PARP yüzdeleri. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ .

### 4.3. Ekstraktın VEGF-A Protein Düzeyleri Üzerine Etkisi

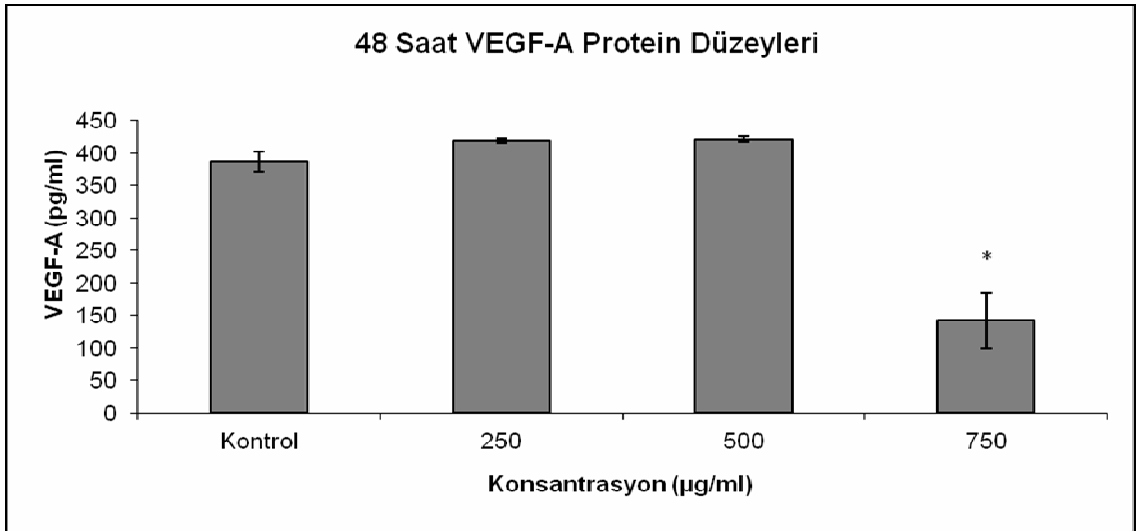
LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle kontrol, 250, 500 ve 750 µg/ml ekstrakt uygulaması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları sırasıyla 195, 240, 234 ve 223 pg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.3 ve Şekil 4.5). 48 saatte ise 0, 250, 500 ve 750 µg/ml ekstrakt dozlarında VEGF-A protein düzeyleri sırasıyla 387, 418, 421 ve 142 pg/ml olarak bulundu (Tablo 4.3 ve Şekil 4.6).

**Tablo 4. 3.** Kontrol grubu ve farklı dozlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.001$ .

Gruplar	VEGF-A Protein Düzeyleri (pg/ml)	
	24 saat (ortalama±SD)	48 saat (ortalama±SD)
Kontrol	195±15,1	387±15,3
250 µg/ml	240±6,3	418±3,4
500 µg/ml	234±13,8	421±8,9
750 µg/ml	223±35,0	142±43,1*



**Şekil 4. 5.** Kontrol grubu ve farklı dozlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları.



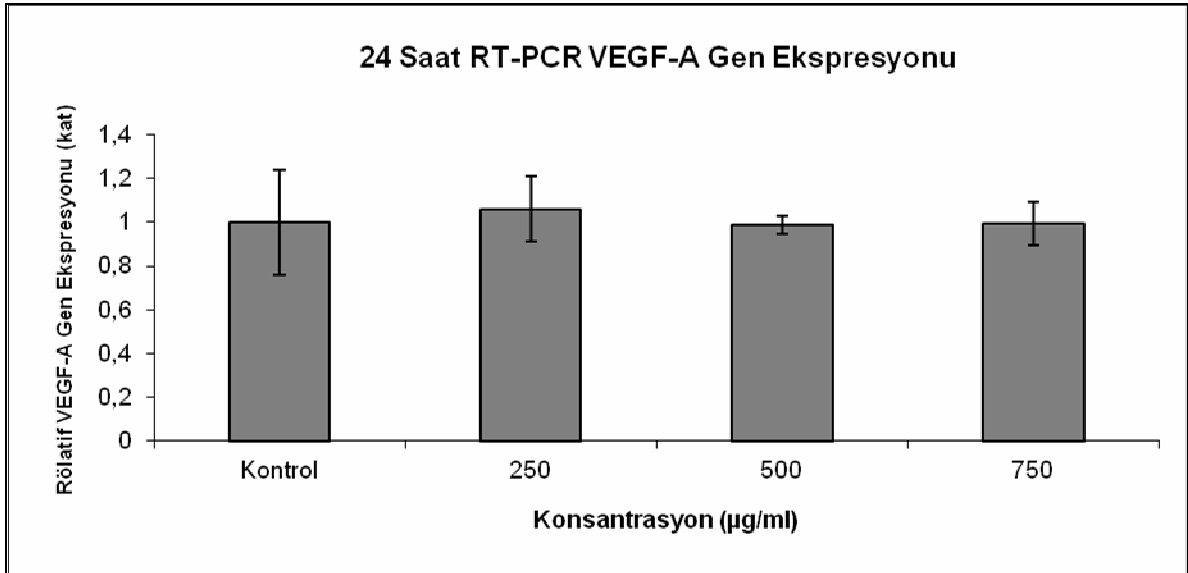
**Şekil 4. 6.** Kontrol grubu ve farklı dozlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda ölçülen VEGF-A protein miktarları. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.001$ .

