



Küçük Isırgan Otuunun (*Urtica urens*'in) Potansiyel Anti-karsinojenik Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Aydınlatılması

Program Kodu: 3501

Proje No: 111T515

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Şevki ARSLAN

Araştırmacı:

Doç. Dr. Hasalettin DELİGÖZ

NİSAN 2016
DENİZLİ



ÖNSÖZ

Endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte çevreye her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Buna ilave olarak, teknolojinin ilerlemesi ve tıp alanındaki gelişmelerle birlikte her gün yeni bir ilaç çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla üretilmektedir. Tüm bunların sonucu olarak, dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara sıklıkla maruz kalmaktadırlar. Bu kimyasal maddeler insanlar da başta kanser olmak üzere birçok hastalık oluşturmaktadır. Kanser vücudun değişik organlarında ortaya çıkabilen ve bu organlardaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan, tedavileri ve yaklaşımları birbirinden farklı olan bir hastalıktır. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı 2013 yılı verilerine göre kanser hızı erkeklerde yüzde 267,9 kadınlarda ise yüzde 186,5'dir ve toplam kanser insidansı ise yüzde 227,2'dir. Yine bu verilere göre ülkemizde 2013 yılında 174 bin kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur.

Dünyada ve de Türkiye de pek çok kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Bu metotlar çok sık kullanılmasına rağmen sahip oldukları gerek sahip oldukları yan etkilerden dolayı gerekse her insanda aynı etkiyi göstermediklerinden dolayı dezavantajlara sahiptirler. Son yıllarda kanser tedavisi için alternatif tedavi ajanlarının saptanması ve ilaç geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir.. Bu kapsamda, projede fitokimyasal bileşenleri bilinmeyen ve ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Urtica urens* (küçük ısırgan) bitkisinin fitokimyasal bileşenlerinin tanımlanarak anti-karsinojenik, anti-oksidan ve tümör baskılayıcı etkilerinin etki mekanizmaları belirlemek için gen ve protein ekspresyon çalışmaları, toksikolojik etki belirleme, tüm genom transkriptom analizleri, izolasyon ve yapı tayin deneyleri gerçekleştirildi. Bu çalışmalar neticesinde çok önemli çıktılar elde edildi.

Proje yürütücüsü olarak emeği geçen araştırmacı ve danışman hocamıza, bursiyelere, araştırmacı olmadıkları halde bir şekilde katkı sağlayan ekip arkadaşlarımıza, proje önerimizi değerlendiren ve raporlarımızı okuyan raportör hocalarımıza, TÜBİTAK' ta projemizin değerlendirme sürecine katılan KBAG çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tüm bu çalışma 111T515 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.



İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser.....	1
1.1.1 Kanser Tedavisi	3
1.2 Anti-karsinojenik Etki ve Fitokimyasallar	4
1.2.1 Programlı Hücre Ölüm Yolağı; Apoptoz.....	4
1.2.2 Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler	8
1.2.3 Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler	8
1.2.4 Topoizomerazlar	9
1.3 Deneysel Materyal: <i>Urtica urens</i> L. (Küçük Isırgan Otu)	11
1.4 Amaç.....	14
2. MATERYAL ve METOD	16
2.1 Materyal	16
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	16
2.2 Metot.....	17
2.2.1 <i>Urtica urens</i> (Küçük ısırgan otu) Özütlerinin Hazırlanması	17
2.2.1.1 Yaprak Özütlerinin Hazırlanması	17
2.2.1.2 Tohum Özütlerinin Hazırlanması	18
2.2.2 GC-MS Analizi.....	18
2.2.3 LC-MS Analizi	20
2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları	20
2.2.4.1 Besiyeri Hazırlanışı	20
2.2.4.2 Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması.....	21
2.2.4.3 Sitotoksikite Çalışmaları	21
2.2.4.4 A549, LNCaP, CaCo2 hücrelerine <i>U.urens</i> Özütlerinin Uygulanması	22
2.2.5 RNA İzolasyonu	22
2.2.5.1 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrez ile Görüntülenmesi	23
2.2.6 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR	23
2.2.7 cDNA Sentezi.....	26
2.2.8 RİPA Tamponu ile Protein İzolasyonu	26
2.2.9 Bişinşonik Asit ile Protein Tayini	27
2.2.10 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAJE) ve Western Blot	27
2.2.11 Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi	29
2.2.12 Tüm Genom Gen Ekspresyon Analizi.....	29
2.2.13 İstatiksel Analizler	31
3. SONUÇLAR	32
3.1 Özütlerin Hazırlanması ve Fraksiyonlamalar	32
3.1.1 <i>Urtica urens</i> Yapraklarından Özüt Eldesi.....	32



3.1.1.1	Urtica urens Yapraklarından Elde Edilen Hekzan Özütü ve Fraksiyonlarının GC-MS Analizi	35
3.1.1.2	Urtica urens Yapraklarından Elde Edilen Kloroform ve Etil Asetat Özütleri ile Fraksiyonlarının LC-MS Analizi	41
3.1.1.2.1	Alt Fraksiyonlarının İleri Derece Fraksiyonlanması ve Saf Madde İzolasyonları	43
3.1.1.3	Urtica urens Bitkisinde Yaprak Özütlerinin Sitotoksosite Çalışmaları	113
3.1.1.3.1	Ana Özütlerin Sitotoksitesi	113
3.1.1.3.2	Ana Özütlerden Elde Edilen Alt Fraksiyonların Sitotoksitesi	115
3.1.1.4	mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR 124	
3.1.1.4.1	A549 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi 126	
3.1.1.4.2	Caco2 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi 134	
3.1.1.4.3	LNCaP Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi 142	
3.1.1.5	Protein Seviyesinde Ekspresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi: Western Blot 149	
3.1.1.5.1	A549 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları	149
3.1.1.5.2	Caco2 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları	156
3.1.1.5.3	LNCaP Hücre Hattında Western Blot Sonuçları	161
3.1.1.6	Urtica urens Yaprak Özütlerinde Topoizomerez I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi	167
3.1.1.7	Tüm Genom Transkriptome Çalışmaları	170
3.1.2	Tohum Özütlerinin Hazırlanması ve İlgili Çalışmalar	176
3.1.2.1	Özütlerin Hazırlanması	176
3.1.2.2	GC-MS Analizi	178
3.1.2.3	Tohum Kloroform, Etil Asetat ve Metanol Özütlerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC- TOF)	184
3.1.2.4	Urtica urens Tohumundan Elde Edilen Bileşikler	195
3.1.2.4.1	Stigmasterol'ün İzolasyonu ve Yapı Tayini	195
3.1.2.4.2	Daucosterin'in İzolasyonu ve Yapı Tayini	200
3.1.2.5	Urtica urens Bitkisinde Tohum Özütlerinin Sitotoksosite Çalışmaları	202
3.1.2.6	mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR 204	
3.1.2.6.1	A549 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi 204	
3.1.2.6.2	Caco2 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi 209	
3.1.2.6.3	LNCaP Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi 214	
3.1.2.7	Protein Seviyesinde Ekspresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi: Western Blot 219	



3.1.2.7.1	A549 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları.....	219
3.1.2.7.2	Caco2 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları.....	226
3.1.2.7.3	LNCaP Hücre Hattında Western Blot Sonuçları	232
3.1.2.8	Urtica urens Tohum Özütlerinde Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi	238
3.1.2.9	Urtica urens Tohum Özütlerinin Tüm Genom Transkriptome Çalışmaları 242	
4.	TARTIŞMA.....	246
5.	SONUÇ	258
6.	KAYNAKLAR.....	259



TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. GC-MS şartları.....	19
Tablo 2. 2. Deneylerde kullanılan primer dizileri.	24
Tablo 2. 3. cDNA sentez karışımı ve prosedürü.....	26
Tablo 2. 4. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.	27
Tablo 3. 1. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen özütlerin verimleri.	33
Tablo 3. 2. Silika kolonunda hekzan özütünü fraksiyonlamak için kullanılan Hekzan:etil asetat mobil faz sistemi.....	33
Tablo 3. 3. Silika kolonunda kloroform özütünü fraksiyonlamak için kullanılan Hekzan:etil asetat:metanol mobil faz sistemi.....	34
Tablo 3. 4. Silika kolonunda etilasetat özütünü fraksiyonlamak için kullanılan Hekzan:etil asetat:metanol mobil faz sistemi.....	35
Tablo 3. 5. GC-MS şartları:.....	36
Tablo 3. 6. Hekzan Ana Özütünün GC-MS ile İçerik Analizi.....	36
Tablo 3. 7. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon A'nın GC-MS ile İçerik Analizi.	37
Tablo 3. 8. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon B'nin GC-MS ile İçerik Analizi.	38
Tablo 3. 9. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon C'nin GC-MS ile İçerik Analizi.	39
Tablo 3. 10. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon D'nin GC-MS ile İçerik Analizi.	40
Tablo 3. 11. Etil Asetat (EA) Ana Özütü ve fraksiyonlarının LC-MS ile İçerik Analizi.....	42
Tablo 3. 12. Kloroform (KL) Ana Özütü ve fraksiyonlarının LC-MS ile İçerik Analizi.....	43
Tablo 3. 13. Rutin'in ¹ H ve ¹³ C NMR verileri.....	47
Tablo 3. 14. 4-Hidroksi benzoik asit'in ¹ H ve ¹³ C NMR verileri.	48
Tablo 3. 15. Etil asetat özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	49
Tablo 3. 16. Etil asetat özütü alt fraksiyonlarından D fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	62
Tablo 3. 17. Etil asetat özütü alt fraksiyonlarından E fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	69
Tablo 3. 18. Kloroform ana fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	77
Tablo 3. 19. Kloroform alt fraksiyonlarından 1 fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.	92
Tablo 3. 20. Kloroform alt fraksiyonlarından 7 fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.	101
Tablo 3. 21. Örneklede değişim gösteren prob sayısı.	171
Tablo 3. 22. Isırgan otu'nun fraksiyonlandırması ve elde edilen ekstrakt miktarları.....	177
Tablo 3. 23. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin içerik analizi.....	179
Tablo 3. 24. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin içerik analizi.....	180
Tablo 3. 25. Katı Kısım Metanol Ekstresinin içerik analizi.....	180
Tablo 3. 26. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda içerik analizi.	181
Tablo 3. 27. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda içerik analizi.	182
Tablo 3. 28. Katı Kısım Metanol Ekstresinin silillenmesi sonucunda içerik analizi.	183
Tablo 3. 29. HPLC mobil faz programı.....	184
Tablo 3. 30. Fenolik standartlarına ait gelme zamanı ve konsantrasyon.	186
Tablo 3. 31. Isırgan Tohum-CHCl ₃ , EtOAc ve MeOH Ekstreleri HPLC-TOF/MS Sonuçları.	187
Tablo 3. 32. Etil asetat özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	188
Tablo 3. 33. Kloroform özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	188
Tablo 3. 34. Metanol özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.....	189
Tablo 4. 1. Hücre hatlarında Küçük ısırgan otu uygulaması sonucunda elde edilen LD50 dozları.	249



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Kanserleşmenin altı temel kuralı.	3
Şekil 1. 2. Kanser tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı tedavi olarak kullanılan bitkilerin etkilediği hedef proteinler	4
Şekil 1. 3. Bcl-2 ailesi proteinlerinin yapısal domainleri.	6
Şekil 1. 4. Kaspaz ailesinin CARD, DED ve büyük altbirim (p20) ve küçük katalitik altbirimi (p10) belirtilen üç ana grubu.	6
Şekil 1. 5. İç ve dış apoptoz yolları.....	7
Şekil 1. 6. DNA topoizomeraz enziminin tipleri.....	11
Şekil 1. 7. <i>Urtica urens</i> L. bitkisi.....	12

Şekil 2. 1. <i>Urtica urens</i> bitkisinden artan polaritelerdeki çözücüler ile yapılan ekstraksiyon işlemleri.....	18
Şekil 2. 2. İzole edilen RNA'ların 1%'lik agaroz jel elektroforezi.	23

Şekil 3. 1. Küçük ısırgan otu (<i>Urtica urens</i>) bitkisinin yapraklarında artan polaritelerdeki çözücüler ile yapılan ekstraksiyon işlemleri.	32
Şekil 3. 2. Hekzan özütünün fraksiyonlanması.	33
Şekil 3. 3. Kloroform özütünün fraksiyonlanması.	34
Şekil 3. 4. Etilasetat özütünün fraksiyonlanması.	35
Şekil 3. 5. Hekzan Ana Özütünün GC kromatogramı.	37
Şekil 3. 6. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon A'nın GC kromatogramı.	38
Şekil 3. 7. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon B'nin GC kromatogramı.	39
Şekil 3. 8. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon C'nin GC kromatogramı.....	40
Şekil 3. 9. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon D'nin GC kromatogramı.....	41
Şekil 3. 10. Salisilik asit için elde edilen Standard eğri grafiği	42
Şekil 3. 11. Hekzadekanoik asit, metil ester.....	44
Şekil 3. 12. Bitki ekstresinin kolona tatbik edilmesi.	44
Şekil 3. 13. Urasil molekülü.	44
Şekil 3. 14. Fr-37 ¹ H NMR spektrumu.....	45
Şekil 3. 15. Fr-37 ¹³ C NMR spektrumu.....	45
Şekil 3. 16. Fr-37 DEPT spektrumları.	45
Şekil 3. 17. Fr-37 HSQC spektrumu.	46
Şekil 3. 18. Fr-37 HMBC spektrumu.	46
Şekil 3. 19. Fr-37 HMQC spektrumu.....	46
Şekil 3. 20. Fr-37 COSY spektrumu.....	47
Şekil 3. 21. Rutin bileşiğinin yapısı.	47
Şekil 3. 22. 4-Hidroksi Benzoik Asit.	48
Şekil 3. 23. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin A549 hücre canlılığına etkisi.	113
Şekil 3. 24. Değişik konsantrasyonlarda ki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin Caco2 hücre canlılığına etkisi..	114
Şekil 3. 25. Değişik konsantrasyonlarda ki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin LNCaP hücre canlılığına etkisi..	115
Şekil 3. 26. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının A549 hücre canlılığına etkisi.	116
Şekil 3. 27. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının Caco-2 hücre canlılığına etkisi.	117



Şekil 3. 28. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının LNCaP hücre canlılığına etkisi.	118
Şekil 3. 29. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının A549 hücre canlılığına etkisi.....	119
Şekil 3. 30. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının Caco-2 hücre canlılığına etkisi.....	120
Şekil 3. 31. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının LNCaP hücre canlılığına etkisi.....	121
Şekil 3. 32. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının A549 hücre canlılığına etkisi.	122
Şekil 3. 33. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının Caco-2 hücre canlılığına etkisi..	123
Şekil 3. 34. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının LNCaP hücre canlılığına etkisi.	124
Şekil 3. 35. Amplifikasyon eğrisi.	125
Şekil 3. 36. Standart kalibrasyon eğrisi.....	125
Şekil 3. 37. Erime eğrisi analizi.	126
Şekil 3. 38. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	127
Şekil 3. 39. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında hücre döngüsünde rol alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	128
Şekil 3. 40. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında onkogen ve tümör baskılayıcı bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.	129
Şekil 3. 41. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	130
Şekil 3. 42. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında MAP Kinaz yolağı ve diğer yolaklarda görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	131
Şekil 3. 43. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütü aktif alt fraksiyonlarının insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında birçok yolakta rol alan önemli genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	133
Şekil 3. 44. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	135
Şekil 3. 45. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında hücre döngüsünde görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	136
Şekil 3. 46. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında onkogen ve tümör baskılayıcı bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	137
Şekil 3. 47. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) ilaç metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.	138
Şekil 3. 48. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında MAP Kinaz yolağı ve diğer yolaklarda görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	139
Şekil 3. 49. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütü aktif alt fraksiyonlarının insan kolon kanseri hücre (Caco2) hattında birçok yolakta rol alan önemli genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	141



Şekil 3. 50. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	143
Şekil 3. 51. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) hücre döngüsünde görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.	143
Şekil 3. 52. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) onkogen ve tümör baskılayıcı bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.	144
Şekil 3. 53. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) ilaç metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	145
Şekil 3. 54. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) MAP Kinaz yolağı ve diğer yolaklarda görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	146
Şekil 3. 55. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütü aktif alt fraksiyonlarının insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında birçok yolakta rol alan önemli genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	148
Şekil 3. 56. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi.	150
Şekil 3. 57. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	152
Şekil 3. 58. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında Onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi.	153
Şekil 3. 59. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.....	154
Şekil 3. 60. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.....	156
Şekil 3. 61. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi.....	157
Şekil 3. 62. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	158
Şekil 3. 63. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinler ve ilaç metabolizmasında görev alan AHR proteininin seviyesine olan etkisi.	159
Şekil 3. 64. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.....	161
Şekil 3. 65. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi.	162
Şekil 3. 66. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	163
Şekil 3. 67. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi.	164



Şekil 3. 68. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.....	165
Şekil 3. 69. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.....	167
Şekil 3. 70. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi.....	167
Şekil 3. 71. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi.....	168
Şekil 3. 72. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi.....	168
Şekil 3. 73. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi.....	169
Şekil 3. 74. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi.....	169
Şekil 3. 75. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi.....	170
Şekil 3. 76. Özütlerden elde edilen alt fraksiyonların hiyerarşik kümeleme analizi.	170
Şekil 3. 77. Özütlerin hiyerarşik kümeleme analizi.	171
Şekil 3. 78. Tüm Genom transcriptome analizleri sonucunda A549 hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heat map analizi.	172
Şekil 3. 79. Tüm Genom transcriptome analizleri sonucunda Caco-2 hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heat map analizi.	173
Şekil 3. 80. Tüm Genom transcriptome analizleri sonucunda LnCap hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heat map analizi.	174
Şekil 3. 81. <i>Urtica urens</i> tohumunun çözücü ile ekstraksiyonu (meserasyon).....	177
Şekil 3. 82. Kloroform, Etilasetat ve Metanol ekstratlarının İTK görünüşleri.	178
Şekil 3. 83. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin esterlenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.	179
Şekil 3. 84. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin esterlenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.....	179
Şekil 3. 85. Katı Kısım Metanol kısmının esterlenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.....	180
Şekil 3. 86. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.....	181
Şekil 3. 87. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.....	182
Şekil 3. 88. Katı Kısım Metanol Ekstresinin silillenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.....	183
Şekil 3. 89. Ekstraktların HPLC-TOF/MS analizi için hazırlanma aşamaları.....	185
Şekil 3. 90. 25000 ppb' de Fenolik bileşik standartlarına ait HPLC-TOF kromatogramları. .	186
Şekil 3. 91. Isırgan Tohum-Kloroform, Etilasetat ve Metanol Ekstreleri HPLC-TOF Kromatogramları.....	187
Şekil 3. 92. Stigmasterol molekülü.....	195
Şekil 3. 93. Stigmasterol'ün ¹ H-NMR spektrumu.....	196
Şekil 3. 94. Stigmasterol'ün DEPT ve APT spektrumları.....	197
Şekil 3. 95. Stigmasterol'ün karbon ve proton kimyasal kayma değerleri.....	198
Şekil 3. 96. Stigmasterol HETCOR spektrumu.....	199
Şekil 3. 97. Stigmasterol HMBC Spektrumu.....	200
Şekil 3. 98. Stigmasterol HMBC korelasyonu.....	200



Şekil 3. 99. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumlarının hekzan katı (HK), hekzan yağ (HY), kloroform (K), etil asetat (EA) ve metanol (M) özütlerinin A549 hücre canlılığına etkisi.....	202
Şekil 3. 100. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumlarının hekzan katı, (HK), hekzan yağ (HY), kloroform (K), etil asetat (EA) ve metanol (M) özütlerinin Caco-2 hücre canlılığına etkisi.....	203
Şekil 3. 101. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumlarının hekzan katı, (HK), hekzan yağ (HY), kloroform (K), etil asetat (EA) ve metanol (M) özütlerinin LNCaP hücre canlılığına etkisi.....	204
Şekil 3. 102. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	205
Şekil 3. 103. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında hücre döngüsü genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	206
Şekil 3. 104. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	207
Şekil 3. 105. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	208
Şekil 3. 106. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	209
Şekil 3. 107. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi..	210
Şekil 3. 108. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında hücre döngüsü genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	211
Şekil 3. 109. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	212
Şekil 3. 110. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında ilaç metabolizmasında görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	213
Şekil 3. 111. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	214
Şekil 3. 112. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	215
Şekil 3. 113. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında hücre döngüsü genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	216
Şekil 3. 114. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	217
Şekil 3. 115. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında ilaç metabolizmasında görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	218
Şekil 3. 116. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi..	219