#### 4.4. Ekstraktın VEGF-A Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

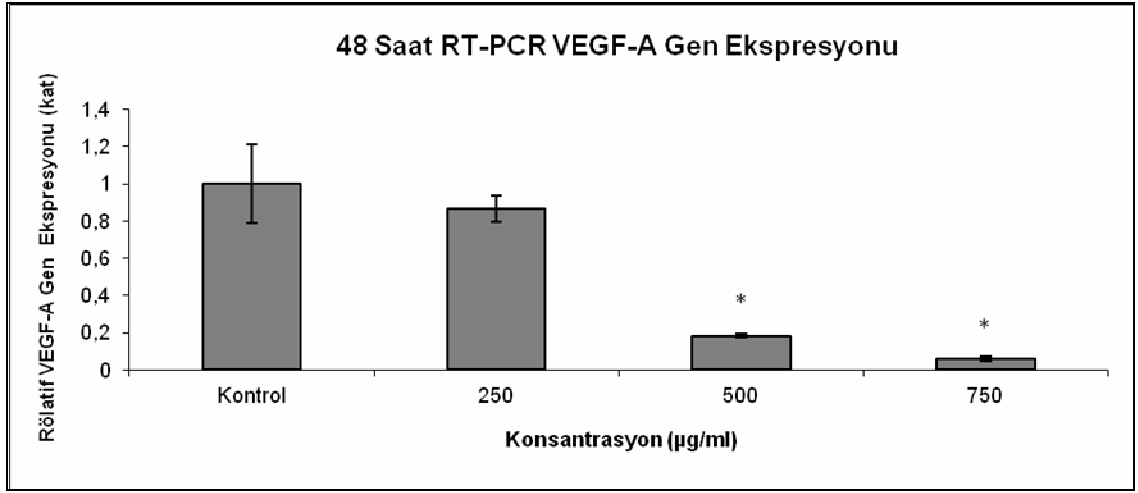
LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 250, 500 ve 750 µg/ml ekstrakt uygulaması sonucunda ölçülen VEGF-A gen ekspresyonu sonuçları kontrol grubu “1” kabul edilip oranlanarak rölatif değerleri hesaplandı. 24 saat için 1.06, 0.99 ve 0.995 olarak hasaplanırken (Tablo 4.4 ve Şekil 4.7) 48 saat için sırasıyla 0.866, 0.184 ve 0.059 olarak bulundu (Tablo 4.4 ve Şekil 4.8).

**Tablo 4. 4.** Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif VEGF-A gen ekspresyon düzeyleri. Kontrol grubuna göre \*: p<0.001.

Gruplar	24 saat (Rölatif değerler±SD)	48 saat (Rölatif değerler±SD)
Kontrol	1,00±0,24	1,00±0,21
250 µg/ml	1,06±0,15	0,87±0,07
500 µg/ml	0,99±0,04	0,18±0,01*
750 µg/ml	1,00±0,10	0,06±0,01*



**Şekil 4. 7.** Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif VEGF-A gen ekspresyon düzeyleri.



**Şekil 4. 8.** Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki ekstraktın LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif VEGF-A gen ekspresyon düzeyleri. Kontrol grubuna göre \*:  $p < 0.001$ .

## 5. TARTIŞMA

Antik çağlardan bu yana doğal ürünler, bitkiler ve baharatlar kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önlenmesi için kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı LNCaP prostat kanser hücreleri üzerine *Acorus calamus* bitkisinin etanolik ekstraktının anti-kanser özelliğini araştırmaktır. Mevcut olan standart kanser tedavi yöntemleri karsinomun tamamen ortadan kalkmasını garanti etmediği gibi ciddi yan etkilere de neden olabilmektedirler. İlaç endüstrisinin doğal bileşikleri araştırma ve geliştirmeye olan ilgilerinin azalmasına rağmen bu doğal kaynaklardan elde edilen ham bileşikler modifiye edilerek veya sentetik versiyonları türetilerek hizmet vermeye devam etmektedirler (54). Mevcut araştırmalar alternatif koruyucu ve/veya tedavi edici yöntemlerin geliştirilmesinde fitokimyasallar ve kemoterapötik ilaçların kombinasyonlarının kullanılmasının daha etkili alternatif bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