Şekil 3. 117. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi.	221
Şekil 3. 118. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında hücre döngüsü proteinlerin seviyesine olan etkisi.	222
Şekil 3. 119. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi.	223
Şekil 3. 120. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	224
Şekil 3. 121. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	226
Şekil 3. 122. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi.	227
Şekil 3. 123. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) hücre döngüsü proteinlerin seviyesine olan etkisi.	228
Şekil 3. 124. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi.	230
Şekil 3. 125. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	231
Şekil 3. 126. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) Map kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	232
Şekil 3. 127. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi.	234
Şekil 3. 128. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	235
Şekil 3. 129. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi.	236
Şekil 3. 130. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	237
Şekil 3. 131. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi.	238
Şekil 3. 132. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohum hekzan katı özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi.	239
Şekil 3. 133. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohum kloroform özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi.	240
Şekil 3. 134. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohum metanol özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi.	240
Şekil 3. 135. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumunun hekzan katı özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi.	241
Şekil 3. 136. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumunun kloroform özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi.	241



Şekil 3. 137. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumunun metanol özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi.....	242
Şekil 3. 138. Profil Plot gösterimi	243
Şekil 3. 139. Örnekler baz alınarak yapılan Cluster Analizi (Proflu gösterim).....	244
Şekil 4. 1. Tohum kloroform özütünün kanser yolağında sebep olduğu değişimler	257

Kanser, organizmaya ait hücrelerin çeşitli nedenlerden dolayı kontrolsüz şekilde çoğalmaları ile karakterize edilen bir hastalıktır. Genetik, kimyasal ve çevresel koşullar en önemli sebeplerindendir. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Dünyada ve de Türkiye de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif ve tamamlayıcı tedavileri de sıklıkla kullanmaktadırlar. Bunun sonucunda, günümüzde çoğunluğu bitkisel preparatlar olan alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artarak hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, fitokimyasal bileşenleri bilinmeyen ve ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Urtica urens* (küçük ısırgan otu) bitkisinin fitokimyasal bileşenleri tanımlanarak anti-karsinojenik etki mekanizmaları moleküler düzeyde saptamaktır. Bu kapsamda, projede öncelikle *Urtica urens* bitkisinden elde edilen özütler çeşitli ekstraksiyon ve kromatografi teknikleri uygulanarak alt fraksiyonlar ve saf bileşikler elde edildi. Bu özütlerin GC/MS ve LC/MS analizleri hekzan özütlerinin doymamış yağ asidi bakımından ve kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin ise fenolik bileşiklerce zengin olduğunu göstermiştir. Proje kapsamında bitkiden izole edilen ve yapıları tayin edilen rutin, urasil, 4-hidroksibenzoik asit, daucosterin, stigmasterol, hekzadekanoik asit metil ester bileşikleri bitkide ilk defa saptanan bileşiklerdir. İçerdiği fenolik bileşikler ve mRNA analizleri bitkinin yüksek anti-oksidant özelliği olduğunu göstermiştir. *Urtica urens*'ten elde edilen özütlerin insan kanser hücrelerine (LnCap, A549 ve Caco-2) üzerlerine sitotoksik etkileri bu çalışmada incelenmiş olup elde edilen sonuçlara göre etkin doz değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlar özütlerin yüksek sitotoksik ve anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Ardından birçok farklı hücresel yolakla ilişkili 35 genin mRNA ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimler belirlenmiş ve içerdiği dolayı özütlerin apoptozu ve tümör baskılayıcı genleri indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca tüm genom transkriptom analizi sonucunda bu değişimler teyit edilmiştir. Tüm bunların yanı sıra, yaprak ve tohumlarda elde edilen özütlerin topoizomerez I ve II aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, ilaç metabolize edici enzimlerin transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu nükleer reseptörlerin mRNA seviyeleri etil asetat uygulaması sonucunda anlamlı bir şekilde değiştirmiştir. Tüm bu sonuçlar, bu bitkinin değişik hücresel yolları değiştirerek anti-karsinojenik ve sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, diğer ilaçların metabolizmasında değişikliklere yol açabileceği yine bu çalışma ile saptanmıştır. Bu çalışma ısırgan otu ile yapılacak olan diğer farmakolojik ve toksikolojik çalışmalara ipuçları sağlayacaktır. Sonuç olarak, proje ile önerilen



hedefler başarı ile gerçekleştirildi ve patent dahil yeni araştırmalara temel oluşturacak çıktılar üretildi.

Anahtar Kelimeler: küçük ısırđan otu, *Urtica urens*, anti-karsinojen etki, apoptotik etki, anti-oksidan etki, moleküler mekanizma



ABSTRACT

Cancer is a disorder which is characterized by uncontrolled proliferation due to variety of reasons. Genetic, chemicals and environmental conditions are the main reasons of this disease. Despite recent advances in early diagnosis and treatment, cancer is still the first leading cause of death during the last 20 years. In addition to conventional treatments such as chemotherapy and radiation therapy alternative and complementary therapies are also frequently used among the cancer patients not only in Turkey but also all over the world. As a result, the popularity of herbal preparations as alternative and complementary therapies has been ever growing and they constitute great importance in terms of public health as well as economic value. The scope of this proposed research project is to determine the unknown phytochemical constituents of a widely used traditional therapeutic medicinal plant i.e. *Urtica urens* (small nettle) and is to investigate it's anti-carcinogenic, and tumor suppressor effects at the molecular level. In this context, first the plant extracts obtained from *Urtica urens* were further fractionated to isolate pure compounds by applying various extraction and chromatography techniques. In this study, 6 compounds namely rutin, uracil, 4-hydroxybenzoic acid, daucosterin, stigmasterol, hexadecanoic acid methyl ester, were and structurally elucidated for the first time in this plant parts. High amount of phenolic ingredients and mRNA studies showed that herb has high anti-oxidant activity. The cytotoxic effect of extracts obtained from *Urtica urens* was determined in human cancer cells (LnCAp, A549 ve Caco-2) cells by this study and effective doses were calculated by using these results. This result was demonstrated that extracts may have high cytotoxic and anti-carcinogenic activity. After that, changes that in mRNA and protein levels of 35 genes related with different cellular pathways was investigated and it was identified that extracts induced apoptosis and tumor suppressor genes because of their active compounds. Moreover, it was detected significant changes in these cellular pathway as a result of whole genome transcriptome analysis of extracts treated cells. Besides all, it was detected that most of the extracts obtained from leaves and seeds inhibited activity of topoisomerase I and II enzymes. Moreover, the mRNA levels of nuclear receptors that are responsible for the drug transcriptional regulation of drug metabolizing enzymes was changed significantly by extract treatment. All of these results reveled that this herb showed anti-carcinogenic and cytotoxic activity by changing different cellular pathways. Moreover, it was determined that this herb may cause changes in the metabolism of other drugs was determined by this study. This study supplied new clues for other pharmacological and toxicological studies of urtica species. As a result, the project was successfully accomplished with the proposed targets and outcomes will form the basis for new research, including patented products.



Keywords: Dwarf nettle, *Urtica urens*, anti-carcinogenic effect, apoptotic effect, anti-oxidant effect, molecular mechanisms



1. GİRİŞ

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

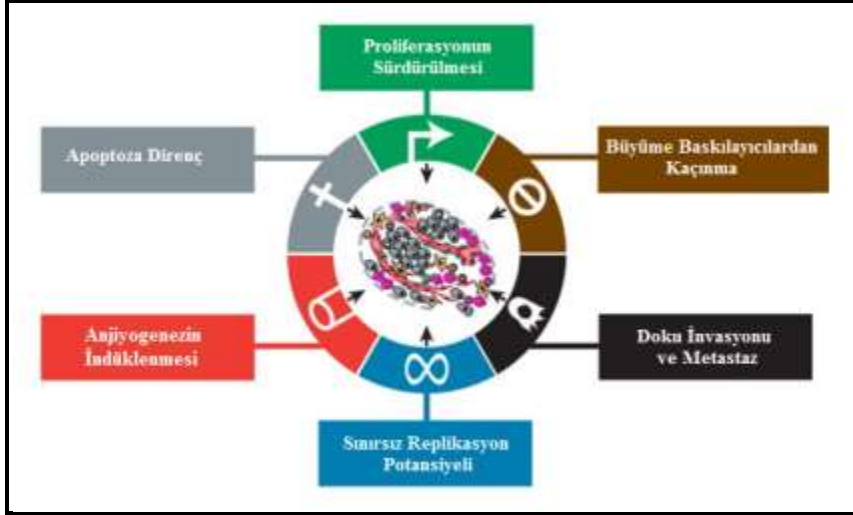
1.1 Kanser

Kanser DNA'da herhangi bir şekilde meydana gelen hasar sebebiyle hücrelerin anormal ve düzensiz büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır. Sağlıklı vücut hücreleri ölen hücrelerin yenilenmesi, hasarlı dokuların onarımı için bölünebilme yeteneklerini



kullanırlar. Fakat bu yetenek sınırsız değildir ve hücre bunun bilincindedir. Kansere hücrelerinde ise durum bundan farklıdır. Bu hücreler kontrolsüz olarak büyür ve çoğalırlar. Kansere hücreleri birleşerek tümörleri meydana getirirler. Meydana gelen tümör dokuları normal dokuları sıkıştırabilir, tahrip edebilir ya da içerisine difüze olabilirler. Kansere hücreleri tümör hücresinden ayrılırsa lenf ya da kan yoluyla vücudun diğer bölgelerine gidebilirler, gittikleri yerde aynı şekilde düzensiz büyümeye devam ederler. Kansere bu şekilde yayılmasına metastaz denilir. Başka bir dokuya geçiş yaparsa buna da invazyon denilmektedir. Kansere, onkogenlerin işlev kazançları, bazı tümör baskılayıcı genlerin işlev kayıpları, apoptoz yollarında görev alan genlerin ekspresyon düzeyindeki değişiklikler ve DNA hasarı onarım yollarındaki genetik değişiklikler sonucu oluşan ve gelişen bir hastalıktır. Mutasyonlar gibi genetik değişimlerin bazıları kalıtsal olarak var olup kansere yatkınlık yaratırken, bazıları da hücresel düzeyde dış etkilerle (UV, kimyasallar) gerçekleşerek hücrenin bölünme kapasitesini değiştirir ve neoplastik transformasyonu başlatabilir.

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



Şekil 1. 1. Kanserleşmenin altı temel kuralı.

Batı toplumlarında her üç insandan birinde kanser gelişmekte ve beşte biri ölmektedir (Fearhead 2004). Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10-15 sinin, kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'lık kısmını ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA sıdaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar.

Kanser multifaktöriyel olup, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumunda suçlanmaktadır. Çevresel olarak maruz kaldığımız birçok kimyasal madde, kansere sebep olmaktadır. İlaçlar ve yağlı yiyecekler, bazı küfler (alfatoksinler), iyottan fakir diyet, kırmızı etten zengin diyetler, yanmış yağları içeren besinler de kansere sebep olan önemli çevresel faktörlerdendir. Sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni yağlar ve naftalin de diğer kimyasal kanser yapıcı etkenlerdir (Williams 1992, Williams 2001).

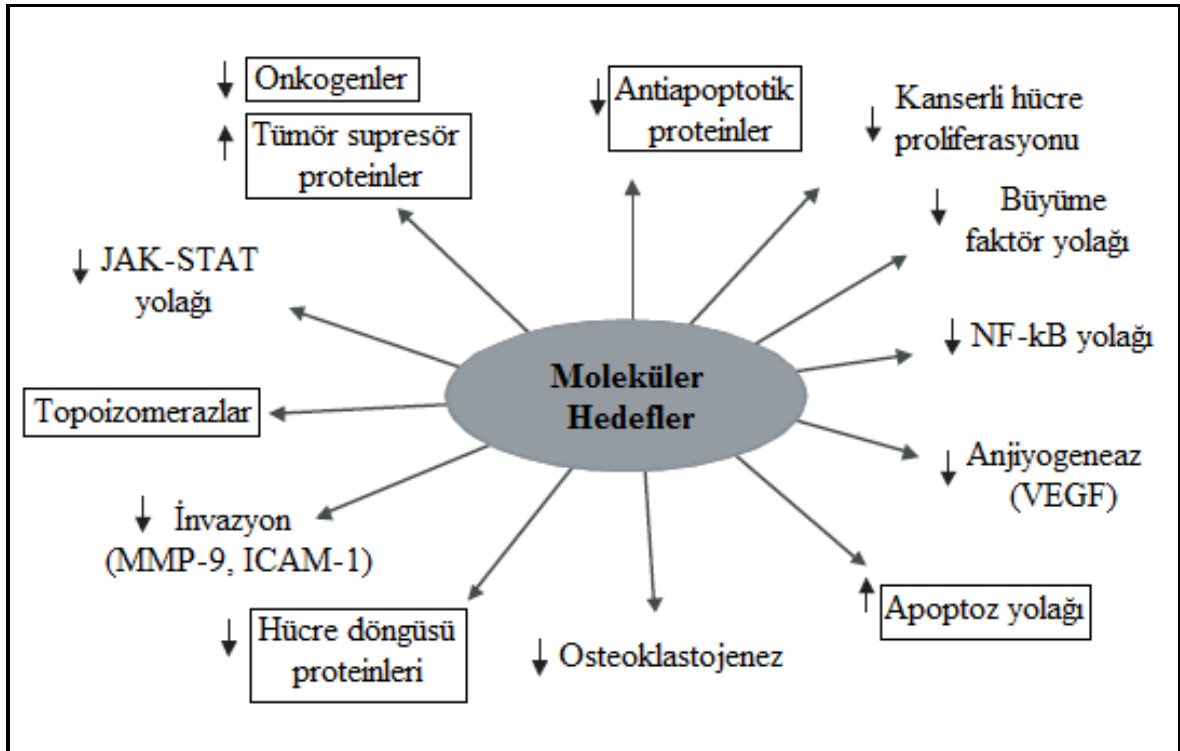
1.1.1 Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde; tümörün organizmada bulunduğu dokuya, hastanın fizyolojik durumuna ve tümörün karakterine bağlı olarak geniş bir yelpazede çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedaviler arasında kemoterapi, radyoterapi, gen terapisi, immunoterapi ve monoklonal antikor terapileri kullanılmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde en yaygın kullanılan tedavi yöntemleri kemoterapi ve radyoterapidir. Tüm bunların ışığında erken teşhis ve tedavideki

Yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Kanser hastaları tıbbın belli bir evreden sonra çaresiz kalması durumunda alternatif tıp yöntemlerine başvurumaktadırlar. Amerika Birleşik Devletleri'nde zaman içinde artan ve son yıllarda topluma 40 milyar dolar maliyeti aşan alternatif tedavi yöntemleri (vitaminler, bitkisel ürünler, çeşitli beyin-vücut teknikleri) ulusal stratejilerin gelişmesine ve bu yöntemlerin bilimsel çerçevede sorgulanmasına neden olmuştur. Ülkemizde alternatif tıp alanında yapılan çalışmaların sayısı az olmakla birlikte bu alanda kullanılacak (özellikle bitkisel ajanlar) ürünlerin etkilerinin araştırılması sürmektedir.

1.2 Anti-karsinojenik Etki ve Fitokimyasallar

Son yıllarda gelişen moleküler biyoloji teknikleri, kanser biyolojisi ve oluşum mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, birçok bitkisel ajanın hücre içi sinyal yollarındaki hedef proteinlerin ekspresyonlarını etkileyerek tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2. Kanser tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı tedavi olarak kullanılan bitkilerin etkilediği hedef proteinler (Kutu içerisine alınanlar tez kapsamında çalışılan alanlardır.), (Aggarwal ve diğ. 2004'dan uyarlanmıştır).

1.2.1 Programlı Hücre Ölüm Yolağı; Apoptoz

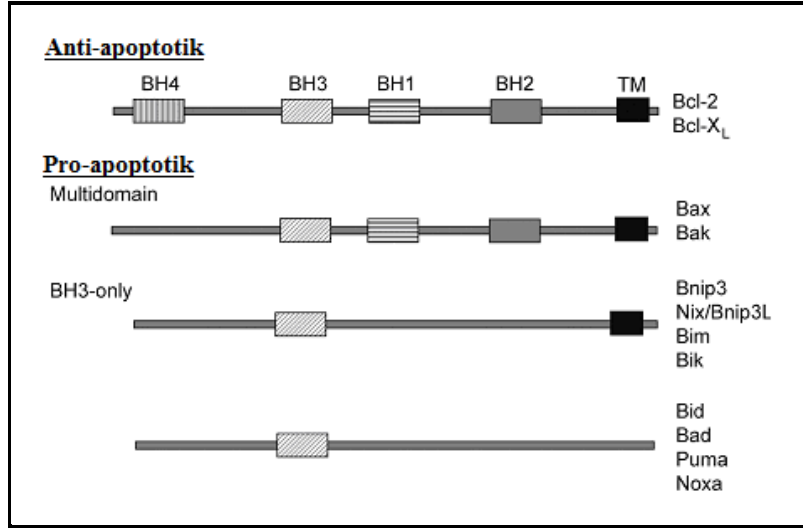


Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Doku homeostazisi, Apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır ve bu dengenin bozulması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

Apoptoz çeşitli hücre içi ve dışı sinyallerle uyarılabilir. Büyüme faktörlerinin yetersizliği, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış (hücre dışından fazla miktarda Ca^{++} iyonlarının girişi ya da endoplazmik retikulumdan Ca^{++} 'un sitoplazmaya salınması), tümör nekroz faktör (TNF), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle tümör baskılayıcı gen olan P53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler, hipertermi, radyasyon, hipoksik koşullar, oksidatif stres ve toksinler apoptoz oluşumuna neden olabilirler (Elmore 2007). Apoptoz mekanizması, bu uyarılara ve de hücre tipine göre farklılıklar gösterebilmektedir (Mattson ve Chan 2003). Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptoza gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Stratton ve diğ. 2009). Bundan dolayı, son yıllarda, anti tümör ilaç geliştirme araştırmalarında apoptozun indüklenmesi önemli bir strateji haline gelmiştir. Özellikle bitkilerden elde edilen aktif maddeler metastatik hücrelerde apoptoz tetikleyicisi olarak kullanılabilir (Senderowicz 2004).

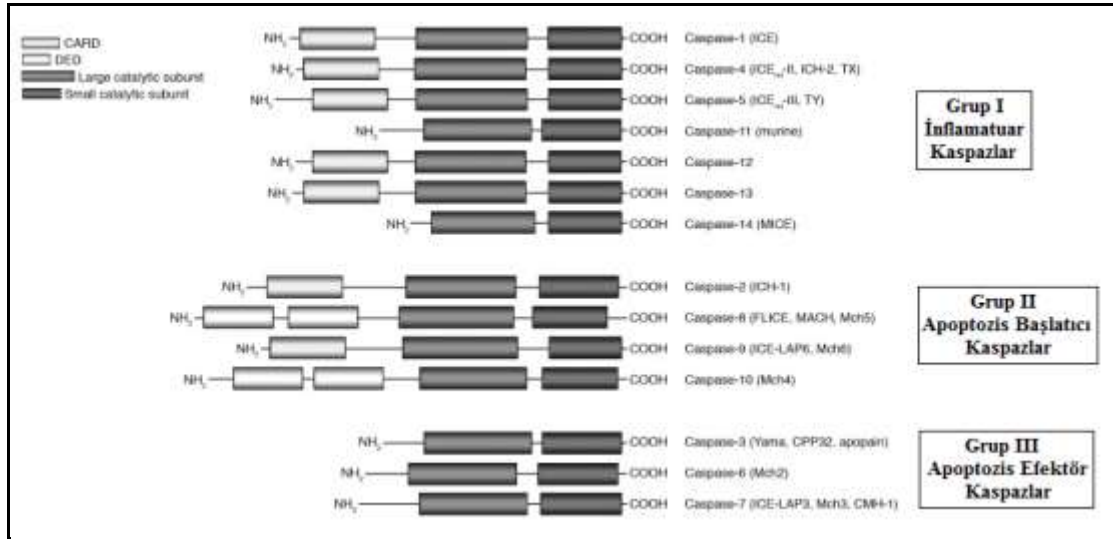
Apoptotik süreçte temel olarak iki protein ailesi önemli rol oynarlar. Bunlardan biri Bcl-2 ailesi diğeri ise kaspazlardır.

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptotik oluşumda büyük önem arz eden mitokondri membran bütünlüğü büyük ölçüde Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir (Garcia-Saez ve diğ. 2010, Gross ve diğ. 1999). Bcl-2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi vardır, hepsi en az bir Bcl-2 homoloji (BH) domaini içerir. Bu domain protein-protein etkileşimine aracılık eder. Aile üyelerinin çoğu ya üç ya da dört BH domaini paylaşır. Bcl-2 proteinlerinin bir grubu apoptozu inhibe (anti-apoptotik) eder, diğeri ise teşvik (pro-apoptotik) eder (Şekil 1.3) (Chipuk ve diğ. 2010, Pradelli ve diğ. 2010, Wang ve Youle 2009). Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (Hagberg ve diğ. 2009, Del Poeto ve diğ. 2008, Xiao ve Zhang 2008).



Şekil 1. 3. Bcl-2 ailesi proteinlerinin yapısal domainleri.

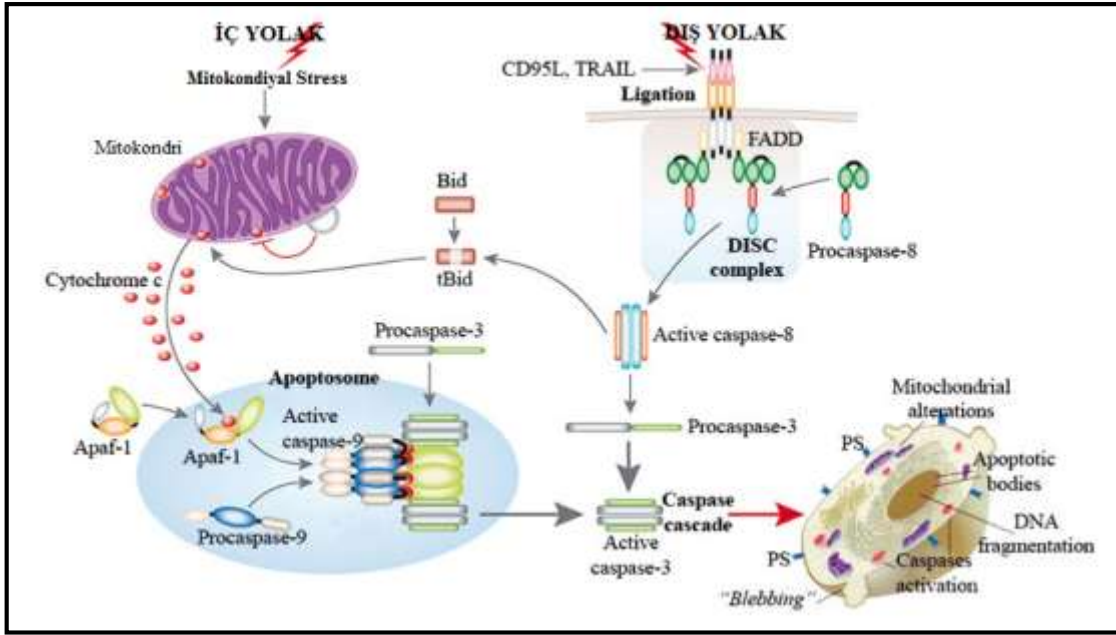
Kaspaz Ailesi: Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan aktif merkezlerinde sisteinlerin yer aldığı proteazlardır. Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) olmak üzere üç gruba ayrılır (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4. Kaspaz ailesinin CARD, DED ve büyük altbirim (p20) ve küçük katalitik altbirimi (p10) belirtilen üç ana grubu.

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara nakledeleler. Efektör kaspazlar ise hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP), nükleer membran proteini lamin A, DNA topoizomeraz II gibi 100 kadar proteini parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Lavrik ve diğ. 2005). Kaspazlar apoptoz dışında hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında da görevlidirler (Pop ve Salvesen 2009, Lamkamfil ve diğ. 2007).

Hücrede apoptoz, iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) yolak olmak üzere bilinen iki farklı yolla indüklenir (Şekil 1.5);



Şekil 1. 5. İç ve dış apoptoz yolları.

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

İç yolakta ise Apoptoz, radyasyon, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan P53'ün aktive olması gibi hücre içi uyarılar tarafından aktive edilir. Apoptozin bu mekanizması mitokondriye bağımlıdır. Apoptotik hücre içi sinyalin alınmasından sonra Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri olan Bax ve Bad proteinleri mitokondri membranında oligomerize olarak, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini artırır. Böylece mitokondriden; sitokrom c, sekonder mitokondri türevli kaspazlar/direkt Apoptoz inhibitörünü bağlayıcı protein (Smac/DIABLO) ve Apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi mediyatörler salınır. AIF, direkt olarak nükleusa gider ve buradaki endonükleaz G'yi aktive ederek DNA'da fragmentasyona neden olur. Smac/DIABLO, Apoptoz inhibitör proteinine (IAP) bağlanarak kaspaz-9'un inaktive olmasını engeller. Sitokrom c'nin ise mitokondriden sitoplazmaya salınması, apoptotik süreçte geri dönülmez bir noktayı gösterir (Hockenberry ve diğ. 1990). Sitokrom c önce bir sitoplazma proteini olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e daha sonra ise prokaspaz-9'a bağlanarak beraberce apoptozom denilen kompleksi oluştururlar. Oluşan kompleks önce



kaspaz-9'u daha sonra da efektör kaspazlar olan kaspaz-7, kaspaz-3 veya kaspaz-6'yı aktive ederek, Lamin B, PARP ve endonükleaz G enzimlerini parçalar ve onları aktiveleştirir. Sonuçta kromatin kondensasyonu ve DNA'nın fragmanlara ayrılması meydana gelerek hücre apoptoza gider (Hengartner 2000).

1.2.2 Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler

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

1.2.3 Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

İnsan kanserlerine yol açan kimyasal ve virüsler gibi ajanların hedeflediği, tümör patogenezinde yer alan ve ya bundan sorumlu olduğu düşünülen başlıca kanser genleri onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki genel kümede sınıflandırılırlar. Onkogenler, hücrel proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde anahtar rol oynayan protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar veya gen ürünlerinin aşırı ifade edilmesi sonucunda aktive olurlar. 100'ün üzerinde tanımlanmış onkogen bulunmaktadır. Onkogenlerin kodladığı proteinler dört sınıf altında toplanır (Turner ve diğ. 2003);

1. Büyüme faktörleri (örneğin, sis onkogeni)
2. Büyüme faktörü reseptörleri (örneğin, erb B1 ve erb B2 onkogeni)



3. İntrasellüler sinyal ileticiler (örneğin, ras onkogeni)
4. Nüklear transkripsiyon faktörleri (örneğin, myc, fos ve jun onkogenleri).

Bu dört değişik gruptaki proteinlerin aktivasyonu sonucunda kontrolsüz hücre proliferasyonu meydana gelir ve tümör oluşumu gözlenir.

Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler) ise kontrolsüz hücre proliferasyonunu önlemede yer alırlar. Bu genlerde mutasyonlar sonucunda meydana gelen fonksiyon kaybı tümör gelişimine sebep olabilir. Bu genlerden bazıları; Retinoblastoma (RB), P53, PTEN, BRCA-1 ve BRCA-2, Adenomatöz polipozis koli (APC), NF-1 ve NF-2 genleridir. Aktivasyonu fosforilasyonla düzenlenen RB proteininin defosforile formu E2F ailesi transkripsiyon faktörlerini bağlar ve hücre siklusunun G1'den S fazına geçmesine engel olur. Hücre büyüme faktörleri ile uyarıldığı zaman, SiklinD/CDK4/CDKN2A kompleksi pRB'ü fosforile ederek inaktive eder ve hücre siklusunun S fazına geçmesini sağlar. İnsan kanserlerinin çoğunda hücre siklusu bu noktada düzenleyen düzenleyicilerin (SiklinD, CDK4, CDKN2A ve RB) en azından biri mutasyonludur (Zhuang ve diğ. 2010, Semczuk ve diğ. 2004). Diğer bir önemli tümör baskılayıcı gen olan P53, insan kanserlerinde en sık mutasyon gösteren genlerden biridir (Machado ve diğ. 2010). P53 geni 17. kromozom üzerinde bulunur ve 11 eksondan oluşur. DNA hasarı sonrası ekspresyonu artar ve DNA tamiri tamamlanana kadar hücrenin S fazına girmesini engeller. Bu durumda, hücrede p53 proteini, p21 proteininin yapımını stimüle eder. P21, CDK2 ile birleşince siklin/CDK yolağını inhibe eder ve hücre bölünmede bir sonraki safhaya geçemez. Hücre siklusu durunca DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu artırır. Şayet hata giderilmez ise bu hücreleri apoptoza yönlendirerek yok edilmelerini sağlar. Bir başka tümör baskılayıcı gen olan fosfataz ve tenzin homoloğu (PTEN), hücrede normal şartlarda hücre büyüme ve sağ kalımı için gerekli olan Akt cevabının inhibisyonunu düzenlenmesini sağlar (Jorge ve David 2008, Mayer ve Grummt 2006, Zhi ve diğ. 2008). PTEN, fosfotidilinozitol 3, 4, 5-trifosfat (PIP3)'ü defosforile eder ve PIP3'ün defosforilasyonu Akt/PKB sinyal yolağının inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Birçok çalışılan kanser hücre hattında PTEN ekspresyonunda azalma ile artan Akt/PKB aktivitesi hücre yaşamını, mitozu ve anjiyogenezi uyarır, apoptozu inhibe eder (Abate-Shen ve Shen 2000, Nelson ve diğ. 2003, Dong 2006).

1.2.4 Topoizomerazlar

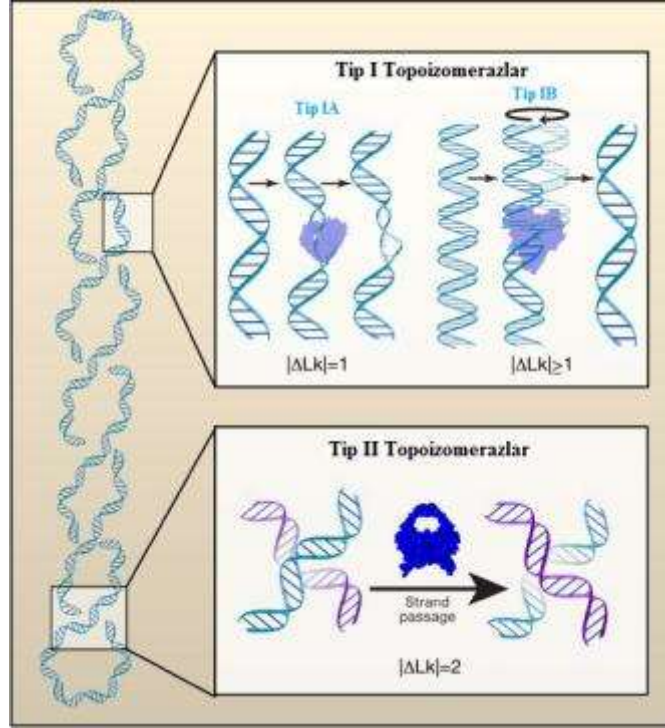
Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda, DNA replikasyon, transkripsiyon ve rekombinasyon işlemlerinde mutlak gerekli olan enzimlerdir. "Hücre proliferasyonunda gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı olarak bölünen kanser



hücrelerinin çoğalmasını durdurabilir (Pindur ve Lemster 1998).” mantığı bu proteinleri antikanser ilaç hedefleri haline getirmiştir. Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, DNA'ya bağlanan ilaçların anti-tümör aktivitelerinin, onların DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe etme yeteneklerine bağlı olduğunu göstermiştir. Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, anti-tümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Potmesil ve Kohn 1991, Ralph ve diğ. 1994, Osheroff 2003).

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

Topoizomerazlar IUPAC adlandırma sisteminde tip I: EC5.99.1.2 (ω - protein, topoizomeraz I) ve tip II: EC5.99.1.3 (topoizomeraz II, giraz) olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Topoizomeraz enzimleri DNA'yı, tek iplikten (tip I) veya iki ipliğini de kırarak (tip II) etki gösterirler. Tip I DNA topoizomerazlar tek iplik kırıkları oluşturup ATP enerjisine ihtiyaç duymadan reaksiyonlarını gerçekleştirirken, tip II DNA topoizomerazlar ATP ihtiyacı duyan enzimlerdir (Şekil 1.6).



Şekil 1. 6. DNA topoizomeraz enziminin tipleri.

1.3 Deneysel Materyal: *Urtica urens* L. (Küçük Isırgan Otu)

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

Urtica urens L. (Küçük Isırgan Otu): Tek yıllık, monoik ve otsu bir bitkidir (Şekil 1.7). Boyu 10-60 cm arasında olabilir. Yaprakları, 2-4 cm uzunlukta, oval ya da eliptik şekillerde, açık yeşil renkli, saplı, dişli kenarlı, yakıcı ve tüylüdür. Ayrıca, yaprakları *U. dioica*'ya göre daha küçüktür. Çiçekler küçük, yeşil ve tek evciklidir. Meyve kanarları tüylü merkezi tüysüzdür. Bursa-Uludağ, Gümüşhane, İzmir-Bornova, Mersin-Tarsus ve Çukurova da yayılış göstermektedir (Davis 1982). Bu bitkininde yaprakları da Ege Bölgesi'nde sebze olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999).



Şekil 1. 7. *Urtica urens* L. bitkisi.

Urtica dioica ve *Urtica urens*'in yaprak yüzeyinde bulunan yakıcı tüylerinde formik asit, histamin, serotonin ve kolin gibi bitkilere yakıcı özelliği veren kimyasallar bulunmaktadır (Emmelin ve Feldberg 1947, Barlow ve Dixon 1973, Andersen ve Wold 1978). *Urtica dioica*'nın yaprakları kafeik asit esterleri, özellikle kafeik malik asit gibi fenolik asitler, flavonoidler, çeşitli vitamin (α -tokoferol ve C vitamini) ve mineraller (Se, Zn, Fe ve Mg), terpenler (mono- ve di-terpen diol ve terpen glikozitleri), tanenler, yağ asitleri, klorofil, aminoasitler ve steroller gibi maddelerce zengindirler (Hughes ve diğ. 1980, Booth ve Bradford 1963, Adamski ve Bieganska 1980, Chaurasia 1987, Schomaker ve diğ. 1995, Kraus ve Spiteller 1991, Anikina 1996, Ji ve diğ. 2007, Gravel ve diğ. 1994, Rzemkowska and Ostrowska 1994, Salamon ve diğ. 2001). *Urtica dioica*'nın aksine, *Urtica urens* daha fazla diyet ile tüketilmesine rağmen detaylı bir içerik analizi yoktur. Ayrıca, bitkilerin gösterdiği farklı biyo-etkiler içerdikleri temel bileşiklerden ziyade azınlıkta olan ikincil bileşiklerden kaynaklığı bilinmektedir.

Isırgan otu taşıdığı maddelerin, farklı etki mekanizmaları bulunduğundan farklı biyolojik aktiviteler göstermektedir (Chrubasik ve diğ. 2007). *Urtica dioica*'dan elde edilen ekstraktların içinde bulunan bileşikler bu bitkinin anti-inflamatuar etki göstermesine neden olmaktadır (Baeuerle ve Henkel 1994, Obertreis ve diğ. 1996). Isırgan otu kökünden izole edilen küçük molekül ağırlıklı lektin aglutinin HIV, soğuk algınlığı ve influenzaya sebep olan virüsleri baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca bu lektin, immün sistemi stimüle etmektedir (Balzarini ve diğ. 1992, Galelli ve diğ. 1995). Tüm bunların yanı sıra, çok sayıda çalışma, *Urtica* türlerinin antioksidan etkilerini gözler önüne sermektedir (Gülçin ve diğ. 2005, Gülçin ve Ezer 2004, Mavi ve diğ. 2004, Harput ve diğ. 2005). Fakat bu antioksidan etkinin moleküler mekanizması hakkında literatürde bir bilgi yoktur. Ayrıca bu bitkinin analjezik ve ağrı kesici (Yongna ve diğ. 2005), anti-mikrobiyal (Gülçin ve diğ. 2005, Uzun ve diğ. 2004), antibakteriyel (Aksu ve Kaya 2004), tansiyon düşürücü ve anti-diyabetik (Newall ve diğ. 1996, Ziyat ve diğ. 1997, Bnouham ve diğ. 2003, Farzami ve diğ. 2003), kardiyovasküler (Testai ve diğ. 2002), diüretik



(Tahri ve diğ. 2000) ve anti-romatizmal (Riehemann ve diğ. 1999) etkilerini bildiren araştırmalar mevcuttur.

Isırgan otunun birçok türü ülkemizde ve de dünyada halk hekimliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Türkiye de yapılan birçok etnobotanik çalışma, ısırgan otunun halk arasında kanser, böbrek rahatsızlığı, solunum yolları rahatsızlığı ve öksürük tedavisi, saç dökülmelerini önleme, nefes darlığı, felç, tansiyon, mide ağrısı, romatizma, idrar yolları hastalıkları, mantar enfeksiyonları, kemik erimesi, egzama, kadın hastalıkları, hipertansiyon, böbrek taşı düşürme ve hazmı kolaylaştırma gibi durumlarda sıklıkla kullanıldığını göstermektedir: (Tuzlacı ve diğ. 2001, Koç 2002, Şimşek ve diğ. 2004, Gülçin ve Ezer 2004, Çalışkaner ve diğ. 2004).

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

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



1.4 Amaç

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

Ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan bitkilerden biri de ısırgan otudur (*Urtica urens* ve *Urtica dioica*). Türkiye’de erişkin ve pediatrik onkoloji hastalarıyla yapılan anket çalışmaları sonuçlarına göre ısırgan otu “Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi” olarak hastaların en fazla kullandığı bitki olarak karşımıza çıkmaktadır (Gözüm ve diğ. 2003, 2007). Ayrıca, 2006’da yapılan vaka sunumuna göre, yemek borusu kanserine sahip bir hastanın ısırgan otunu kaynatıp içmesi sonucunda yemek borusundaki kitlenin yok olduğu ve hastalıktan kaynaklanan komplikasyonların azaldığı gözlenmiştir (Aydın ve diğ. 2006). Tüm bunların yanı sıra, ısırgan otu ekstrelerinin, prostat kanser hücre hattında ve prostat kanser hastalarından alınan doku parçalarında anti-proliferatif etkilere neden olduğu saptanmıştır (Konrad ve diğ. 2000). Bu nedenlerle, kanser ilacı olarak kullanılabilir fitokimyasallar içerme ihtimalinin yüksek olması ve insanlar tarafından yaygın olarak kullanılması, ısırgan otunu insan sağlığı açısından önemli yapmaktadır. Tüm bunlara rağmen, bu bitkinin kanseri önleyici etkisinin mekanizması hakkında literatürde bir bilgi yoktur. Önerilen araştırma konusu ile fitokimyasal bileşenleri bilinmeyen ve ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Urtica urens* (küçük ısırgan) bitkisinin fitokimyasal bileşenlerinin tanımlanarak anti-karsinojenik, anti-oksidan ve



tümör baskılayıcı etkilerinin etki mekanizmaları ile birlikte moleküler düzeyde saptanmasını sağlamıştır.

Bu amaçla,

1. *Urtica urens*'in yapraklarından ve tohumlarından çeşitli çözücülerle değişik ekstreler elde edildi.

2. Elde edilen ekstrelerin kromatografik teknikler ile fraksiyonlanması ve zenginleştirilmesi gerçekleştirilerek LC-MS ve NMR analizleri ile fitokimyasal etken maddeleri tanımlanmaya çalışıldı.

3. Elde edilecek fraksiyon küçük ısırgan otunun alternatif ve tamamlayıcı tedavi amaçlı kullanıldığı yaygın kanser türlerinden insan prostat kanser hücre hattına (LNCap), insan akciğer adenocarcinoma hücre hattına (A549) ve insan kolon kanser hücre hattına (Caco2) uygulandı ve

a. sitotoksik etkileri ve etkin dozları saptandı.

b. anti-karsinojenik etki mekanizmalarında rol oynayan hücre döngüsü düzenleyici genler (siklin2, CDK4, p21 ve p16) ile onkogen ve tumor baskılayıcı genlerin (ras, myc, pRb, p53, PTEN) ekspresyon düzeyleri tespit (mRNA ve protein düzeyleri) edilerek transkripsiyonel ve translasyonel etki mekanizmaları tanımlandı.

c. apoptoz yolaklarında çalışan Bcl-2, bax, Kaspaz 3, 8 ve 9, APAF-1, Fas, TNF gibi proteinlerin gen ekspresyon ve protein düzeyleri tespit edilecek ve böylelikle transkripsiyonel ve translasyonel etki mekanizmaları ortaya konuldu.

d. ayrıca anti-oksidatif olarak çalışan proteinlerin düzenlenmesinde rol oynayan Nrf-2 ve diğer proteinlerin (Akt/PKB ve MAPK ERK1/2 yolakları) değişimleri gen ve protein seviyesinde belirlenerek etki mekanizmaları tanımlandı.

e. prokarsinojen/karsinojen metabolizmasında önem arz eden spesifik sitokrom P450 izozimlerinin düzenlenmesinde rol alan Ahr, Car, PXR ve RxR genlerin ekspresyon ve protein düzeyleri üzerine etkileri belirlenerek, regülasyon mekanizmaları tanımlandı

f. İnsan tüm genom transkriptom çalışmaları ile bitkinin olası diğer etkilerinin sorumlu yollarda bulunan proteinlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler belirlenerek etki mekanizmaları tanımlanmaya çalışıldı.