XTT yöntemi ile yapılan denemelerde, LNCaP hücrelerinin yaşam oranları üzerine 250 µg/ml konsantrasyondaki ekstraktın 24 saatte herhangi bir etkisi saptanmazken 48 saatte anlamlı bir etkisinin olduğu görüldü. 500, 750, 1000 ve 1250 µg/ml konsantrasyonlarda 24 ve 48 saatte hücre yaşam oranlarını doz ve zamana bağlı olarak %44'lere varan oranlarda azalttı. Bains J.S. ve ark. yaptıkları çalışmada *acorus calamus* bitkisinden lektinleri izole etmişler ve iki farklı fare makrofaj kanser hücre dizisi ile yine fare B- ve T-hücre lenfoma hücre dizileri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bitkinin bütün kanser hücre dizilerinde hücre çoğalması üzerine inhibitör etkisi gösterilmiştir. Hücre çoğalmasının %24 ile %67 arasında değişen oranlarda azaldığını ortaya koymuşlardır (6). Yine yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada *acorus calamus* bitkisinde yüksek miktarda bulunan B-asarone bileşiğinin iki farklı insan kolon kanser hücre dizilerinin çoğalması üzerine olan etkileri incelenmiş ve bileşiğin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir (63).



Apoptotik hücre ölümünün indüksiyonu fizyolojik olarak nekrozdan daha önemlidir. Çünkü apoptozis, inflamatuvar reaksiyonları anlamlı bir şekilde artırmaz ve immün sistemi inhibe etmez (31). Apoptotik hücre ölümü organize şekilde gelişen bir hücrel intihardır. Apoptotik hücre ölümünü tetikleyen tedavi yöntemleri çok daha az sitotoksositeye ve potansiyel olarak hastalarda daha az yan etkilere neden olur. DNA hasarına karşı DNA tamir mekanizmalarından daha önce meydana gelen hücrel yanıtlardan birisi PARP aktivasyonudur (24). PARP aktivasyonunun inhibisyonu ile birlikte DNA hasarına neden olan ilaçların kombinasyonu ile anti-kanser terapiler geliştirilmektedir (80). Ayrıca apoptozis üzerine yapılan çalışmalarda DNA hasarına neden olan ilaçlarla PARP inhibisyonunun kombinasyonunun apoptozisi artırırken nekrozisi azalttığı gösterilmiştir (51). Bölünmüş PARP ölçümü apoptotik hücre varlığını doğrulamak için kullanılan bir testtir. Apoptozise uğrayan insan hücrelerinde kaspazlar tarafından Asp214'den parçalanan PARP ölçümü apoptozisin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara göre 24 saat sonra 250 ve 500 µg/ml ekstrakt konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık bulunamazken 750 µg/ml konsantrasyonda %180 kadar bölünmüş PARP düzeyinde artış bulundu. 48 saat sonunda 250 µg/ml konsantrasyonda anlamlı bir farklılık bulunmadı. 500 ve 750 µg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %198 ve %244 oranlarında bölünmüş PARP düzeylerinde bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlara göre kullandığımız ekstrat doza ve zamana bağımlı olarak LNCaP hücrelerinde apoptozisi artırmaktadır. Ancak apoptozis indüksiyonunu pro-apoptotik faktörler üzerine mi, anti-apoptotik faktörler üzerine mi yoksa kombine bir etki mi göstererek gerçekleştirdiği henüz netlik kazanmamıştır. Bu durumun netlik kazanabilmesi için apoptotik süreçte rol alan birçok molekülün birlikte incelenmesi gerekmektedir.

Tümör progresyonunun aşamaları invazyon, anjiogenez ve metastatik büyümedir. Anjiogenez, malign hücrelerin yeni kan damarlarının oluşumunu gerçekleştirerek ihtiyacı olan besin ve oksijeni sağlaması için gerekli olan çok önemli bir adımdır. Anjiogenez sırasında endotelial hücreleri başta VEGF-A olmak üzere çeşitli büyüme faktörleriyle uyarılarak yeni kan damarlarının oluşumu indüklenir. Yeni kan damarlarının oluşumu engellenerek besin ve oksijen miktarlarının azaltılması sonucu

tümör gelişimi ve metastaz engellenebilir. Yapılan çalışmalarda da doğal kaynaklardan elde edilen birçok bileşiğin kanser hücrelerinde anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (82). Solid tümörler anjiogenez bağımlıdır, bu nedenle prostat kanseri de kontrolsüz büyümesini devam ettirebilmek için yeni damar oluşumunda ihtiyaç duyar. Prostat kanseri ilerledikçe anjiogenezin ve VEGF-A miktarının anlamlı olarak arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (49, 62). Anjiogenezi inhibe etme yöntemi kanser tedavisi için geçerli bir yaklaşımdır. Kanser tedavisi için şu ana kadar geliştirilen ve geliştirilme aşamasında olan birçok anti-anjiogenik ajan bulunmaktadır. Bu ilaçlar tümör gelişimini ve yeni damar oluşumunu inhibe etmek için anjiogenez yolağının çeşitli adımlarına etki etmektedirler. Bir anti-anjiogenik ajan olan bevacizumab, 2004 yılında FDA onayını alarak kanser tedavilerinde kullanılmaya başlanmıştır (41, 85). Ancak anti-anjiogenik temelli tedavi yaklaşımları bütün tümörler için yararlı değildir, tedavi başlangıcında elde edilen yanıt ilerleyen zamanlarda dirence neden olabilir (28).