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



2. MATERYAL ve METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Agaroz (Sigma, A9539); Akrilamid (Sigma, A8887); Amonyum persülfat (APS, Sigma, A3678); Asetik asit (Sigma, 27225); Bikinkoninik asit (BCA, Sigma, D8284); Bis-akrilamid (Sigma, 146072); Bromfenol mavisi (Sigma, B6131); Çinko klorür ($ZnCl_2$, Sigma, 31650); Dietanolamin (Merck, 803116); Dietilpirokarbonat (DEPC, Bio Basic; DB0154); Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, D2650); Etidyum bromür (EtBr, Bio Basic; D0197); Etil asetat (EA, Sigma, 27227); Etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma, 5134); Fenazin metosülfat (PMS, Sigma, P9625); Gliserol (Sigma, G2289); Glisin (Bio Basic, DR0235); Hekzan (Sigma, 208752); Hidroklorik asit (HCl, Sigma, 07102); Kloroform (Sigma, 24216); Magnezyum klorit ($MgCl_2$, Sigma, 63072); Metanol (Sigma, 24229); Nitroimidazol mavi klorür (NBT, Sigma, N6876); Nonidet P-40 (NP-40, BioShop, NON505); Polisorbat 20 (Tween-2, Sigma, P1379); Proteaz inhibitör tableti (Santa Cruz, sc29130); Protein ladder (Abm, G252); Potasyum sodyum tartarat (Rochelle tuzu, Sigma, S2377); Sığır serum albumini (BSA, AppliChem, A1391); Sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, L4390); Sodyum deoksikolat (Sigma, D6750); Sodyum fosfat dibazik (Sigma, S9390); Sodyum fosfat monobazik (Riedel, 04269); Sodyum klorit ($NaCl$, Sigma, 13423); Tetrametiletilendiamin (TEMED, Sigma, T8133); Tris (Bio Basic; DB0194); Triton X-100 (Bio Basic, DB0198); Yağsız süt tozu (Non-fat Dry Milk, Santa Cruz, sc2324); 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311); 2-Merkaptoetanol (2-ME, Merck, 8.05740); 2-Propanol (Sigma, 24137); 5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat tuzu, p-toluidin (BCIP, Sigma, B6149); 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM0323).

Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar: Dulbecco Modifiye Eagle Medyum (DMEM, Sigma, D5796); Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10270); L-glutamin (Sigma, G7513); Penisilin (Sigma, P4333); Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640, Sigma, R8758); Tripsin-EDTA (Gibco, 25200).

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



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

2.2 Metot

2.2.1 *Urtica urens* (Küçük ısırgan otu) Özütlerinin Hazırlanması

2.2.1.1 *Yaprak Özütlerinin Hazırlanması*

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)'nun yaprakları köklerden ve ana gövdesinden ayıklanarak makro kirlilikten uzaklaştırılması için önce çeşme suyu ile daha sonra da ultra saf su ile yıkanmıştır. Ardından yapraklar kuruyana kadar gölgede bekletilmiş ve ışık almayan serin dolaplarda muhafaza edilmiştir. Kurutulan küçük ısırgan otu yaprakları el yardımı ile küçük parçalara ayrılmış ve bitkisel materyalde ekstraksiyon çalışmalarına başlamadan önce vakumlu etüv kullanılarak nem tayini yapılmıştır. Çalışmalarımızın devamında Franz von Soxhlet tarafından icat edilen soxhlet metodu ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Soxhlet metodu bir katının sıcak çözücüm ile ekstraksiyonunda kullanılır. Ekstraksiyon boyunca balonda kaynayan çözücünden gelen buhar cam tüp içerisinde yükselmeye başlar. Yükselen buhar ekstraksiyon çemberine girer ve su ile soğutulmuş kondensatör tarafından yoğunlaştırılır. Yoğuşturulan çözücü ekstraksiyon çemberini doldurur ve çemberdeki kağıt ekstraksiyon yüksüğü içindeki maddenin yağını çözer. Çemberin altına bağlı olan sifon tüp de çözücüyle dolar. Çözücü seviyesi çember içerisinde yükseldikçe, sifon otomatik olarak çözücü ve ekstrakte edilmiş olan yağı aşağıda bulunan balona geri akıtmaya başlar. Soxhlet cihazı ile küçük ısırgan otunun hekzan, kloroform ve etil asetat çözücüleriyle ekstraksiyonları yapılarak özütler elde edilmiştir (Şekil 2.1). Bunun için kurutularak ufalanmış yaklaşık 200 gram ısırgan otu yaprakları soxhlet aparatına yüklendi ve sonrasında da çözücüler sırasıyla 10-15 sifon olacak şekilde bitki kalıntısı üzerinden geçirilerek özütler elde edilmiştir. Ardından döner buharlaştırıcı kullanılarak çözücüler özütlerden uzaklaştırılmış azot gazından geçirilerek uygun koşullarda saklanmıştır.



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

2.2.1.2 Tohum Özütlerinin Hazırlanması

Yaklaşık 350 gram ısırgan otu tohumu değirmenden geçirilerek parçalandı ve bitki materyali 2lt'lik kavanozlara eşit şekilde konuldu ve üzerine hekzan çözücüsü eklenerek serin güneş almayan bir yerde sürekli karıştırılarak meserasyona bırakıldı. 3 gün arayla hekzan ekstraları süzüldü ve üzerine tekrar hekzan çözücüsü eklendi. Bu işlem dört defa tekrarlandı. Daha sonra bitki materyalinin üzerine sırasıyla kloroform, etil asetat ve metanol çözücülerini eklenerek yine üçer gün ara ile dört defa her bir çözücü ile ekstraksiyona tabii tutuldu. Her ekstrenin çözücüsü evapore edildi ve tartıldı. Bu sayede verimler hesaplandı.

2.2.2 GC-MS Analizi

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

GS-MS analizleri Agilent 7890A GC'ye bağlı 5975C İnert Mass Selektif Dedektörden oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Hekzan özütü (yaklaşık 0,1g) 5 ml hekzanda çözüldü. Bu çözültiden 1 ml alınıp üzerine 4 ml hekzan ve 5 ml 1 M potasyum hidroksit (MeOH'de çözülmüş) çözültisi ilave edilerek şiddetli şekilde 30 saniye vorteksenerek esterleştirme



işlemi yapıldı. Oluşan üst fazdan (hekzan) 1 ml alındı ve 0,45 µm'lik filtreden şırınga yardımıyla süzülerek GC-MS cihazına yüklendi. GC-MS şartları Tablo 2.1'de verilmektedir.

Tablo 2. 1. GC-MS şartları;

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

Esterleştirilen hekzan özütü DB-WAXETR MS kapillar kolondan geçirilmiştir (60 m x 320 µm x 0,25 µm). Taşıyıcı gaz olarak Helyum gazı kullanılmıştır. Akış hızı olarak 1ml/ dakika olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 120°C olup, 20 dakikada 250°C'ye ulaşması sağlanmış ve bu değerinde sabit tutulmuştur. Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektrallerine göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada bileşenlerin karakterizasyonu için dbwax, Wiley7, Nist05, Nist02 Famedb23, Famd kütüphaneleri kullanılarak çıkan spektrumların otomatik taranması ile gerçekleştirilmiştir.

Tohum hekzan özütlerinde belirlenen maddelerin azlığından dolayı **Sililleme prosedürü** kullanılarak aynı özütlerin GC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için ekstraktların 1 ml metanol ile endorf içerisinde çözünmesi sağlanarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Daha sonra bu hacmin üzerine 300 µl kloroform eklenerek 12.000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj yapılmıştır. Böylece apolar özellikli maddeler kloroforma bağlanarak tüpün alt kısmında bir çökelti oluşturur ve elimine edilebilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım yeni bir endorfa alınarak üzerine 300 µl kloroform eklendi ve 12.000rpm'de 10 dk süre ile tekrar santrifüj yapıldı ve oluşan süpernatant hacimden 100 µl yeni endorflara alınarak sililleme işlemine geçildi. Öncelikle endorf tüpler içerisindeki çözücülerin uçurulması için hızlı vakum konsantratörü (SpeedVac, Savant DNA 120, ThermoScientific) kullanıldı. Tüpler içerisindeki çözücü uzaklaştırıldıktan sonra, her bir tüpe 30 mg/ml piridin içerisinde çözünmüş olan, metoksiaminhidroklorid'den 20 µl ilave edildi ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda her bir tüpe 40 µl MSTFA (*N*-metil-*N*-[trimetilsilil] triflorasetamid eklendi. Elde edilen son 60 µl'lik son hacim GC-MS kılcal viallerine aktararak analize hazır hale getirildi. Fırın sıcaklığı 100 °C de 10 dakika bekletildi, 5 °C/dak artış ile 200 °C yükseltildi. 20 dakika aynı sıcaklıkta bekletildi. 5 °C/dak artış ile 270 °C yükseltildi. Son sıcaklıkta 36 dakika bekletildi. Örnekler split ile kolona enjekte edildi. Bileşiklerin tanımlanması yine aynı ticari kütüphanelerinde taranması ile belirlendi.



2.2.3 LC-MS Analizi

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

Küçük ısırgan otu yaprak ve tohumlarından elde edilen kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin LC-MS analiz çalışmaları yapıldı. LC-MS analizleri Agilent 1260 infinity LC (Agilent technologies)'ye bağlı 6210 TOF-MS (Agilent technologies) oluşan LC/ MS kullanılarak yapılmıştır. Ham özütler 1000 ppm derişiminde hazırlandı. Bu örneklerden 100 µl alınarak 1000 µl'ye seyreltildi ve 0,45 µm'lik filtreden şırına yardımıyla viale süzülerek LC-MS cihazına verildi. Özütler ZORBAX SB-C18 (4,6x100 mm, 3,5 µm) kolondan geçirilmiştir ve akış hızı olarak 0,6 µl/dk belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 35°C'de tutulmuştur. Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada salisilik asit, kersetin, kaftarik asit, gentisik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, 4-hidroksibenzaldehid, şikorik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glukozit, rosmarinik asit, protokateşuik asit ethyl ester, sinamik asit, naringenin, kamperol, gallik asit, klorojenik asit, kateşol, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, rutin, hesperidin gibi fenolik maddeler standard olarak kullanılmış ve bu maddelerin değişik konsantrasyonlarının kolonda yürütülmesiyle elde edilen sonuçlar standard eğri çizimi için kullanılmıştır. Bu standard eğri grafiği ham özütler ve alt fraksiyonlar içinde bulunan aynı fenolik madde miktarlarının tayini için kullanılmıştır. Ayrıca, Karşılaştırmada bileşenlerin karakterizasyonu için dbwax, Wiley7, Nist05, Nist02 Famedb23, Famd kütüphaneleri kullanılarak çıkan spektrumların otomatik taranması ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.4.1 Besiyeri Hazırlanışı

Çalışma boyunca kullanılacak olan hücre hatları için gerekli olan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ve Minimum Essential Medium (MEM) besiyerlerine %10 olacak şekilde Fötal Dana Serumu (FBS, Sigma) ve %1 penisilin/streptomisin (Sigma) eklenerek hazırlanmış ve 37 °C saklanılmıştır.



2.2.4.2 Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

Çalışma boyunca kullanılan insan akciğer (A549), prostat (LNCaP) ve kolon (CaCo2) hücreleri elde edildikten sonra istenilen morfolojik karaktere ulaşmaları ve büyümeleri sağlandı ve bu safhadan sonra yeterli sayıda düşük pasaj sayısında stok hücre uygun ortamlarda stoklandı. Bu işlemden sonra, hücreler haftada 2 kez düzenli pasajlandı. Üretim sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskları kullanıldı. %10 Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren ortamda sıvı azot ile dondurulmuş olarak kuru buz içerisinde korunarak bize gelen hücreler 37°C'de eriyene kadar bekletildi, eridikten sonra flaska ekildi ve üzerine 10ml DMEM, 10ml RPMI, 10ml EMEM besi ortamı eklenerek 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün DMSO'dan kurtarmak için flastaki besiyeri değiştirildi. Hücreler flastı doldurduktan sonra besiyeri pipetle uzaklaştırıldı, hücreler birkez Ca⁺² ve Mg⁺² tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı. Hücreler çoğaltıldıkları kültür kaplarında tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Bu işlem hücreler yeni alındığı için mikroskopik kontrol ve takip ile belirlendi. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 2ml %0,25'lik tripsin ile yaklaşık 5 dak. muamele edilerek hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyon haline getirilen hücreler steril santrifüj tüpüne alındıktan sonra tripsininin aktif hale gelmesi için üzerine 10ml DMEM, 10ml RPMI ve 10 ml'de EMEM besiyeri eklendi. 2000xg hızda 5dak. Santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1ml besiyeri eklenerek, ependorfta hazırlanan tripan mavisi ve hücrekarışımı (1:1) thoma lamında sayıldı ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi. Her ne kadar hücre sayımı ve sitotoksisite testleri için farklı testler (hücre sayıcı, WST, Kristal viyole gibi) kullanılmış olmasına rağmen hücrelerin görsel olarak kontrolünü sağlamak amacıyla diğer deneylere paralel olarak klasik tripan mavisi deneyi uygulandı

2.2.4.3 Sitotoksisite Çalışmaları

Çalışmamızda A549, LNCaP ve CaCo2 hücrelerinin kendi laboratuvar koşullarımızda büyüme ve gelişmesi optimize edildi. Bu evreden sonra hücreler kullanılarak sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi. Projede *Urtica urens* yaprak ve tohum kısımlarından elde edilen hekzan, etil asetat, kloroform ve metanol ana özütleri ve fraksiyonları suda çözünmediği için hücre kültürü işlemlerinde iyi bir çözücü olarak bilinen dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldükten sonra steril etmek için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi. Hücre sayısı hesaplandıktan sonra her kuyucukta 1x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi ve plakaların üzeri toplamda 200 µl olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin plakaya



yapışması için 24 saat %5'lik CO2 inkübatöründe, %95 nem ortamında bekletildi. 48 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda DMSO konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde hücrelere uygulandı. 48 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı, sonrasında her kuyucuğa 100 µl yeni besiyeri eklendi. Hücreler üzerine sitotoksisite deneylerinde kullanılan 10µl WST reaktifi eklendi. Hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak 450-690nm'de 30 dakikalık inkübasyon sonunda ölçüldü. Hiç özüt ile muamele etmediğimiz control grubuna %0,1 DMSO içeren besi yeri konuldu. Değişik konsantrasyonlardaki *Urtica urens* ile muamele ettiğimiz gruplar kontrol grubu ile karşılaştırarak, değişik dozlardaki ekstrenin hücre canlılığına olan etkisi saptandı.

2.2.4.4 A549, LNCaP, CaCo2 hücrelerine Urtica urens Özütlerinin Uygulanması

Hücrelerde *Urtica urens* yaprak ekstresi, hekzan (H), etil asetat (EA), kloroform (K) ve fraksiyonları etil asetat D (EAD) ve E (EAE), kloroform 1 (K1) ve 7 (K7), tohum ekstresi olan hekzan katı (HK), kloroform (K), metanol (M) maddelerinin LD50 değerleri sitotoksisite deneyi ile belirlendikten sonra bu dozların A549, LNCaP, CaCo2 hücrelerinde belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerindeki etkisini test etmek için hücre kültürü ortamında steril şartlarda hücrelere uygulandı. Bunun için 10mm petrilere 10⁶ hücre ekildi ve 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen dozlar bu hücrelere uygulandı. Uygulamadan 24 saatin sonunda hücreler RNA izolasyonu için 600 µl "TRIzol® reagent" reaktifi ile toplandı.

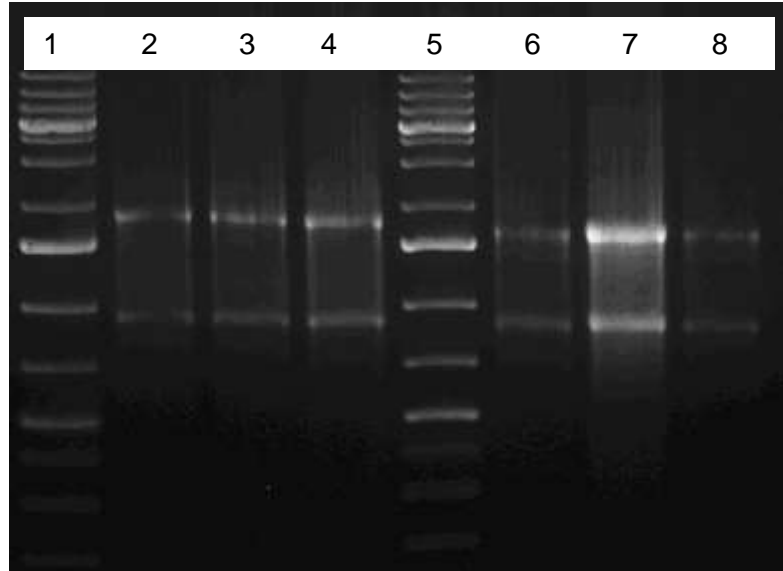
2.2.5 RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu TRIzol® solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlarına göre gerçekleştirildi ancak kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulandı. Buna göre sitotoksisite çalışmalarında belirlenen dozlar uygulanan hücrelere 600 µl TRIzol® solüsyonu eklendi ve 18G uçlu steril iğne ile 10 defa çekip bırakılarak homojenize edildi. Ardından 100 µl kloroform eklenerek 1 dakika düşük hızda karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında ve 5 dakika buzda inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. RNA içeren supernatant yeni steril eppendorfa alınarak üzerine eşit hacimde soğuk saf izoprapanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de, 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklendi ve oluşan pelet dağıtıldı. 7.500 rpm'de, 40°C'de 5 dakika santrifüjden sonra RNA içeren pelet alet çatısı altında kurutuldu ve 45 µl RNAaz içermeyen su ile çözülerek -80°C

muhafaza edildi. İzole edilen RNA kalitesi %1 agaroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlendi. Belirlenen RNA'ların kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntüledi ve konsantrasyonları Nano Drop cihazında ölçüldü.

2.2.5.1 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. %1'lik agaroz jel, Tris-Asetikasit-EDTA(TAE) tampon ile hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapıldı. Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutularak üzerine 1 µL EtBr (Etidyum bromür) eklendi ve elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroforez tankına, kuyucuklar RNA'nın '- den +' ya yürüyebilmesi için elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tankı RNA' yı yürütmek için 1X TAE yürütme tamponuyla doldurulmuştur. 3µL RNA örneği, 5µL steril su ve 2µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikro pipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 Volt, maksimum 500 mA de 45 dak. süre ile yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis Prolmage Analysis System (DNR Biolmaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. İzole edilen RNA'ların 1%'lik agaroz jel elektroforezi. Elde edilen RNA'lar (5 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüledi. Hat 1 ve 5: GeneRuler™ 1kb bp DNA Marker; Hat 2:Kontrol A549; Hat 3 ve 4: Hekzan ekstresi ile muamele edilmiş A549; Hat 6: Kontrol A549; Hat 7 ve 8: Etil Asetat ekstresi ile muamele edilmiş A549.

2.2.6 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek ZamanlıPZR



Gerçek zamanlı PZR çalışmaları laboratuvarımızda bulunan Bioneer marka cihazımızla yapıldı. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları ABM Kilogreen qPCR Mastermix kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Primer ve cDNA miktarları, yapışma sıcaklıkları, eklenen Mg²⁺ laboratuvarımızda optimize edildi. Bununla ilgili sonuçlar aşağıda verilmektedir. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar Exicycler3 programı kullanılarak hesaplandı ve “housekeeping” gen olan beta aktin’e göre normalize edildi. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı, Amplifikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak 36 adet genin uygulanma sonucunda mRNA düzeyinde ekspresyon değişimleri belirlendi. Bu amaçla dizayn edilen primer dizileri Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2. 2. Deneylerde kullanılan primer dizileri.

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



	CACCAGGGTTACCTTGATCTCC
CDKN1A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1)	TGGAGACTCTCAGGGTCTGAAA
	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
CDKN2A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A)	CAGTAACCATGCCCCGATAGA
	AAGTTTCCCGAGGTTTCTCAGA
c-MYC (MYC proto-onkogen proteini)	TCCATGAGGAGACACCGCC
	GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT
CyclinD1 (Siklin D1)	CGCCCCACCCCTCCAG
	CCGCCAGACCCTCAGACT
CyclinD2 (Siklin D2)	TTCCGCAGTGCTCCTACTTC
	CGCACTTCTGTTCCCTCACAG
ERK2 (Mitogen aktive protein kinaz 1)	CATCGCCGAAGCACCATTCAAG
	GATAAGCCAAGACGGGCTGGAG
E2F4 (Transkripsiyon faktörü E2F4)	CATCTGCTGTTTCTACACCTCCAC
	CTATTTGGACGTGAGGCTTCT
FAS (Tümör nekroz faktör reseptör ailesi üyesi)	GACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTA
	CTGTTTCAGGATTTAAAGTTGGAGATT
HRAS (GTPaz Hras)	ACCCGGCAGGGAGTGGAGGAT
	CATCAGGAGGGTTCAGCTTCCGC
JNK1 (Mitogen aktive protein kinaz 8)	GCGCGGATCCTTGCTTGCCATCATGAGCAG
	GCGCGGATCCCAGACGACGATGATGATGGA
KRAS (GTPaz Kras)	CTCGACACAGCAGGTCAAGA
	GGCATCATCAACACCCTGTC
NRF2 (Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2)	ACACGGTCCACAGCTCATC
	TGTCAATCAAATCCATGTCCTG
PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz)	ACACCCCTTGACGACTTTC
	GATGGGTTCTCTGAGCTTCG
PTEN (Fosfataz ve tensin homolog)	CCCAGACATGACAGCCATC
	TCTGCAGGAAATCCCATAGC
PXR (Pregnan X reseptörü)	AGACTGGAACCTGGGAGT
	GGGAGAAGAGGGAGATGG
P38 (Mitojen-aktive protein kinaz)	GTTGGAACCCAGGGGCTGA
	GGCATGTGCAAGGGCTTGGG
P53 (Tümör protein p53)	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT
	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC
RB (Retinoblastoma protein)	ATCTATATTTACCCCTGAAGAGTC
	TTCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA
RXR (Retinoid X reseptörü)	TTCGCTAAGCTCTTGCTC
	ATAAGGAAGGTGTCAATGGG



TNF (Tümör nekroz faktörü)	CGCCACCACGCTCTTCTG
	GCCATTGGCCAGGAGGGC
TRAF2 (TNF reseptör-bağlantılı faktör 2)	CTAGGAATGCTCCCTTCTCTCCAG
	ACCAGCCAGTCCTCAGATTTTCAGA

2.2.7 cDNA Sentezi

cDNA sentezi Easy Script Plus cDNA sentez kiti ile oligod(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü ve yapılışı Tablo 2.3'de verilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR yapmak üzere -20°C muhafaza edilmiştir

Tablo 2. 3. cDNA sentez karışımı ve prosedürü.

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	2,5µg/ml
Oligo (dT) Primer	1µl	0.5 µM
dNTP Karışımı (herbiri 10mM)	1µl	500µM
RNAaz içermeyen su	14.5µl
Hazırlanan reaksiyon karışımı 65°C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza alınır.		
5X RT Tamponu	4µl	1X
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0.5µl	20U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1µl	200U/rxn
Karışım cDNA sentezi için 50°C'de 50 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak için 85°C'de 5 dakika bekletilir.		

2.2.8 RİPA Tamponu ile Protein İzolasyonu

Radio-immünopresipitasyon deneyi (RIPA) tamponu tüm hücre içeriğinde ki ve membrana bağlı proteinlerin izolasyonu ayrıca NP-40 ya da Triton X-100 ilavesiyle de nükleer proteinlerin izolasyonu için de kullanılmaktadır. RIPA tamponu 150 mM Sodyum klorür ; %1 NP-40 ya da Triton X-100, %0,5 Sodyum deoksikolat, %0,1 SDS ve 50 mM Tris, pH 8.0



kullanılarak hazırlanır ve ışıktan korunur. Ayrıca kullanımdan hemen önce proteaz inhibitör tabletinden ilave edilir. Hücreler RIPA tamponu ile toplandıktan sonra 20 dakika buzda bekletilip +4°C' de 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı yeni bir ependorfa alınarak -20°C'de saklandı.

2.2.9 Bişinşonik Asit ile ProteinTayini

A549, LNCaP ve CaCo2 hücrelerinden izole edilen proteinlerin protein tayini yapıldı. Protein tayini için gerekli olan Bişinşonik Asit solüsyonu (BCA), Micro BCA Reaktif A (0.65 M sodyum karbonatmonohidratve 0.65 M sodyum potasyum tartarat hazırlanıp, pH 11,25'e 10 N sodyum bikarbonat iletitreedilir.), Micro BCA Reaktif B (0.1 M Bişinşonik asit suda çözünerek hazırlanır) ve MicroBCA Reaktif C (0.015 M bakır sülfat) 25:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml seyreltilmiş örnek (10X -25X) veya Standard protein solüsyonu (Sığır serum albümin) ve 0,1ml BCA solüsyonu eklenerek karıştırıldı. 15dak. 60°C'de inkübe edildi ve 590nm'de Eliza okuyucuda ölçüldü.

2.2.10 SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) ve WesternBlot

İzole edilen proteinler Laemmli (1970)'de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edilmiştir. Herbir protein için spesifik antikorlar kullanılarak Western blot tekniği ile herbir enzimin protein düzeyleri immünolojik olarak tayin edilmiştir.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.4'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımından hemen önce hazırlanmıştır.

Tablo 2. 4. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

StokÇözeltiler	Ayrıştırıcı Jel	Sıkıştırıcı Jel(%4)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	1,5
Saf Su(ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu(ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu(ml)	-	2,5
%10 SDS(ml)	0,4	0,16



%10 APS(ml)	0,15	0,065
TEMED(ml)	0,015	0,012

Poliakrilamit jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Hoefer MiniVe elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Elektroforetik ayırıştırma güç kaynağına bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayırıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınıp ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında 45dak.süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavisı R250, %50 metanol ve %12 glisial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyanmış ve hem de sabitlendi. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jel fotoğraflanmış ve %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı. Aynı koşullar altında yürütülen diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan Western blot analizi (Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi) için elektroforezi takiben transfer tampon (25mM Tris, 192mM glisin ve %10 metanol) içerisinde 10dak. Süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Elektroforetik transfer HoeferminiVE elektro transfer sistemi kullanılarak yapıldı. MiniVeBlotter'ın katot (siyah) kısmı alta gelecek şekilde sistem kurulmaya başlanır. En alta sünger konuldu, bunun üzerine önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirildi ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlandı. Whatman#1 üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran da dikkatlice yerleştirilmiştir. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 kondu ve en üste tekrar sünger yerleştirilip sandviç tamamlandı. Sandviç hazırlandıktan sonra sistem kapatıldı. Tankın içine katot kısmı arkaya gelecek şekilde yerleştirildi. Sistem üzerine 300-350 ml transfer tampon kondu. 1-1,2 litre su ile tank dolduruldu.Sistem güç kaynağına bağlanıp 90Volt, 90Miliamper, 90dakika transfer gerçekleştirildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatılmış ve sistemin vidaları açıldı. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'blot', elde edildi. Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel yukarıda tanımlandığı gibi boyandı. Membran, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi. 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik sütünzo) ile çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda membran önce bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikolar ve daha sonra işaretleyici enzim-horseradish peroksidaz (anti-rabbit/anti-mouse/anti-goat IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikolarla inkübe edildi. İşaretleme oda sıcaklığında 1saat yapıldıktan sonra, ALP çözeltisi kullanılarak reaksiyon başlatıldı ve özgül protein bantları nitroselüloz membranda belirlendi. Bantların



yoğunluğu ise Scion Image Analyzer yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.11 Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi

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

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

2.2.12 Tüm Genom Gen Ekspresyon Analizi

Illumina HumanHT-12 V4 Expression BeadChip 'tüm genom gen ekspresyonu analizlerinde kullandığımız ve her bir gene özgü 50 bazlık problemler içeren beadçiplerdir. Kullanılan beadçipler üzerinde kodlanmış ve üzerine purifiye edilmiş c RNA'ların hibridize olabileceği şekilde tasarlanmış beadler bulunmaktadır. Total mRNA örneklerinden purifiye edilmiş c RNA örnekleri, beadçip yüzeyindeki beadlere direk olarak hibridize edilir. Bir beadçip üzerinde 12



örnek çalışmak için ayrı kanallar yer almaktadır. Her bir kanal tüm genom boyu dağılmış yaklaşık 48.000 farklı beadtipi içerir.

Bu çalışmalarda firmaya kuru buz içerisinde uygulama yapılan ve kontrol hücrelerden elde edilmiş RNA'lar gönderilmiş. Firma gönderilen bu RNA'ların kalite kontrollerini ND-1000 NanoDrop Spektrofotometre ve Agilent 2100 Bioanalyzer ile kontrol ve teyit etmiştir. RNA etiketleme ve melezleme Agilent Tek Renk mikrodizi tabanlı gen ekspresyon analizi protokolü (Agilent Technology, V6.5, 2010) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, her numune toplam RNA'nın 50ng doğrusal olarak çoğaltılmış ve Cy3-dCTP ile işaretlenmiştir. Etiketli cRNAs RNAeasy Mini Kit (Qiagen) ile saflaştırılmıştır. Etiketli cRNAs (pmol Cy3/ μ g cRNA) konsantrasyonu ve spesifik aktivitesi N ND-1000 NanoDrop Spektrofotometre ile ölçülmüştür. Tüm genom gen ekspresyonu uygulama beadçipleri için gerekli olan total c RNA miktarı 750 ng'dir. Bir beadçip yüzeyinde aynı anda 12 örnek çalışılmaktadır. +4 °C' de saklanan mikrodizin beadçipleri uygulama yapmadan 10 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir. 5 μ l c RNA örneği içerisine 10 μ l Hibridizasyon Buffer eklenir ve 15 μ l hacimli örnek tek kanallı pipet yardımı ile çip yüzeyindeki örnek yükleme kanallarına yüklendi. Tüm örnek kanalları yüklenen Beadçip hibridizasyon çemberi içerisine alınır ve hibridizasyon fırını içerisinde 58 °C' de gece boyu hibridizasyona bırakıldı. (14-20 saat). Hibridizasyon işlemi takiben, bağlanmayan ürünlerin uzaklaştırılması ve streptavidin işaretlemesi öncesi çip yüzeyinin temizlenmesi için 2 farklı sıcaklıkta yıkama serisi uygulanır. Her iki yıkamada da kullanılan yıkama solüsyonları beadçipler ile birlikte gelen 2 farklı yıkama solüsyonları ile gerçekleştirildi. Yıkama işlemi takiben beadçip Streptavidin ile işaretlendi ve Beadçipin okuma öncesinde +4 °C' de ve 1400 rpm de santrifüj işlemi ile karanlık ortamda kurutuldu. Kurutulmuş beadçipler İScan ile okunmuş ve ham veriler elde edilmiştir. Ham mikrodizi verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arkaplan gürültüsü uzaklaştırılmış ve tüm örneklerin verisi yüzdelik (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra normalize edilen verilere analiz basamaklarında kullanılmak üzere Log transformasyonu uygulanmıştır. Tüm bunlara ek olarak normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik kümeleme analizleri 'Correlation-average' yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob ışımalarının ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu elde edilmiştir. Ön analizin tamamlanmasından sonra elde edilen veriler kullanılarak oluşturulan örnekler gruplandırılarak diferansiyel ekspresyon analizi yapılmıştır. Farklı gen anlatımı gösteren problemlerin belirlenmesinde Rank Product metodu kullanılmıştır. Analizler yapılırken ana gruplar kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Her grup içerisinde ise üç test örneği kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır.



Çalışmada örnek bazında sadece teknik replikalar altgrupları oluşturduğundan dolayı; problemlerin ekspresyon ölçümlerindeki 'kat değişim' (Fold Change) miktarları göz önünde bulundurulmuştur. Her ikili karşılaştırmada anlamlı değişim tespit edilen problemler ve ekspresyon seviyeleri kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme genlerin ve örneklerin ekspresyon paternlerine göre gruplandırılması yapılmıştır. Kümeleme sonucu ile ekspresyon skalaları kullanılarak her gruba ait 'heatmap' ler oluşturulmuştur. Önemli prob listesi için Gen- zenginleştirilmesi ve Fonksiyonel ek açıklama analizi DAVID kullanarak (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) gerçekleştirildi.

2.2.13 İstatiksel Analizler

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

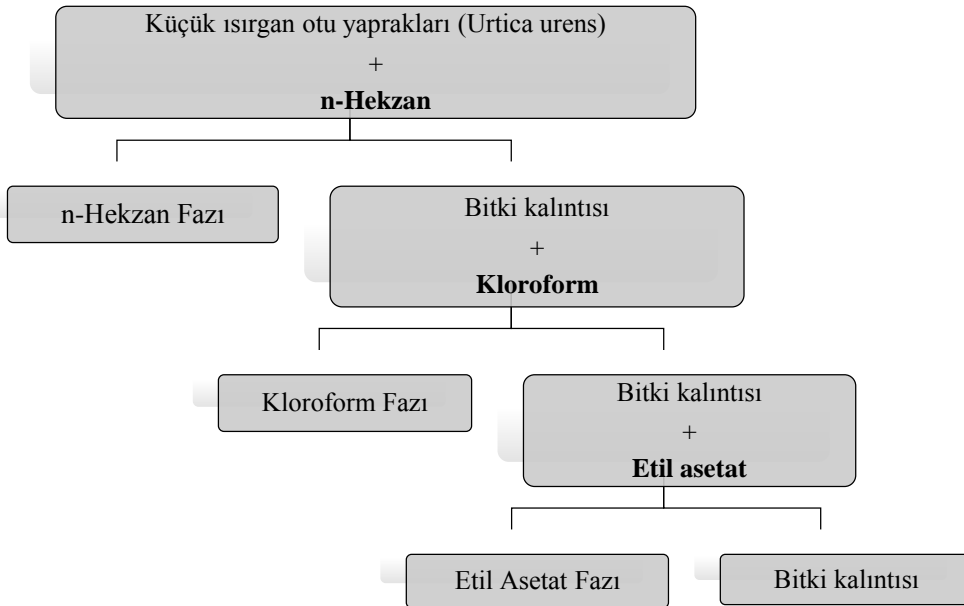
3. SONUÇLAR

3.1 Özütlerin Hazırlanması ve Fraksiyonlamalar

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)'nun yaprakları ve tohumları ayrı ayrı toplanıp uygun şekilde kurutma işlemleri yapıldı. Çalışmalara önce yapraklardan başlanıp tohumlar daha sonra başlanmak üzere saklandı.

3.1.1 *Urtica urens* Yapraklarından Özüt Eldesi

Gölgede kurutulan ve toz haline getirilen yapraklarda ekstraksiyon çalışmalarına başlamadan önce nem tayini yapıldı ve özüt verimleri nem miktarı dikkate alınarak kuru baz üzerinden yapıldı. Küçük ısırgan otunda, projede hedeflendiği şekliyle oda koşullarında sırasıyla hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ile ekstraksiyonları yapılarak ana özütler elde edildi (Şekil 3.1). Bunun için yaklaşık 200 gram kurutulmuş ısırgan otu yaprakları toz haline getirilerek sokslet aparatına yüklendi ve çözücüler sırasıyla 10-15 sifon olacak şekilde toz haline getirilmiş yapraklardan geçirilerek özütler elde edildi. Daha sonra döner buharlaştırıcı kullanılarak çözücüler özütlerden uzaklaştırıldı ve uygun koşullarda (-80°C) saklandı.



Şekil 3. 1. Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*) bitkisinin yapraklarında artan polaritelerdeki çözücüler ile yapılan ekstraksiyon işlemleri.

Şekil 3.1'de de gösterildiği üzere küçük ısırgan otu (*Urtica urens*) bitkisinin artan polariteye göre elde edilen özütlerin verimleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Özüt miktarlarını arttırmak için 4 defa sokslet ekstraksiyonu yapılmıştır.

Tablo 3. 1. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen özütlerin verimleri.

Özüt Türü	Verim (%)
Hekzan	1.60
Kloroform	1.22
Etil asetat	1.38
Metanol	8.01

Bir sonraki basamakta ise ana özütlerin alt fraksiyonları elde edilmiştir. İlk olarak hekzan özütünün 2 gramı 3.5 g silika jel ile karıştırılarak kuru tatbik yolu ile kolona yüklenmiş ve hekzan:etil asetat mobil faz sistemi ile Tablo 3.2'de belirtildiği gibi yürütülmüştür. Hekzan özütünü ayırıp daha sağlıklı GC-MS analizi yaptırabilmek için yapılan bu kolon çalışmasında 42 adet fraksiyon elde edilmiştir. İnce tabaka çalışmaları sonucu benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucu 4 adet alt fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlama sırasında elde edilen görüntüler Şekil 3.2'de belirtilmektedir.

Tablo 3. 2. Silika kolonunda hekzan özütünü fraksiyonlamak için kullanılan Hekzan:etil asetat mobil faz sistemi.

Hekzan (ml)	Etil asetat (ml)	Toplam (ml)
200	-	200
180	10	200
320	80	400
280	120	400
100	100	200
60	140	200
-	300	300



Şekil 3. 2. Hekzan özütünün fraksiyonlanması.

Benzer şekilde kloroform özütünün 12 gramlık bölümü 20 gr silika jel ile karıştırılarak kuru tatbik yolu ile kolona yüklenmiş ve hekzan:etil asetat:metanol mobil faz sistemi ile Tablo 3.3'de belirtildiği gibi yürütülmüştür. Kromatografi sonunda 42 alt fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonların İnce tabaka kromatografi çalışmaları sonucunda benzer fraksiyonların birleştirilmiştir ve 7 adet kloroform alt fraksiyonu elde edilmiştir. Fraksiyonlama sırasında elde edilen görüntüler Şekil 3.3'de belirtilmektedir.

Tablo 3. 3. Silika kolonunda kloroform özütünü fraksiyonlamak için kullanılan Hekzan:etil asetat:metanol mobil faz sistemi.

Hekzan (ml)	Etil asetat	Metanol	Toplam
200	-	-	100
180	20	-	200
160	40	-	300
140	60	-	400
120	80	-	200
100	100	-	200
80	120	-	200
60	140	-	400
40	160	-	200
-	95	5	200
-	90	10	100
-	80	20	100
-	50	50	300
-	-	100	100



Şekil 3. 3. Kloroform özütünün fraksiyonlanması.

Son olarak etilasetat özütünün 12 gramlık bölümü 20 gr silika jel ile karıştırılarak kuru tatbik yolu ile kolona yüklenmiş ve hekzan:etil asetat:metanol mobil faz sistemi ile Tablo 3.4'de belirtildiği gibi yürütülmüştür. Bu işlemler sonucunda kolon çalışmasında 32 adet fraksiyon elde edilmiştir. İnce tabaka çalışmaları sonucu benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucu 5

adet alt fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlama sırasında elde edilen görüntüler Şekil 3.4'de belirtilmektedir.

Tablo 3. 4. Silika kolonunda etilasetat özütünü fraksiyonlamak için kullanılan Hekzan:etil asetat:metanol mobil faz sistemi.

Hekzan (ml)	Etil asetat (ml)	Metanol (ml)	Toplam
100	-	-	100
80	20	-	100
70	30	-	100
60	40	-	100
50	50	-	300
40	60	-	100
30	70	-	100
20	80	-	200
-	100	-	100
-	85	15	100
-	70	30	100
-	50	50	100
-	20	80	100
-	-	100	200



Şekil 3. 4. Etilasetat özütünün fraksiyonlanması.

3.1.1.1 *Urtica urens* Yapraklarından Elde Edilen Hekzan Özütü ve Fraksiyonlarının GC-MS Analizi

Küçük ısırgan otundan elde edilen hekzan özütü silikajel kolon kullanılarak; kuru tatbik yoluyla hekzan/etilasetat (70:30, v:v) çözücü sisteminde fraksiyonlanmıştır. Elde edilen alt fraksiyonlar ve ana hekzan özütünün CS-MS analizleri ile aktivite çalışmaları yapılmıştır. GS-MS analizleri Agilent Agilent 7890A GC'ye bağlı 5975C inert Mass Selektif Dedektörden



oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Hekzan özütü ve alt fraksiyonları (yaklaşık 0,1g) 5mL hekzanda çözülmüştür. Bu çözültiden 1mL alınıp üzerine 4mL hekzan ve 5 mL 1 M KOH (MeOH'de çözünmüş) çözeltisi ilave edilerek şiddetli şekilde 30 sn vortekslenmiştir (esterleştirme işlemi). Oluşan üst fazdan (hekzan) 1 ml alındı ve 0,45 µm'lik filtreden şırınga yardımıyla süzülerek GC-MS'e verildi. GC-MS şartları aşağıdaki Tablo 3.5'te verilmektedir.