Normal prostat dokusunda VEGF-A gen ekspresyonu genellikle olmamakla birlikte çok düşük düzeylerde de görülebilmektedir. 55 prostatik kanser materyali ile yapılan immünohistokimyasal bir çalışmada prostat kanserli hastalarda tümör gelişimiyle birlikte anlamlı olarak artan miktarlarda VEGF gen ekspresyonu bulunmuştur (99). VEGF gen ekspresyonunun tümörün evresi, derecesi ve klinik sonucuyla korele olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (11, 22, 57). VEGF düzeyleri prostat kanserli hastaların serum ve idrarlarında yüksek oranda bulunmuştur. 54 lokalize ve 26 metastatik olmak üzere toplam 80 prostat kanserli hasta üzerinde yapılan bir çalışmada metastatik hastalığı olanlarda diğer gruba ve kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek VEGF düzeyleri tespit edilmiştir (25). Bizim çalışmamızda da *acorus calamus* kökünün etanolik ekstraktının LNCaP hücrelerindeki VEGF-A protein miktarları ve ekspresyonları üzerine olan etkileri de incelendi. 250, 500 ve 750 µg/ml konsantrasyonlardaki etanolik ekstrakt LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulandı. 24 saat sonraki sonuçlara bakıldığında bu üç farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların ne VEGF-A protein miktarı ne de VEGF-A ekspresyonu üzerine bir etkisinin olmadığı bulundu. 48 saat sonra ise 250 ve 500 µg/ml ekstrakt konsantrasyonlarında VEGF-A protein düzeyi üzerine anlamlı bir etki gözlenmezken

750 µg/ml konsantrasyonlardaki ekstraktın VEGF-A protein miktarını anlamlı olarak azalttığı bulundu. Yine 48 saat sonra 250 µg/ml konsantrasyondaki ekstraktın VEGF-A gen ekspresyonu üzerine bir etkisi yokken 500 ve 750 µg/ml konsantrasyonlarda ekspresyonu anlamlı olarak azalttığı bulundu. Elde edilen sonuçlar yukarıda da bahsedilen çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı olarak, LNCaP prostat kanser hücrelerinde yüksek miktarda VEGF-A eksprese edilip salındığını ortaya koymaktadır. Ayrıca yine birçok çalışmada tıbbi amaçla da kullanılan birçok doğal bitki ve bunlardan elde edilen bileşiklerin kanser hücrelerinde VEGF-A'yı inhibe ettiği gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da acorus calamus bitkisinin VEGF-A'nın hem ekspresyonunu hem de salınımını doza ve zamana bağımlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığını bulduk.

Anjiogenez süreci pek çok sistemin ve molekülün etkileşimi sonucu meydana gelen bir prosestir. Apoptotik süreçte olduğu gibi anjiogenik süreçte de pro-anjiogenik ve anti-anjiogenik birçok molekül ve yollar söz konusudur. Anjiogenezin ilerlemesi veya baskılanması, pro-anjiogenik ve anti-anjiogenik dengenin bir tarafa doğru kayması sonucu gerçekleşir. Bu süreçte pek çok molekül rol oynadığından kullandığımız bitki ekstresinin hangi şekilde bir etki gösterdiğini söylemek zordur. Ayrıca tek bir aktivatör veya inhibitör molekülün değerlendirilmesi süreci aydınlatmak için çok yeterli gelmese de büyük miktarda yol gösterici olabilir. Kanser oluşumu, büyümesi ve yayılmasında apoptotik sürecin baskılanması ile anjiogenez sürecinin aşırı uyarılması göz önüne alındığında ilk kez acorus calamus bitki kökünün etanolik ekstraktının LNCaP prostat kanser hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını ve anjiogenezi baskılayıcı ve apoptozu uyarıcı etkilerinin tespit edilmesi önemlidir.

## 6. SONUÇ

Hücre çoğalması, apoptozis ve anjiogenez süreçleri birçok basamaktan meydana gelen komplike süreçlerdir ve kanser tedavi yaklaşımları için uygun hedeflerdir. Bu süreçlerin mekanizmaları da henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Bu çalışmada anijogenik ve apoptotik süreçler için kullanılan belirli moleküllerin düzeyleri incelenmiştir.