Tablo 3. 5. GC-MS şartları:

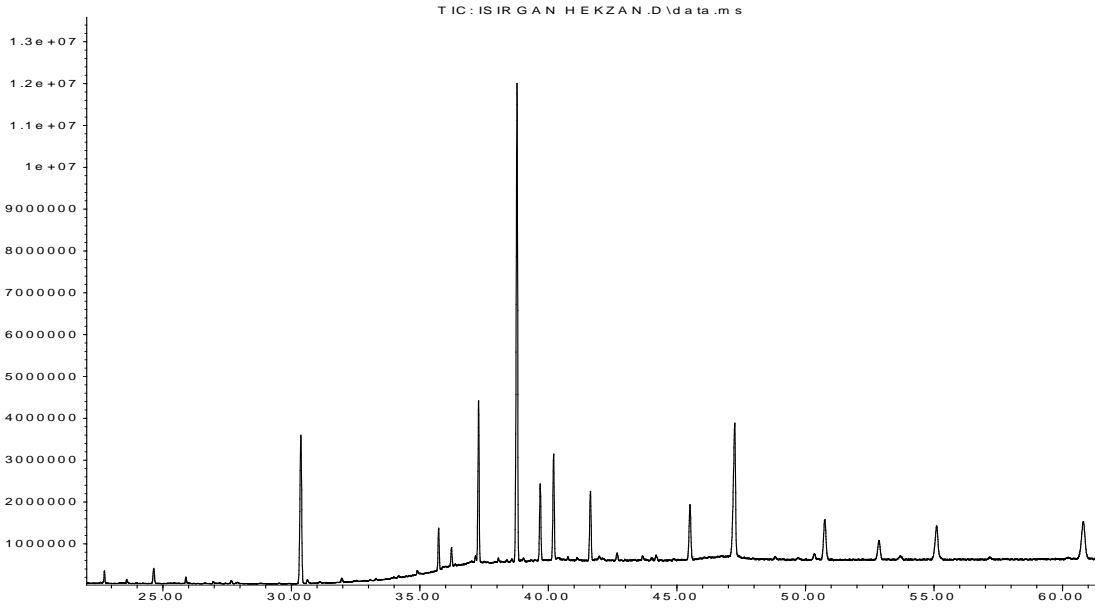
	Rate (°C/min)	Value (°C)	Hold time (min)	Run time (min)
(Initial)		120	8	8
Ramp 1	8	150	2	13.75
Ramp 2	8	200	10	30
Ramp 3	8	250	35	71.25

Esterleştirilen hekzan özütü ve fraksiyonları DB-WAXETR MS kapillar kolondan geçirilmiştir (60m x 320µm x 0.25µm). Taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanılmıştır. Akış hızı olarak 1 ml/dakika belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 120°C olup, 20 dakikada 250°C'ye ulaşması sağlanmış ve bu değerinde sabit tutulmuştur. Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektrallerine göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada dbwax, Wiley7, Nist05, Nist02 kütüphaneleri kullanılarak çıkan spektrumların otomatik taranması ile analizler gerçekleştirilmiştir. Hekzan özütü ve fraksiyonlarında GC-MS sonucunda saptanan maddelere ait sonuçlar aşağıdaki tablolarda verilmektedir (Tablo 3.6-3.10). Ayrıca GC kromatogramlarında şekillerde verilmektedir (Şekil 3.5-3.9). Buna göre, hekzan özütünden majör bileşen olarak yüzde 93,01 oranında 13 adet bileşik tespit edilmiştir. A fraksiyonundan yüzde 97,50 oranında 8 adet bileşik elde edilmiş, B fraksiyonundan yüzde 98,69 oranında 11 adet bileşik, C fraksiyonundan yüzde 89,69 oranında da 8 bileşik ve D fraksiyonundan yüzde 96,81 oranında 12 adet bileşik elde edilmiştir. Tablo ve şekillerden de görüldüğü üzere ham hekzan özütü ile teşhisleri kolaylaştırmak için yapılan fraksiyonlar birbiri ile uyum içindedir. Yani fraksiyonlardaki bileşenler hekzan özütüyle uyumludur. Ayrıca fraksiyonlarda teşhis edilen bileşikler genellikle yağ asidi ve basit alken ağırlıklıdır.

Tablo 3. 6. Hekzan Ana Özütünün GC-MS ile İçerik Analizi.

Sıra	Alıkonma süresi	Birleşik adı	Alan	% Eşleşme
1	24.646	C 14:0	0.90	98
2	30.374	C 16:0	10.61	99
3	35.730	C 18:0	2.08	99

4	37.286	C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	8.34	99
5	38.780	C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15)(omega 3)	28.11	99
6	39.684	Phytol	4.33	92
7	40.204	C 20:0	5.91	99
8	41.635	Heptacosane	4.39	99
9	45.509	C 22:0	4.23	99
10	47.248	Nonacosane	13.17	95
11	50.756	1-Hexadecanol, 2-methyl	4.35	90
12	52.867	C 24:0	2.13	91
13	55.104	Hentriacontane	4.46	96



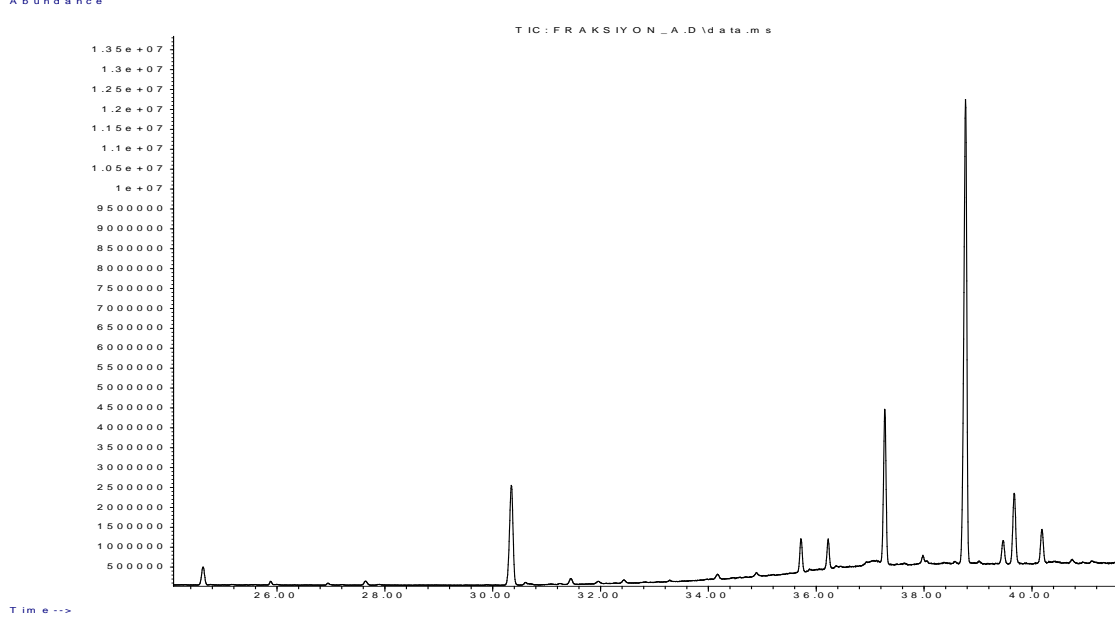
Şekil 3. 5. Hekzan Ana Özütünün GC kromotogramı.

Tablo 3. 7. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon A'nın GC-MS ile İçerik Analizi.

Sıra	Alınma süresi	Birleşik adı	Alan	% Eşleşme
1	24.632	Tetradecanoic acid metil ester	1.99	98
2	30.349	Hexadecanoic acid metil ester	13.162	99
3	35.519	Octadecanoic acid metil ester	3.102	99
4	36.224	9-Octadecenoic acid metil ester	2.709	92
5	37.274	9,12-Octadecadienoic acid metil ester	14.590	99
6	38.774	9,12,15-Octadecatrienoic acid metil ester	50.698	97
7	39.674	Phytol	7.658	97



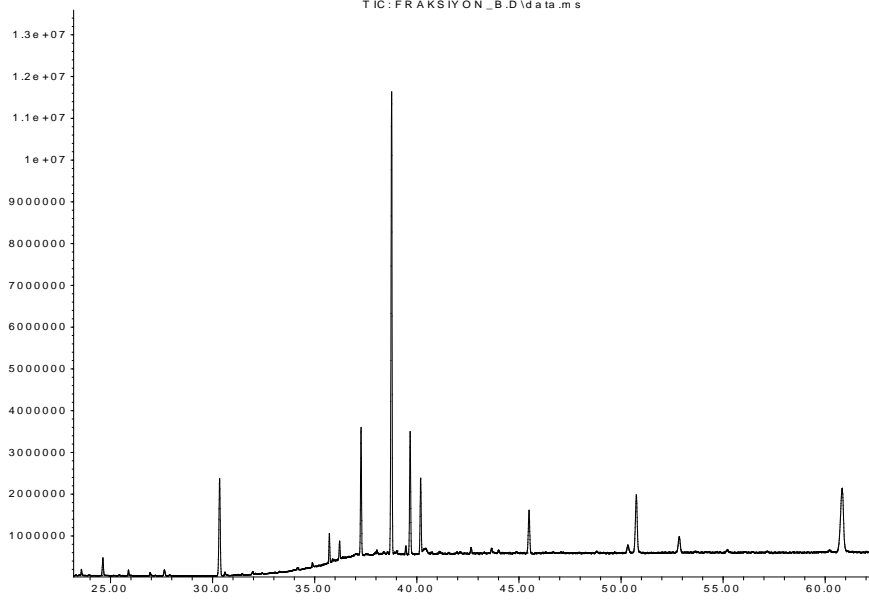
8	40.188	Eicosanoic acid, methyl ester	3.591	98
---	--------	-------------------------------	-------	----



Şekil 3. 6. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon A'nın GC kromotogramı.

Tablo 3. 8. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon B'nin GC-MS ile İçerik Analizi.

Sıra	Alıkonma süresi	Birleşik adı	Alan	% Eşleşme
1	24.607	C 14:0	1.236	98
2	30.345	C 16:0	8.80	98
3	35.718	C 18:0	1.88	84
4	37.269	C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	9.43	99
5	38.768	C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15)	34.87	99
6	39.678	Phytol	9.36	91
7	40.193	C 20:0	5.38	99
8	45.497	C 22:0	4.34	99
9	50.755	1-Hexadecanol, 2-methyl	7.72	90
10	52.861	C 24:0	2.49	92
11	60.838	Cyclotetracosane	13.19	99



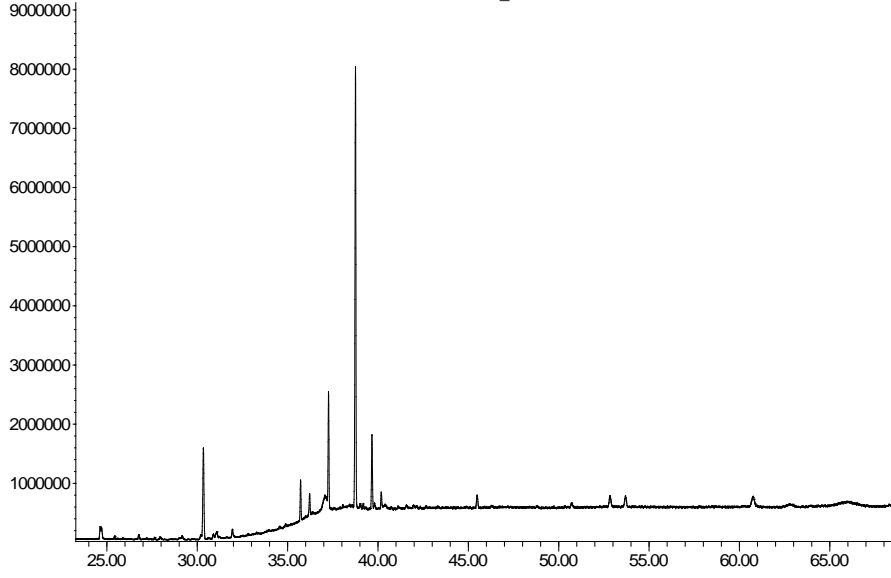
Şekil 3. 7. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon B'nin GC kromatogramı.

Tablo 3. 9. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon C'nin GC-MS ile İçerik Analizi.

Sıra	Alınma süresi	Birleşik adı	Alan	% Eşleşme
1	24.629	C 14:0	1.48	96
2	24.703	Perilla alcohol	1.44	91
3	30.339	C 16:0	12.40	98
4	35.718	C 18:0	4.22	98
5	37.057	Propiolic acid	1.39	91
6	37.269	C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	12.02	99
7	38.756	C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15)(omega 3)	48.77	99
8	39.666	Phytol	7.97	97



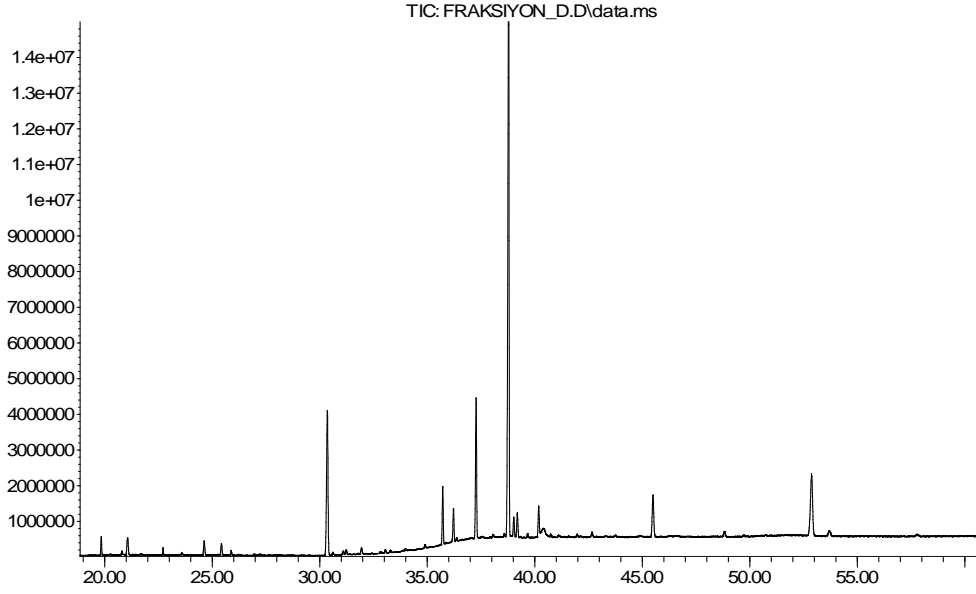
TIC: FRAKSIYON_C.D\data.ms



Şekil 3. 8. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon C'nin GC kromotogramı.

Tablo 3. 10. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon D'nin GC-MS ile İçerik Analizi.

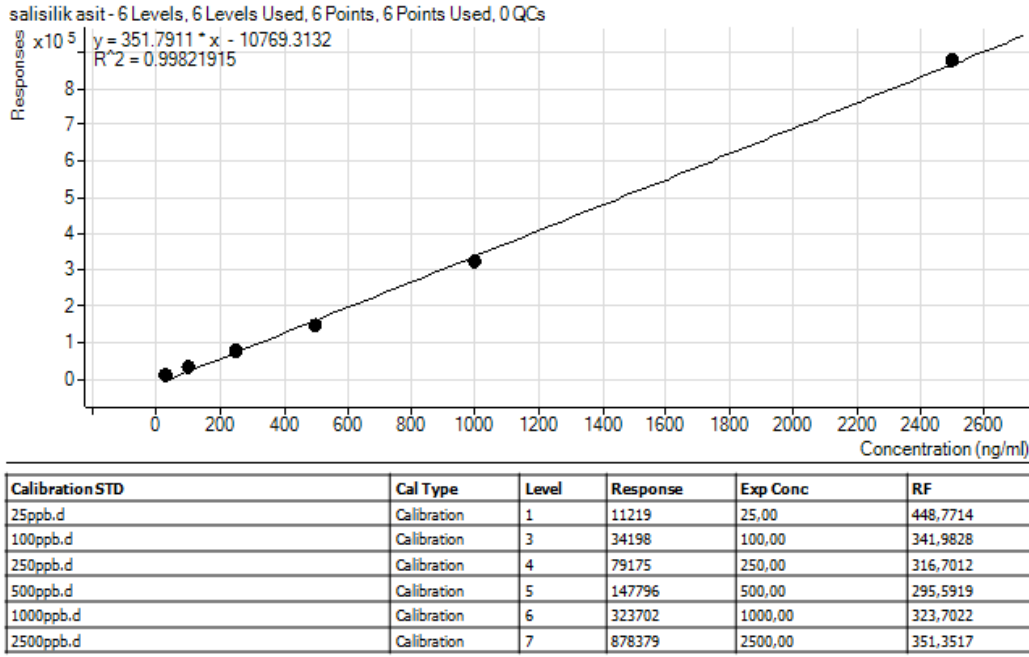
Sıra	Alınma süresi	Birleşik adı	Alan	% Eşleşme
1	21.070	1-Octadecene	1.57	95
2	24.629	C 14:0	1.12	98
3	25.430	1-Nonadecene	0.83	93
4	30.357	C 16:0	13.38	98
5	35.724	C 18:0	3.77	99
6	36.222	C 18:1(cis - 9) (omega 9)	2.23	93
7	37.275	C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	9.43	99
8	38.785	C 18:3 (alpha) (all cis - 9,12,15)(omega 3)	47.61	99
9	39.191	3-propionic acid metil ester	1.81	98
10	40.187	C 20:0	2.38	97
11	45.503	C 22:0	4.08	99
12	52.873	C 24:0	8.60	99



Şekil 3. 9. Hekzan Ana Özütünden Elde Edilen Fraksiyon D'nin GC kromatogramı.

3.1.1.2 *Urtica urens* Yapraklarından Elde Edilen Kloroform ve Etil Asetat Özütleri ile Fraksiyonlarının LC-MS Analizi

Yapılan özüt eldesi çalışmalarında ince tabaka kromatografi (ITK) sonuçları benzer alt fraksiyonların birleştirilmesi ile kloroform ana özütünden 7 farklı alt fraksiyon elde edilirken; etil asetat özütünden 5 farklı alt fraksiyon elde edilmiştir. Devamında ise bu alt fraksiyonların ve ana kloroform ve etil asetat özütlerinin LC-MS analiz çalışmaları yapılmıştır. Ana özütler ve alt fraksiyonları 1000 ppm derişiminde hazırlanıp, bu örneklerden 100 µL alınarak 1000 µL'ye seyreltilir ve 0,45 µm'lik filtreden şırınga yardımıyla vialer süzülerek LC-MS'e verilmiştir. Tüm fraksiyonlar ZORBAX SB-C18 (4,6x100mm, 3.5µm) kolonundan geçirilmiştir ve akış hızı olarak 0.6µL/dakika belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı ise 35°C'de tutulmuştur. Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sırasında salisilik asit, kersetin, kaftarik asit, gentisik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, 4-hidroksibenzaldehid, şikorik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glukozit, rosmarinik asit, protokateşuik asit ethyl ester, sinamik asit, naringenin, kamperol, gallik asit, klorojenik asit, kateşol, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, rutin, hesperidin gibi fenolik maddeler standard olarak kullanılmış ve bu maddelerin değişik konsantrasyonlarının kolonda yürütülmesiyle elde edilen sonuçlar standard eğri çizimi için kullanılmıştır (Şekil 3.10). Bu standart eğri grafiği ana özütler ve alt fraksiyonlar içinde bulunan aynı fenolik madde miktarlarının tayini için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.11-3.12'de verilmiştir.



Şekil 3. 10. Salisilik asit için elde edilen Standard eğri grafiği.

Tablo 3. 11. Etil Asetat (EA) Ana Özütü ve fraksiyonlarının LC-MS ile İçerik Analizi (Konsantrasyon birimi:ppb).

FENOLİK STANDART	Etil Asetat (EA)	EA-A	EA-B	EA-C	EA-D	EA-E
4-hidroksibenzaldehit	8.36	3.74	10.51	11.03	2.48	6.44
4-hidroksibenzoik asit	20.55	11.39	26.17	67.72	18.87	24.72
salisilik asit	42.62	31.37	31.86	31.30	33.02	72.01
kafeik asit	45.85	20.84		20.18	21.58	65.92
klorojenik asit	99.59	39.55		15.89		42.33
p-kumarik asit	45.69			40.29	trace	6.39
gallik asit	39.99	38.81	40.23	38.53	38.39	41.92
gentisik asit	15.77				10.28	
ferulik asit	20.09			62.89	16.16	32.35
naringenin	trace			trace		trace
kamferol	trace				trace	
rosmarinik asit	15.23	10.41				10.82
hesperidin	trace					



kuarsetin			trace			trace
protokateşuik asit	32.15					49.96
protokateşuik asit etil ester	trace	trace	trace		trace	trace

Tablo 3. 12. Kloroform (KL) Ana Özütü ve fraksiyonlarının LC-MS ile İçerik Analizi (Konsantrasyon birimi:ppb).

FENOLİK STANDART	Kloroform (KL)	KL-1	KL-2	KL-3	KL-4	KL-5	KL-6	KL-7
4-hidroksi benzaldehit	7.07	1.61	2.54	7.27	21.64	5.47		6.14
4-hidroksibenzoik asit	11.76	11.64	12.47	11.63	14.06	10.79	11.51	13.19
salisilik asit	33.59	31.71	31.82	33.44	33.47	32.06	31.96	32.50
kafeik asit	20.11	20.65				20.67	20.11	
klorojenik asit	trace							
p-kumarik asit	trace					trace	trace	
gallik asit	48.12	44.11	41.80	48.87	41.91	36.57	42.46	42.27
gentisik asit								
ferulik asit								
naringenin	trace				trace			
kamferol								
rosmarinik asit								
hesperidin								
kuarsetin								
protokateşuik asit								
protokateşuik asit etil ester	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	

3.1.1.2.1 Alt Fraksiyonlarının İleri Derece Fraksiyonlanması ve Saf Madde İzolasyonları

Apolar karaktere sahip hekzan fraksiyonlarının silica ve sephadex kolonları ile ileri fraksiyonlaştırma işlemleri sonucunda saf olarak aşağıda şekli verilen Hekzadekanoik asit, metil ester 5 mg olacak şekilde izole edilmiştir (Şekil 3.11). Elde edilen bu sonuç GC-MS analizi ile de teyit edilmiştir.



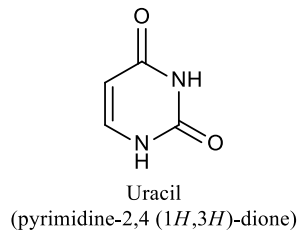
Şekil 3. 11. Hekzadekanoik asit, metil ester.

Vakum kromatografisinden elde edilen hedef ekstredeki bileşenlerin ayrılması için kolon kromatografisi işlemi uygulanmıştır. Bu çalışmadaki kolon kromatografi uygulamaları 150 cm uzunluğunda 5 cm çapında vakum destekli cam kolonlarda yapılmıştır (Şekil 3.12).