Doz ve zamana bağlı olarak acorus calamus kökünün etanolik ekstraktının LNCaP prostat kanser hücre dizilerinde hücre çoğalmasını ve anjiogenezi baskıladığı ve erken apoptozu uyardığı ilk kez bu çalışmada belirlendi. Çalışmamızdan çıkan bu olumlu sonuçlar bundan sonra yapılacak çalışmalar için de yol gösterici olabilir. Ayrıca doğal bitkiler ve bu bitkilerden izole edilen çeşitli bileşiklerin tek başlarına veya kombine şekilde uygulanmalarının kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin araştırılması umut vericidir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Aggarwal, B.B., Ichikawa, H., Garodia, P., Weerasinghe, P., Sethi, G., Bhatt, I.D., Pandey, M.K., Shishodia, S. at Nair, M.G., 2006, From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer, *Expert Opin Ther Targets*, 10, 1, 87-118 p.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. at Walter, P., 2002, *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science, NY, 1392 p.
3. American Cancer Society, 2012, Prostate Cancer.
4. American Cancer Society, 2013, Cancer Facts & Figures.
5. Anafarta, K., Göğüş, O., Bedük, Y. ve Arıkan, N., 1998, *Temel Üroloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, 1128 s.
6. Bains, J.S., Dhuna, V., Singh, J., Kamboj, S.S., Nijjar, K.K. at Agrewala J.N., 2005, Novel lectins from rhizomes of two *Acorus* species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines, *International Immunopharmacology*, 5, 1470–1478 p.
7. Balachandran, P. at Govindarajan, R., 2007, Ayurvedic drug discovery, *Expert Opin Drug Discov*, 2, 12, 1631-1652 p.
8. Balakumbahan, R., Rajamani, K. at Kumanan, K., 2010, *Acorus calamus*: An overview, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 25, 2740–2745 p.
9. Barbado, M., Fablet, K., Ronjat, M. at De Waard, M., 2009, Gene regulation by voltage-dependent calcium channels, *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1096–1104 p.
10. Bohm, I. at Schild, H., 2003, Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death, *Mol. Imaging Biol*, 5, 2-14 p.
11. Borre, M., Nerstrøm, B. at Overgaard, J., 2000, Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting, *Clin Cancer Res*, 6, 5, 1882-1890 p.
12. Brock, W.A., Milas, L., Bergh, S., Lo, R., Szabó, C. at Mason, K.A., 2004, Radiosensitization of human and rodent cell lines by INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, *Cancer Lett*, 205, 2, 155-160 p.
13. Bruce, I., Terman, B.I. at Stoletov, K.V., 2001, VEGF and Tumor Angiogenesis, *Einstein Quart. J. Biol. and Med*, 18, 59-66 p.
14. Chen, H.X. at Cleck, J.N., 2009, Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway, *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 8, 465-477 p.
15. Chevalier, S., Defoy, I., Lacoste, J., Hamel, L., Guy, L., Bégin, L.R. at Aprikian, A.G., 2002, Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis, *Mol Cell Endocrinol*, 28, 189, 1-2, 169-179 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

16. Chiam, K., Ricciardelli, C. at Bianco-Miotto, T., 2012, Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses, *Cancer Lett*, Epub ahead of print. 11
17. Cohen, G.M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem J*, 15, 326, 1, 1-16 p.
18. Dean, G.T. at Porter, A.T., 1997, Target to Apoptosis: A Hopeful Weapon for Prostate Cancer, *The Prostate*, 32, 284–293 p.
19. DeMarzo, A.M., Nelson, W.G., Isaacs, W.B. at Epstein, J.I., 2003, Pathological and molecular aspects of prostate cancer, *Lancet*, 15, 361, 9361, 955-964 p.
20. Devi S,A. at Ganjewala, D., 2009, Antimicrobial activity of *Acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract, *Acta Biologica Szegediensis*, 53, 1, 45-49 p.
21. Diamandopoulos, G.T., 1996, Cancer: an historical perspective. *Anticancer Res.*,16, 4A, 1595-1602 p.
22. Doll, J.A., Reiher, F.K., Crawford, S.E., Pins, M.R., Campbell, S.C. at Bouck, N.P., 2001, Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate, *Prostate*, 49, 293-305 p.
23. Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A. at Cartier, J.,2008, IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins, *Cell Cycle*, 7, 1036–1046 p.
24. Dungey, F.A., Caldecott, K.W. at Chalmers, A.J., 2009, Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90, *Mol Cancer Ther*, 8, 8, 2243-2254 p.
25. Duque, J.L.F., Loughlin, K.R., Adam, R.M., Kantoff, P.W., Zurakowski, D. at Freeman, M.R., 1999, Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer, *Urology*, 54, 523-527 p.
26. Dvorak, H.F., 2005, Angiogenesis: update 2005, *J Thromb Haemost*, 3, 8, 1835-1842 p.
27. Eikesdal, H.P. at Kalluri, R., 2009, Drug resistance associated with antiangiogenesis therapy, *Semin Cancer Biol*, 19, 5, 310-317 p.
28. Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B. at Carmeliet, P., 2008, FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?, *Nat Rev Cancer*, 8, 942-956 p.
29. Folkman, J., 1971, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med*, 285, 1182-1186 p.
30. Gerald, W.P., Poettler, M., Unseld, M. at Zielinski, C.C., 2012, Angiogenesis in cancer: anti-VEGF escape mechanisms, *Transl Lung Cancer Res*, 1, 1, 14-25 p.
31. Ghobrial, I.M., Witzig, T. E. at Adjei, A.A., 2005, Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *CACancer J Clin*, 55, 3, 178–194 p.
32. Gross, A., McDonnell, J.M., at Korsmeyer, S.J., 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes & Development*, 13, 1899–1911 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

33. Gu, G. at Brothman, A.R., 2010, Cytogenomic aberrations associated with prostate cancer, *Cancer Genet*, 204, 2, 57-67 p.
34. Guo, Y., Wang, S., Hoot, D.R. at Clinton, S.K., 2007, Suppression of VEGF-mediated autocrine and paracrine interactions between prostate cancer cells and vascular endothelial cells by soy isoflavones, *J Nutr Biochem*, 18, 6, 408-417 p.
35. Gürdöl, F. ve Ademoğlu, E., 2010, *Biyokimya*, 691 s.
36. Harvey, A.L., 2008, Natural products in drug discovery, *Drug Discov Today*, 13, 19,20, 894-901 p.
37. <http://med.wikidot.com/prostate-and-its-function> (2013-20-4)
38. <http://mutation.blogspot.com/2011/08/apoptosis.html> (2013-15-4)
39. [http://psychotropia.co/?attachment\\_id=786](http://psychotropia.co/?attachment_id=786) (2013-18-4)
40. <http://www.angio.org/understanding/process.php> (2013-26-4)
41. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm166896.htm> (2013-27-4)
42. <http://www.kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> (2013-19-04)
43. <http://www.molecularbrain.com/content/5/1/15/figure/F1> (2013-15-4)
44. [http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n4/fig\\_tab/nrc2090\\_F1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n4/fig_tab/nrc2090_F1.html) (2013-20-4)
45. Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O. at O'Leary, J., 2005, Molecular pathology of prostate cancer, *J Clin Pathol*, 58, 673-684 p.
46. Jachak, S.M. at Saklani, A., 2007, Challenges and opportunities in drug discovery from plants, *Current Science*, 92, 9, 1251-1257 p.
47. Jain, N., Jain, R., Jain, A., Jain, D.K. at Chandel H.S., 2010, Evaluation of wound-healing activity of *Acorus calamus* Linn, *Nat Prod Res*, 24, 534-541 p.
48. Jesse W.-H.L. at Verdardas J.C., 2009, Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?, *Science*, 325, 5937, 161-165 p.
49. Jones, A. at Fujiyama, C., 1999, Angiogenesis in urological malignancy: prognostic indicator and therapeutic target., *BJU Int*, 83, 535-555 p.
50. Jones, H.A., Metz, J.M., Devine, P., Hahn, S.M. at Whittington, R., 2002, Rates of unconventional medical therapy use in patients with prostate cancer: standard history versus directed questions, *Urology*, 59, 272-276 p.
51. Kehe, K., Raithel, K., Kreppel, H., Jochum, M., Worek, F. at Thiermann, H., 2008, Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) influences the mode of sulfur mustard (SM)-induced cell death in HaCaT cells, *Arch Toxicol*, 82, 461-470 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