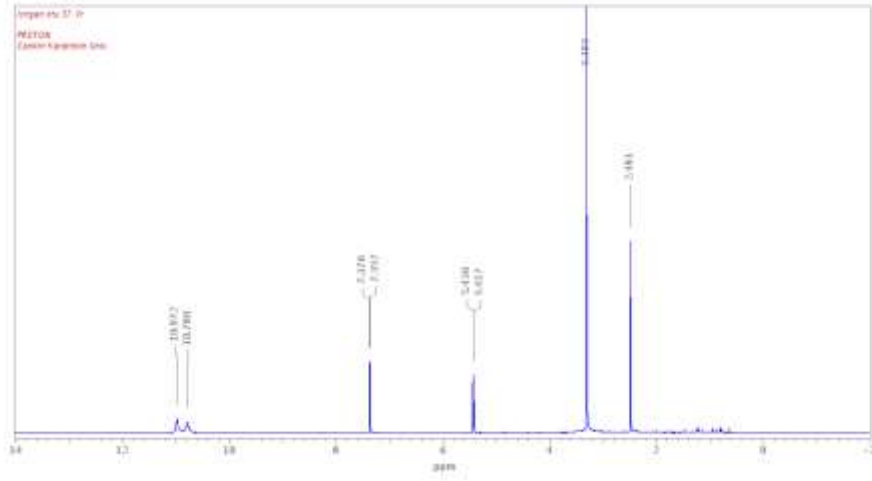


Şekil 3. 12. Bitki ekstresinin kolona tatbik edilmesi.

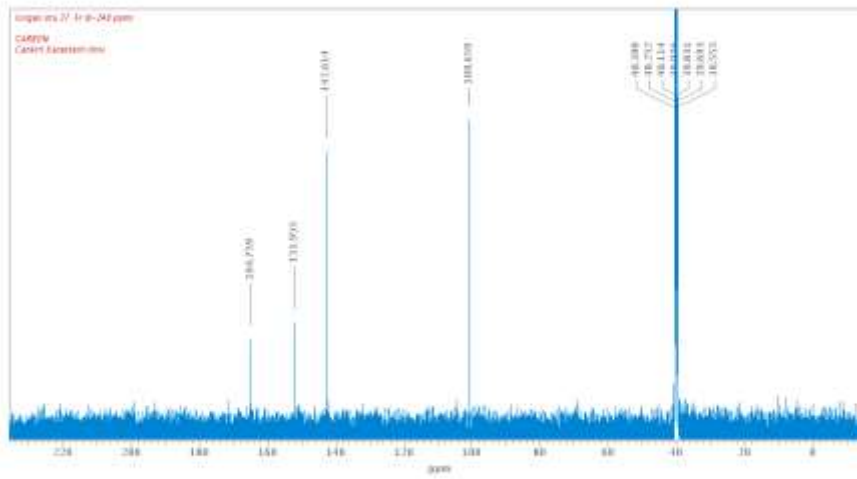
Ayrıca çalışmaların devamında kloroform fraksiyonlarının kolon kromatografisinde izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler için 4 gram ekstrakt 1:1 oranında silika jele emdirilip sürekli karıştırılarak kurutulmuştur. Hekzan ile bulamaç haline gelen silika jel 150 cm uzunluğundaki kolona dolduruldu. Metanol kloroformda çözücüsünde çözülen ekstrakt kolona tatbik edildi. Kloroform fraksiyonlarının kolon kromatografisi ile ileri derece fraksiyonlanması sonucunda çökelek şeklinde kristallenmeler olduğu görüldü. Kristaller aseton yıkandıktan sonra çeker ocakta çözücüsü uçması beklendi ve 5 mg kristal elde edilmiştir. Beyaz toz halindeki kristaller dötero DMSO-d₆ ile çözülerek 600 MHz Agilent marka NMR cihazında analizi yapılmıştır. NMR sonuçları incelendiğinde ise bileşiğin urasil olduğu literatür araştırmaları ile teyit edilmiştir (Şekil 3.13-3.20).



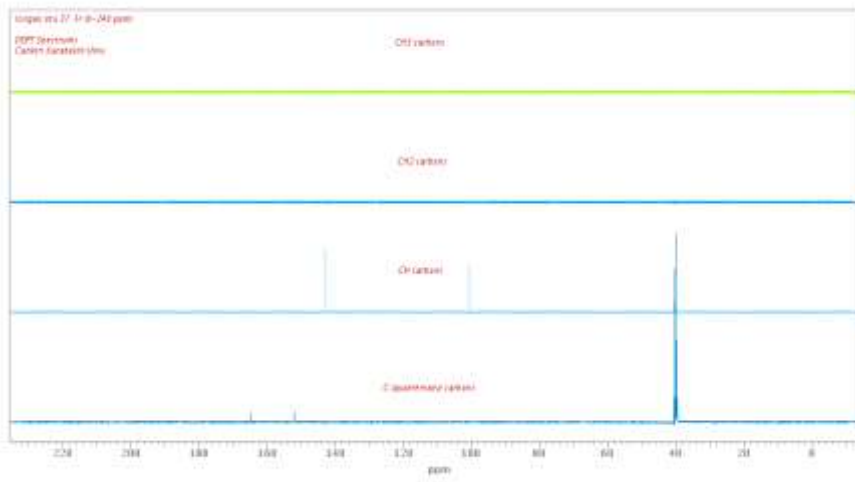
Şekil 3. 13. Urasil molekülü.



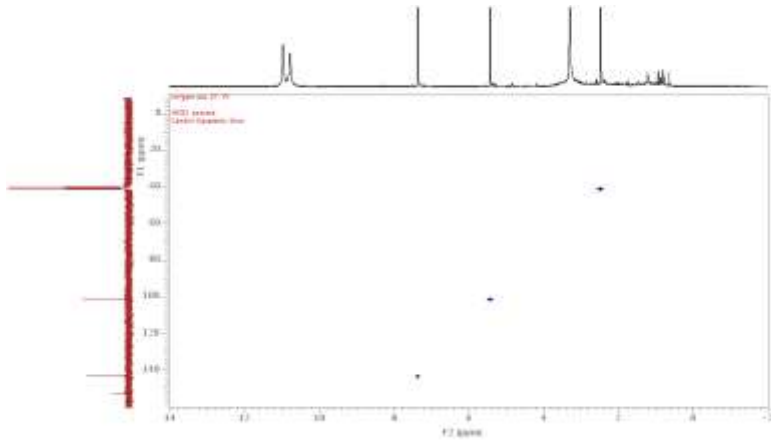
Şekil 3. 14. Fr-37 ¹H NMR spektrumu.



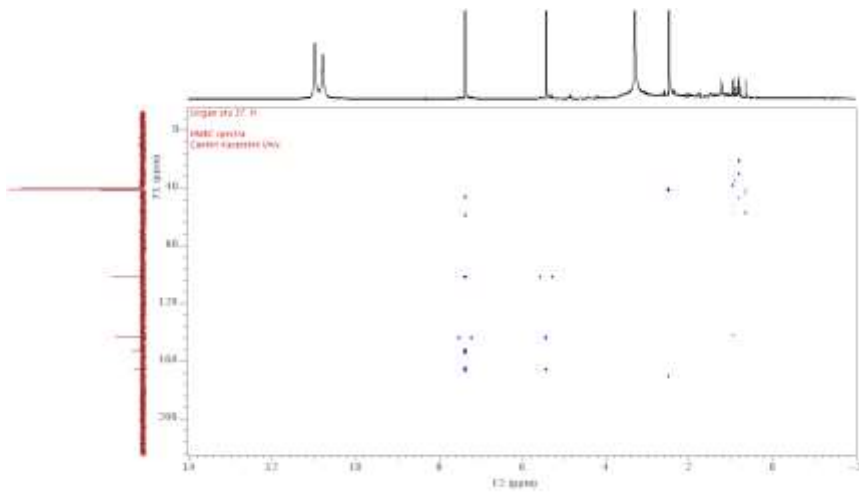
Şekil 3. 15. Fr-37 ¹³C NMR spektrumu.



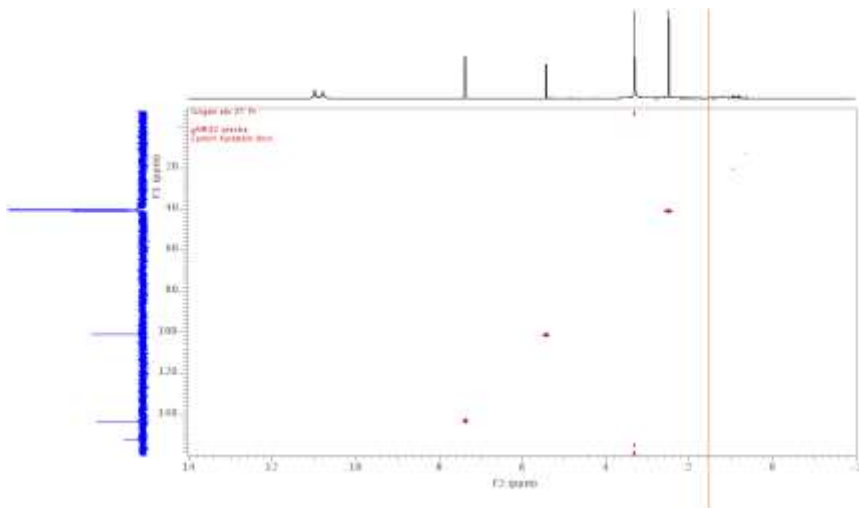
Şekil 3. 16. Fr-37 DEPT spektrumları.



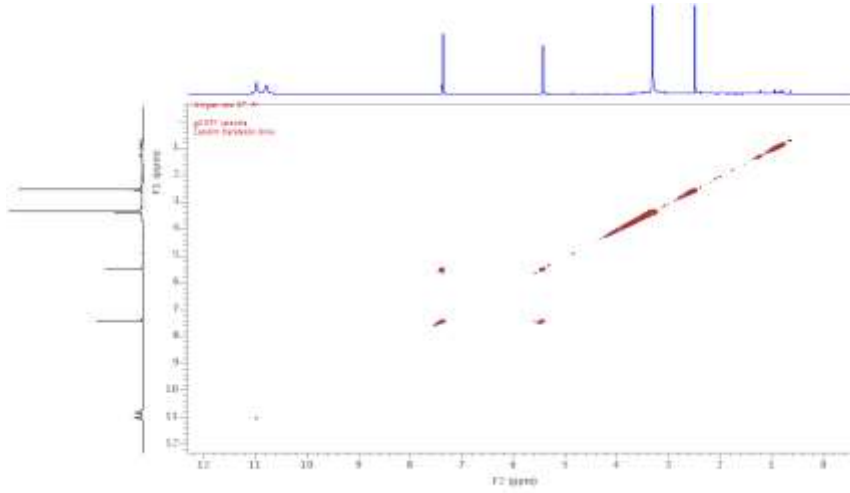
Şekil 3. 17. Fr-37 HSQC spektrumu.



Şekil 3. 18. Fr-37 HMBC spektrumu.

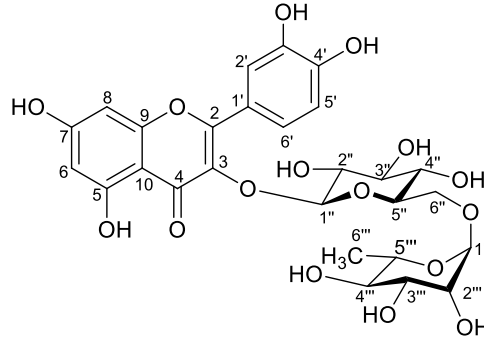


Şekil 3. 19. Fr-37 HMQC spektrumu.



Şekil 3. 20. Fr-37 COSY spektrumu.

Çalışmaların devamında ise iki adet daha saf madde izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu maddeler dötero DMSO-d₆ ile çözülerek 600 MHz Agilent markalı NMR cihazında analiz edilmiştir (Tablo 3.13-3.14). NMR sonuçları incelendiğinde bu bileşiklerin rutin ve 4-hidroksibenzoik asit olduğu literatür araştırmaları ile teyit edildi (Şekil 3.21-3.22).

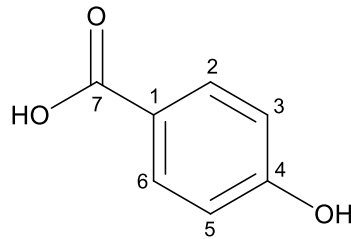


Şekil 3. 21. Rutin bileşiğinin yapısı.

Tablo 3. 13. Rutin'in ¹H ve ¹³C NMR verileri

Pozisyon	NMR d6-DMSO verileri		NMR Lüteratür verileri	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	-	156.85	-	158.51
3	-	133.73	-	135.68
4	-	177.79	-	179.40
5	12.58 (s, -OH)	161.64	12.60 (s, -OH)	162.58
6		99.10	6.19 (1H, d, J=1.7 Hz)	99.96
7	10.80 (brs, -OH)	164.51	10.86 (brs, -OH)	166.07

8	6.37 (1H, d)	94.02	6.40 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	94.82
9	-	157.03	-	159.37
10	-	104.39	-	105.69
1'	-	121.61	-	123.14
2'	7.51 (1H, d, $J = 2.08$ Hz)	116.70	7.52 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	117.61
3'	9.64 (brs, -OH)	145.18	9.67 (brs, -OH)	145.85
4'	9.16 (brs, -OH)	148.84	9.18 (brs, -OH)	149.79
5'	6.83 (1H, d, $J = 10$ Hz)	115.65	6.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	116.12
6'	7.53 (1H, dd, $J = 10$ Hz, 2.08 Hz)	122.01	7.54 (1H, dd, $J = 2.3$ Hz, 2.3 Hz)	123.57
1''	5.06 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	101.61	5.09 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	104.74
2''	3.24	74.51	3.22 (1H, ddd)	75.70
3''	3.18	76.34	3.20 (1H, ddd)	77.21
4''	3.01	70.43	3.05 (1H, ddd)	71.46
5''	3.33	76.88	3.24 (1H, td)	78.17
6''	3.70 (2H, d, $J = 10$ Hz)	67.43	3.79 (2H, d, $J = 9.7$ Hz)	68.69
1'''	4.37 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	101.17	4.50 (1H, d, $J = 1.1$ Hz)	102.4
2'''	3.29	70.81	3.38	72.00
3'''	3.22	70.99	3.27	72.23
4'''	3.20	72.28	3.06	73.95
5'''	3.24	68.68	3.26	69.76
6'''	0.98 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH ₃)	18.17	1.10 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH ₃)	17.97



Şekil 3. 22. 4-Hidroksi Benzoik Asit.

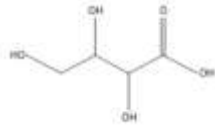
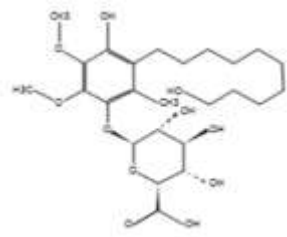
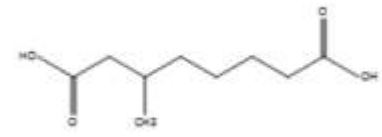
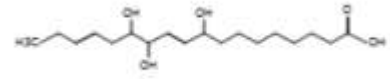
Tablo 3. 14. 4-Hidroksi benzoik asit'in ¹H ve ¹³C NMR verileri.

Pozisyon	NMR d6-DMSO verileri		NMR Literatür verileri	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	122.54	-	121.30

2	7.87 (1H, dt, $J=2.09$ Hz, 8.7 Hz)	131.89	7.89 (1H, dt, $J= 2.4$ Hz, 9 Hz)	131.68
3	6.81 (1H, dt, $J= 2.11$ Hz, 8.9 Hz)	115.92	6.84 (1H, dt, $J= 2.4$ Hz, 9 Hz)	114.74
4	-	162.19	-	161.95
5	7.87 (1H, dt, $J=2.09$ Hz, 8.7 Hz)	115.92	7.89 (1H, dt, $J= 2.4$ Hz, 9 Hz)	114.74
6	6.81 (1H, dt, $J= 2.11$ Hz, 8.9 Hz)	131.89	6.84 (1H, dt, $J= 2.4$ Hz, 9 Hz)	131.68
7	12.49	169.27	12.61	168.81
-OH	10.20	-	10.07	-

Çalışmaya ışık tutması açısından yapılan LC-MS kütüphane araştırmaları sonucunda kloroform ve etil asetat ana fraksiyonları ile alt fraksiyonlarının içerik analizi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.15-3.20'de verilmektedir.

Tablo 3. 15. Etil asetat özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

Adı	Formül	Moleküler Ağırlığı	Şekli
DL-erythronic acid	$C_4 H_8 O_5$	136.0368	
Idebenone Metabolite (beta-DGlucopyranosiduronic acid, 4-hydroxy-3-(10-hydroxydecyl)-5,6-dimethoxy-	$C_{25} H_{40} O_{11}$	516.2548	
3-Methylsuberic acid	$C_9 H_{16} O_4$	188.1037	
9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_5$	328.2235	

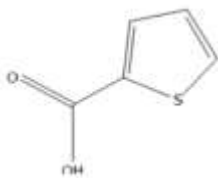
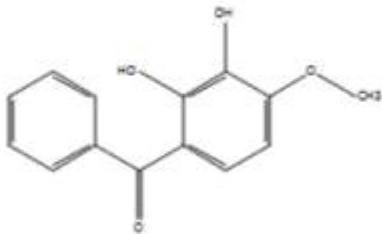
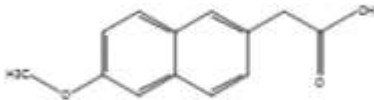
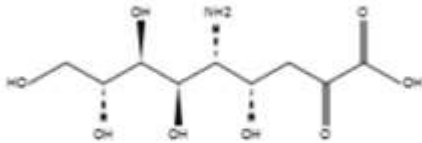
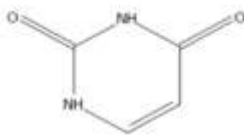
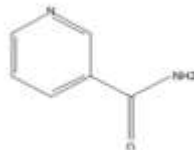
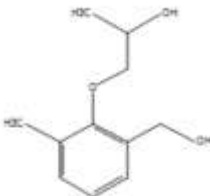
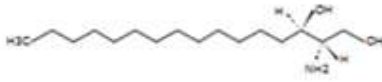


UBBOTAN

3E-undecenoic acid	$C_{11} H_{20} O_2$	184.1453	
Phorbol myristate acetate	$C_{36} H_{56} O_8$	616.3943	
16-hydroperoxy-9Z,12,14Eoctadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_4$	310.2126	
3,6-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.208	
12-oxo-9-octadecynoic acid	$C_{18} H_{30} O_3$	294.2187	
Coenzyme Q6	$C_{39} H_{58} O_4$	590.4438	
8-hydroxy-9,11-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_3$	292.2025	
13S-hydroxy-9E,11Zoctadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_3$	296.2339	
7-palmitoleic acid	$C_{16} H_{30} O_2$	254.2235	
Etanidazole	$C_7 H_{10} N_4 O_4$	214.0668	

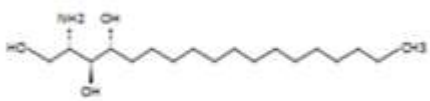
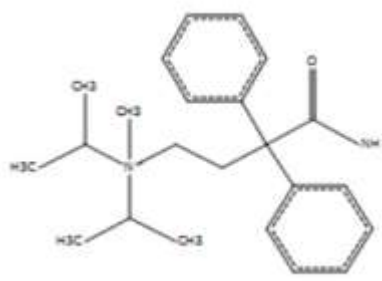

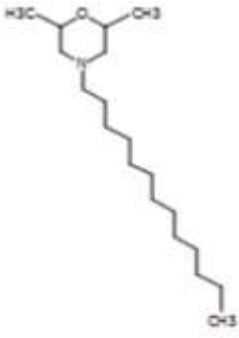

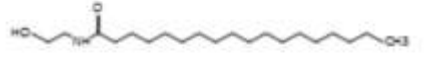

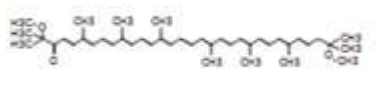


FODITAN

alpha-Thiophenecarboxylic acid	$C_5 H_4 O_2 S$	127.9946	
3-desmethyl-5-deshydroxyscleroin	$C_{14} H_{12} O_4$	244.0764	
6-Methoxy-2-naphthylacetic acid	$C_{13} H_{12} O_3$	216.0825	
Neuraminic acid	$C_9 H_{17} N O_8$	267.093	
Uracil	$C_4 H_4 N_2 O_2$	112.0259	
Niacinamide	$C_6 H_6 N_2 O$	122.0465	
Benzenemetanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl-	$C_{11} H_{16} O_3$	196.107	
C16 Sphinganine	$C_{16} H_{35} N O_2$	273.2638	