52. Kelekar, A. at Thompson, C.B., 1998, Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends Cell Biol*, 8, 324–330 p.
53. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. at Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26, 4, 239-257 p.
54. Fadlalla, K., Watson, A., Yehualaesht, T., Turner, T. at Samuel, T., 2011, Ruta graveolens Extract Induces DNA Damage Pathways and Blocks Akt Activation to Inhibit Cancer Cell Proliferation and Survival, *Anticancer Research*, 31, 233-242 p.
55. Kim, H., Han, T.H. at Lee, S.G., 2009, Anti-inflammatory activity of a water extract of *Acorus calamus* L. leaves on keratinocyte HaCaT cells, *J Ethnopharmacol*, 122, 1, 149-156 p.
56. Kim, R., Emi, M. at Tanabe, K., 2006, Role of mitochondria as the gardens of cell death, *Cancer Chemother Pharmacol*, 57, 545–553 p.
57. Kuniyasu, H., Troncoso, P., Johnston, D., Bucana, C.D., Tahara, E., Fidler, I.J. at Pettaway, C.A., 2000, Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers, *Clin. Cancer Res*, 6, 2295-2308 p.
58. Kushi, L.H., Byers, T., Doyle, C., Bandera, E.V., McCullough, M., McTiernan, A., Gansler, T., Andrews, K.S. at Thun, M.J., 2006, American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention Reducing the Risk of Cancer With Healthy Food Choices and Physical Activity, *CA Cancer J Clin*, 56, 5, 254-281 p.
59. Kuş, G., 2011, Likofelonun Glia Hücreleri Üzerindeki Olası Etkileri, Doktora Tezi, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 74 s. (yayımlanmamış)
60. Lara, P.N., Twardowski P. at Quinn, D.I., 2004, Angiogenesis-targeted therapies in prostate cancer, *Clin Prostate Cancer*, 3, 3, 165-173 p.
61. Li, J.W. at Vederas, J.C., 2009, Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?, *Science*, 325, 5937, 161-165 p.
62. Lissbrant, I.F., Lissbrant, E., Damber, J.E. at Bergh, A., 2001, Blood vessels are regulators of growth, diagnostic markers and therapeutic targets in prostate cancer, *Scan*, 35, 437-452 p.
63. Liu, L., Wang, J., Shi, L., Zhang, W., Du, X., Wang, Z. at Zhang, Y., 2013, Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression, *Phytomedicine*, 20, 512–520 p.
64. Łoboda, A., Cisowski, J., Zarebski, A., Jaźwa, A., Riviera Nunez, D., Kypriotakis, Z., Heinrich, M. at Dulak, J., 2005, Effects of plant extracts on angiogenic activities of endothelial cells and keratinocytes, *J Physiol Pharmacol*, 56, 1, 125-137 p.
65. Longoria, R.L., Cox, M.C. at Figg, W.D., 2005, Antiangiogenesis: a possible treatment option for prostate cancer?, *Clin Genitourin Cancer*, 4, 3, 197-202 p.
66. Majno, G. at Joris, I., 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am J Pathol*, 146, 1, 3-15 p.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

67. Malanga, M. at Althaus, F.R., 2005, The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network, *Biochem. Cell Biol*, 83, 3, 354-364 p.
68. Mason, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. at de-Murcia, G., 1998, XRCC1 is specifically associated with poly(ADPribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, *Mol. Cell Biol*, 18, 6, 3563-3571 p.
69. Mattson, M.P. at Chan, S.L., 2003, Calcium orchestrates apoptosis, *Nat Cell Biol*, 5, 1041-1043 p.
70. McNeal, J.E., 1981, The zonal anatomy of the prostate, *Prostate*, 2, 1, 35-49 p.
71. Miyake, H., Muramaki, M., Kurahashi, T., Yamanaka, K. at Hara, I., 2005, Urinary levels of vascular endothelial growth factor in patients with prostate cancer as a predictor of disease progression, *Anticancer Res*, 25, 5, 3645-3649 p.
72. Muiras, M.L., Müller, M., Schächter, F. at Bürkle, A., 1998, Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians, *J Mol Med (Berl)*, 76, 5, 346-354 p.
73. Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P.L.F. at Lopes, C., 2007, Chemical carcinogenesis, *An Acad Bras Cienc* 79, 4, 593-616 p.
74. Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G. at Murcia, J.M., 1998, Importance of poly(ADP ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant, *J Biol Chem*, 273, 50, 33533-33539 p.
75. Paez, J. at Sellers, W.R., 2003, PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling, *Cancer Treat Res*, 115, 145-167 p.
76. Pandit, S., Mukherjee, P.K., Ponnusankar, S., Venkatesh, M. at Srikanth, N., 2011, Metabolism mediated interaction of  $\alpha$ -asarone and *Acorus calamus* with CYP3A4 and CYP2D6, *Fitoterapia*, 82, 3, 369-374 p.
77. Papatsoris, A.G. at Papavassiliou A.G., 2001, Prostate Cancer: horizons in the development of novel anti-cancer strategies, *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 1, 47-70 p.
78. Papatsoris, A.G., Karamouzis, M.V. at Papavassiliou, A.G., 2007,. The power and promise of "rewiring" the mitogen-activated protein kinase network in prostate cancer therapeutics, *Mol Cancer Ther*, 6, 3, 811-819 p.
79. Patwardan, B., Vaidhya, A.D.B. at Chorghade, M., 2004, Ayurveda and natural products drug discovery, *Curr. Sci*, 86, 789-799 p.
80. Penning, T.D., Zhu, G.D., Gandhi, V.B., Gong, J.C., Liu, X.S., Shi, Y., Klinghofer, V., Johnson, E.F., Donawho, C.K., Frost, D.J., Bontcheva-Diaz V., Bouska, J.J., Osterling, D.J., Olson A.M., Marsh K.C., Luo, Y. at Giranda, V.L., 2009, Discovery of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4- carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer, *J Med Chem*, 52, 514-523 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

81. Raja A.E., Vijayalakshmi M. at Devalarao, G., 2009, *Acorus calamus* linn.: Chemistry and Biology, *Research J. Pharm. and Tech*, 2, 2, 256-261 p.
82. Rajendra, G.M., Murillo, G., Naithani, R. at Peng, X., 2010, Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come?, *Pharm Res*, 27, 950-961 p.
83. Ranga, R.S., Girija, R., Nur-e-Alam, M., Sathishkumar, S., Akbarsha, M.A., Thirugnanam, S., Rohr, J., Ahmed, M.M. at Chendil, D., 2004, Rasagenthi lehyam (RL) a novel complementary and alternative medicine for prostate cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*, 54, 1, 7-15 p.
84. Risau, W., 1997, Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386, 671-674 p.
85. Ritchie L.L., Cox, M.C. at Figg, W.D., 2005, Antiangiogenesis: A Possible Treatment Option for Prostate Cancer?, *Clinical Genitourinary Cancer*, 4, 3, 197-202 p.
86. Rohr, M., Naegeli, P. at Daly, J.J., 1979, New Sesquiterpenoids of Sweet Flag Oil (*Acorus calamus*), *Phytochemistry*, 18, 279-281 p.
87. Rosen, L.S., 2002, Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers, *Cancer Control*, 9, 36-44 p.
88. Roskoski, R.Jr., 2007, Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression, *Crit Rev Oncol Hematol*, 62, 3, 179-213 p.
89. Satoh, M.S. at Lindahl, T., 1992, Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair, *Nature*, 356, 356-358 p.
90. Schmitt, C.A. at Lowe, S.W., 1999, Apoptosis and therapy, *J Pathol*, 187, 127-137 p.
91. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C. at de Murcia, G., 2006, Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 7, 7, 517-528 p.
92. Scuderio, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. at Boyd, M.R., 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for growth and drug sensitivity on culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Res*, 48, 4827-4833 p.
93. Searle, J., Lawson, T.A., Abbott, P.J., Harmon, B. at Kerr, J.F., 1975, An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells, *J. Pathol*, 116, 129-138 p.
94. Senger, D.R., Gali, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S. at Dvorak, H.F., 1983, Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, 219, 983-985 p.
95. Shah, A.J. at Gilani, A.H., 2012, Aqueous-methanolic extract of sweet flag (*Acorus calamus*) possesses cardiac depressant and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasodilator effects, *J Nat Med*, 66, 1, 119-126 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

96. Shariat, S.F., Anwuri, V.A., Lamb, D.J., Shah, N.V., Wheeler, T.M. at Slawin, K.M., 2004, Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy, *J Clin Oncol*, 22, 1655–1663 p.
97. Sooriakumaran, P. at Kaba, R., 2005, Angiogenesis and the tumour hypoxia response in prostate cancer: a review, *Int J Surg*, 3, 1, 61-67 p.
98. Soultzis, N., Karyotis, I., Delakas, D. at Spandidos, D.A., 2006, Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, *Int J Oncol*, 29, 2, 305-314 p.
99. Strohmeyer, D., Rossing, C., Bauerfeind, A., Kaufmann, O., Schlechte, H., Bartsch, G. at Loening, S., 2000, Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer, *Prostate*, 45, 216-224 p.
100. Talat, Z., 2010, Üroloji ders kitabı, İstanbul Cerrahpaşa tıp fak yayınları, İstanbul, 280 s.
101. Tanagho, E.A. at McAninch, J.W., 1999, Smith Genel Üroloji, (Çev. Ed.: Kazancı, G.), 14. Baskı, Nobel Tıp Yayınları, İstanbul, 822 s.
102. Tang, D.G. at Porter, A.T., 1996, Apoptosis: A Current Molecular Analysis, *Pathol Oncol Res*, 2, 3, 117-131 p.
103. Teicher, B.A., 2010, Combinations of PARP, hedgehog and HDAC inhibitors with standard drugs, *Curr Opin Pharmacol*, 10, 4, 397-404 p.
104. Ulukaya, E., Acilan, C. at Yilmaz, Y., 2011, Apoptosis: why and how does it occur in biology, *Cell Biochem Funct*, 29, 6, 468-480 p.
105. Wei, L.H., Lin, J.M., Xu, W., Hong, Z.F., Liu, X.X., Sferra, T.J. at Peng, J., 2011, Inhibition of tumor angiogenesis by *Scutellaria Barbata* D. Don via suppressing proliferation, migration and tube formation of endothelial cells and downregulation of the expression of VEGF-A in cancer cells, *J Med Plants Res*, 5, 3260–3268 p.
106. Wiart, C., 2002, Medicinal plants of South East Asia, Pelanduk Publications, Malaysia, 199 p.
107. Yélamos, J., Schreiber, V. at Dantzer, F., 2008, Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2, *Trends Mol. Med*, 14, 4, 169-178 p.
108. Zhang, X.K., 2002, Vitamin A and apoptosis in prostate cancer, *Endocr Relat Cancer*, 9, 2, 87-102 p.