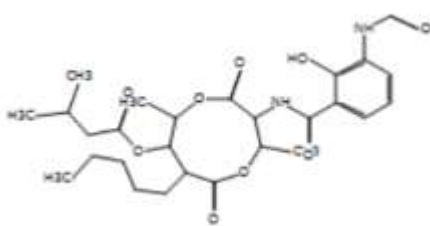

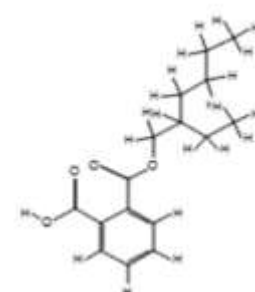
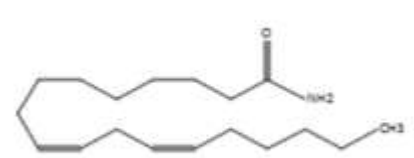
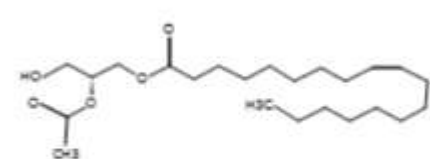
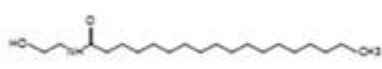
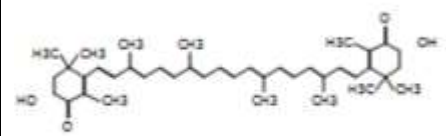


UBORÅS

Phytosphingosine	$C_{18} H_{39} N O_3$	317.2899	
isopropamide	$C_{23} H_{32} N_2 O$	352.2578	
Dihydrosphingosine	$C_{18} H_{39} N O_2$	301.2948	
Tridemorph	$C_{19} H_{39} N O$	297.2995	
9,12,14-octadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_2$	278.2209	
N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N O_2$	327.3097	
n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.2585	
Ketospirilloxanthin	$C_{42} H_{58} O_3$	610.4508	



UNIVERSITY OF BOTSWANA

Antimycin A (A1 shown)	$C_{27} H_{38} N_2 O_9$	534.2562	
Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0244	
Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.1481	
Linoleamide	$C_{18} H_{33} N O$	279.2525	
2-Acetyl-1-oleoyl-sn-glycerol	$C_{23} H_{42} O_5$	398.2953	
N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N O_2$	327.3096	
7,8-Didehydroastaxanthin	$C_{40} H_{50} O_4$	594.3662	



UBJ

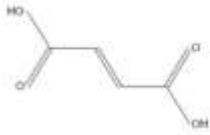
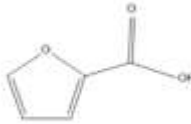
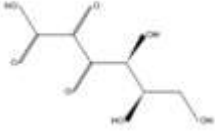
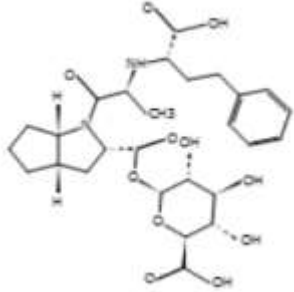
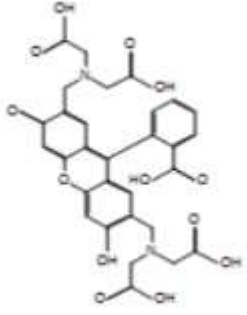
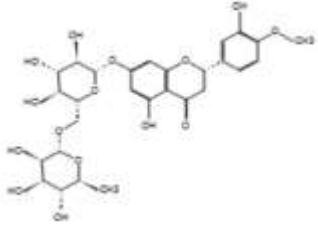
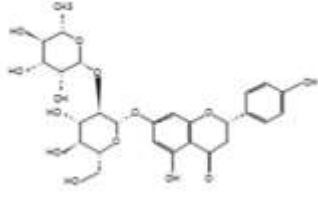
GPGroP(16:0/18:1(9Z))	$C_{40} H_{78} O_{13}$ P_2	828.4884	
1-Hexadecylamine	$C_{16} H_{35} N$	241.2736	
Oleamide	$C_{18} H_{35} N O$	281.2683	
1-heptadecanoyl-rac-glycerol	$C_{20} H_{40} O_4$	344.2986	
Tiaprofenic acid	$C_{14} H_{12} O_3$ S	260.0537	
Dihydrotetrabenazine	$C_{19} H_{29} N$ O_3	319.2155	
O-Acetylserine	$C_5 H_9 N O_4$	147.0533	
Aminofurantoin	$C_8 H_8 N_4 O_3$	208.0585	



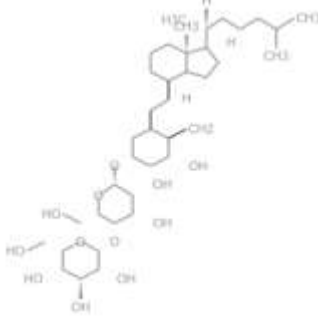
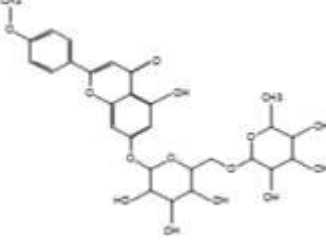
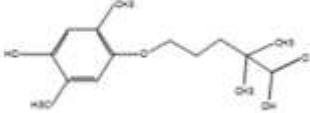
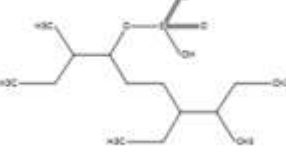
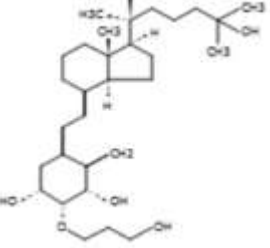
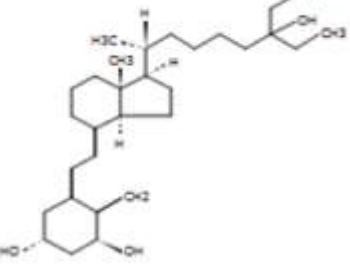
FBI/DOJ

alpha,alpha'-Trehalose 6-phosphate	$C_{12} H_{23} O_{14} P$	422.0847	
Galactonic acid	$C_6 H_{12} O_7$	196.0576	
Apionic acid	$C_5 H_{10} O_6$	166.0477	
Pteryxin	$C_{21} H_{22} O_7$	386.1338	
Quinic acid	$C_7 H_{12} O_6$	192.0638	
Methylmethane sulfonate	$C_2 H_6 O_3 S$	110.0045	
myo-Inositol	$C_6 H_{12} O_6$	180.0636	
malic acid	$C_4 H_6 O_5$	134.0217	



Fumaric acid	$C_4 H_4 O_4$	116.0109	
2-Furoic acid	$C_5 H_4 O_3$	112.0162	
2,3-Dioxogulonic acid	$C_6 H_8 O_7$	192.0275	
Ramiprilat glucuronide	$C_{27} H_{36} N_2$ O_{11}	564.2409	
Calcein	$C_{30} H_{26} N_2$ O_{13}	622.1523	
Hesperidin	$C_{28} H_{34} O_{15}$	610.1891	
Naringin	$C_{27} H_{32} O_{14}$	580.1789	


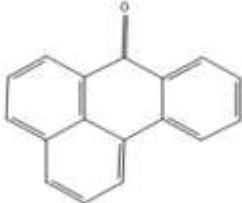
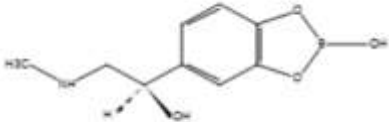
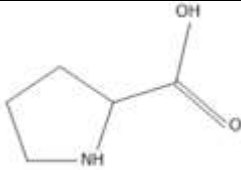

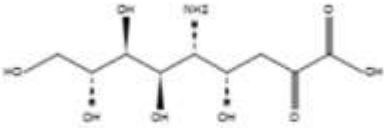
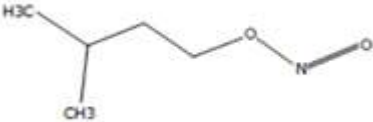
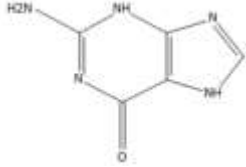


<p>1-Hydroxyvitamin D3 cellobioside</p>	<p>C₃₉ H₆₄ O₁₂</p>	<p>724.4532</p>	
<p>Buddleoflavonololide</p>	<p>C₂₈ H₃₂ O₁₄</p>	<p>592.1785</p>	
<p>5-(4-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)</p>	<p>C₁₅ H₂₂ O₄</p>	<p>266.155</p>	
<p>Sodium tetradecyl sulfate</p>	<p>C₁₄ H₃₀ O₄ S</p>	<p>294.1869</p>	
<p>1beta,25-dihydroxy-2beta-(3-hydroxypropoxy)vitamin D3 / 1beta,25-dihydroxy-2beta-(3-hydroxypropoxy)c</p>	<p>C₃₀ H₅₀ O₅</p>	<p>490.3685</p>	
<p>1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homovitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homoc</p>	<p>C₃₀ H₅₀ O₃</p>	<p>458.3792</p>	



1-heneicosanoyl-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Zdocosa hexenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)	$C_{49} H_{89} N$ $O_{10} P$	882.6231	
Azacididine	$C_8 H_{12} N_4 O_5$	244.0772	
2-Amino-3-methyl-1-butanol	$C_5 H_{13} N O$	103.099	
5H-Oxireno[4,5]furo[3,2-g][1]benzopyran-5-one, 1a,8bdihydro-3-methoxy	$C_{12} H_8 O_5$	232.0326	
Bisnorbiotin	$C_8 H_{12} N_2$ $O_3 S$	216.0588	
beta-Toxicarol	$C_{23} H_{22} O_7$	410.1349	
Quebrachitol	$C_7 H_{14} O_6$	194.0769	




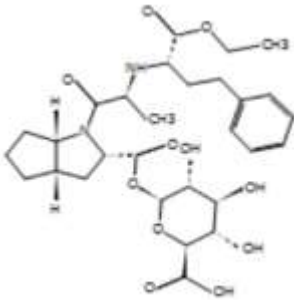
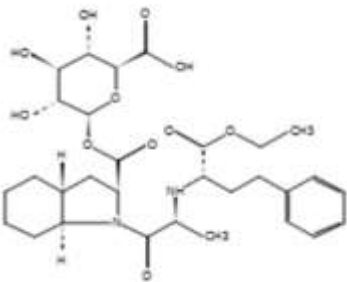
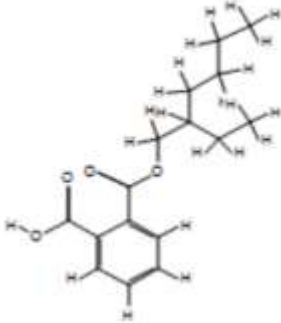
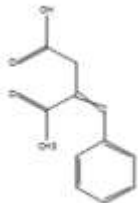
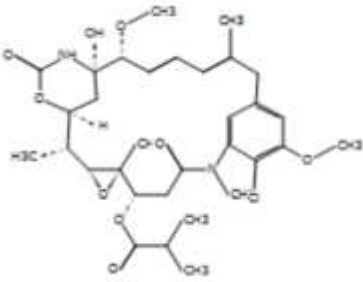
Quinone	$C_6 H_4 O_2$	108.0204	
Benzanthrone	$C_{17} H_{10} O$	230.0739	
epinephryl borate ophthalmic solution	$C_9 H_{12} B N O_4$	208.0924	
Proline	$C_5 H_9 N O_2$	115.0624	
11-amino-undecanoic acid	$C_{11} H_{23} N O_2$	201.1707	
Neuraminic acid	$C_9 H_{17} N O_8$	267.0937	
isoamyl nitrite	$C_5 H_{11} N O_2$	117.0777	
Guanine	$C_5 H_5 N_5 O$	151.0486	

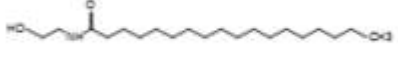
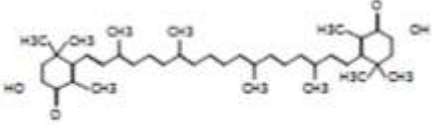
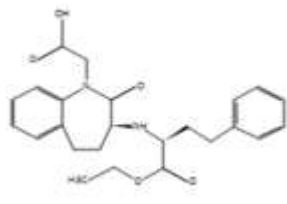

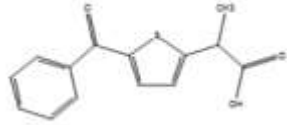



UQU

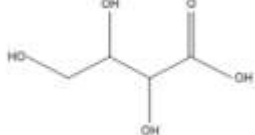
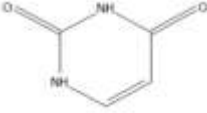
Succinic acid	$C_4 H_6 O_4$	118.0283	
Neuraminic acid	$C_9 H_{17} N O_8$	267.0936	
Gummiferol	$C_{16} H_{14} O_5$	286.0809	
Buddleoflavonololside	$C_{28} H_{32} O_{14}$	592.1734	
Phylloquinone (Vitamin K1)	$C_{31} H_{46} O_2$	450.3511	
Atenolol	$C_{14} H_{22} N_2 O_3$	266.1625	
Dihydroceramide C2	$C_{20} H_{41} N O_3$	343.3053	
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	$C_{48} H_{68} O_8$	772.5048	
N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N O_2$	327.3104	



n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.2591	
Ramipril glucuronide	$C_{29} H_{40} N_2$ O_{11}	592.2633	
Trandolapril glucuronide	$C_{30} H_{42} N_2$ O_{11}	606.2774	
Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.149	
Levulinic acid, 3-benzylidenyl	$C_{12} H_{12} O_3$	204.0768	
Ansamitocin P3	$C_{32} H_{43} Cl$ $N_2 O_9$	634.2728	

N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N$ O_2	327.3102	
7,8-Didehydroastaxanthin	$C_{40} H_{50} O_4$	594.3677	
Benazepril	$C_{24} H_{28} N_2$ O_5	424.2025	
1-Octadecanamine	$C_{18} H_{39} N$	269.3049	
Tiaprofenic acid	$C_{14} H_{12} O_3$ S	260.0547	
Tetroquinone	$C_6 H_4 O_6$	172.004	

Tablo 3. 16. Etil asetat özütü alt fraksiyonlarından D fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

Adı	Formül	Moleküler Ağırlığı	Şekli
DL-erythronic acid	$C_4 H_8 O_5$	136.0366	
Uracil	$C_4 H_4 N_2 O_2$	112.0266	



3-[(4-Carboxy-4-methylpentyl)oxy]-4-methylbenzoic acid (Gemfibrozil M3)	$C_{15} H_{20} O_5$	280.1306	
3-Methylsuberic acid	$C_9 H_{16} O_4$	188.1048	
9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_5$	328.2248	
Traumatic acid	$C_{12} H_{20} O_4$	228.1359	
3E-undecenoic acid	$C_{11} H_{20} O_2$	184.1461	
16-hydroperoxy-9Z,12,14Eoctadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_4$	310.2146	
20-hydroxy-PGF2alpha	$C_{20} H_{34} O_6$	370.2352	
Phorbol myristate acetate	$C_{36} H_{56} O_8$	616.3978	



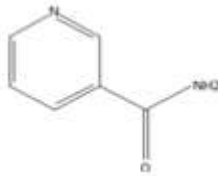
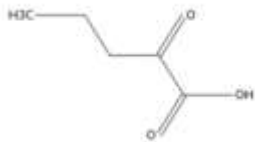
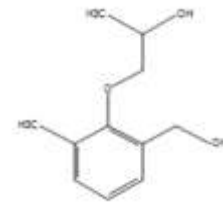
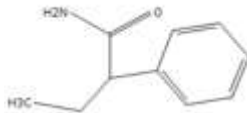
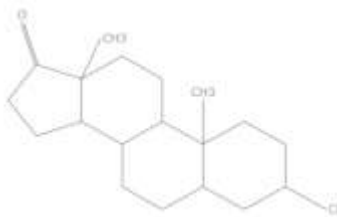
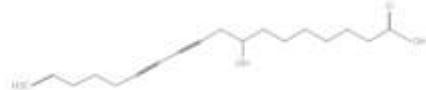
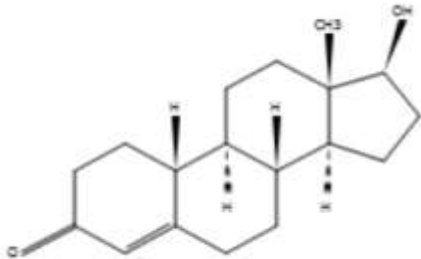
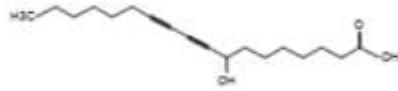
FBI

9-hydroxy-5Z-nonenoic acid	$C_9 H_{16} O_3$	172.1099	
Tetranor Iloprost	$C_{18} H_{26} O_4$	306.1827	
5-(4-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)	$C_{15} H_{22} O_4$	266.1551	
methyl 8-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-octanoate	$C_{17} H_{26} O_5$	310.1816	
Idebenone Metabolite (Benzenedecanoic acid, 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-)	$C_{19} H_{30} O_6$	354.2071	
Gambogic acid	$C_{38} H_{44} O_8$	628.3066	
12-oxo-9-octadecynoic acid	$C_{18} H_{30} O_3$	294.2196	
9,12,14-octadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_2$	278.2248	



Sodium tetradecyl sulfate	$C_{14} H_{30} O_4$ S	294.1867	
Neurosporaxanthin beta-Dglucopyranoside	$C_{42} H_{60} O_7$	676.4258	
13S-hydroxy-9E,11Zoctadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_3$	296.2357	
2-Hydroxyethinylestrodiol	$C_{20} H_{24} O_3$	312.176	
26,27-diethyl-1alpha,25-dihydroxy-20,21-didehydro-23-oxavitamin D3 / 26,27-diethyl-1alpha,25-dihydro	$C_{30} H_{48} O_4$	472.3577	
7-palmitoleic acid	$C_{16} H_{30} O_2$	254.2248	
13E,17-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_2$	280.2403	
Uracil	$C_4 H_4 N_2 O_2$	112.0261	



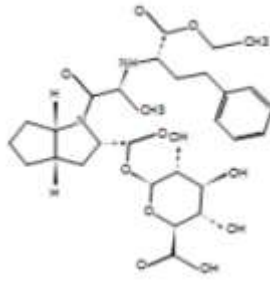

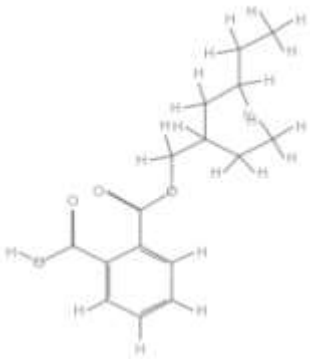
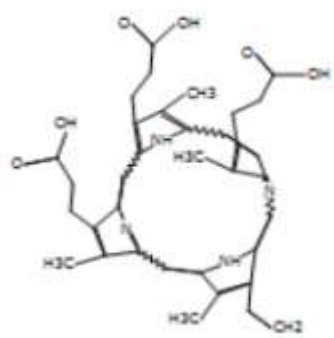


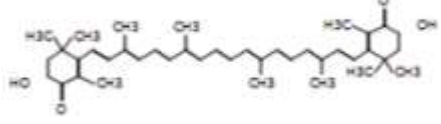
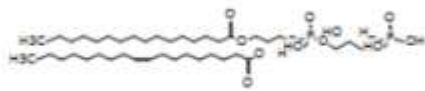


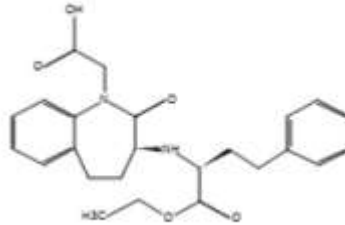

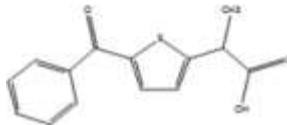
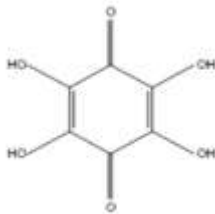
Niacinamide	$C_6 H_6 N_2 O$	122.0466	
2-Oxovaleric acid	$C_5 H_8 O_3$	116.0462	
Benzenemetanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl	$C_{11} H_{16} O_3$	196.1075	
2-Phenylbutyramide	$C_{10} H_{13} N O$	163.0979	
3beta chloroandrostanone	$C_{19} H_{29} Cl O$	308.1955	
8-hydroxy-17-octadecene-10,12-diyonic acid	$C_{18} H_{26} O_3$	290.1856	
Nandrolone	$C_{18} H_{26} O_2$	274.1905	
8-hydroxy-9,11-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_3$	292.2007	



C16 Sphinganine	$C_{16} H_{35} N$ O_2	273.2641	
isopropamide	$C_{23} H_{32} N_2$ O	352.2577	
6-[5]-ladderane-1-hexanol	$C_{18} H_{28} O$	260.2116	
Tridemorph	$C_{19} H_{39} N O$	297.3002	
3,6-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.2061	
9,12,14-octadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_2$	278.2216	
Atenolol	$C_{14} H_{22} N_2$ O_3	266.1623	
Dihydroceramide C2	$C_{20} H_{41} N$ O_3	343.3049	



N-(2-hydroxyethyl) stearamide	$C_{20} H_{41} N$ O_2	327.3104	
n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.2589	
Ramipril glucuronide	$C_{29} H_{40} N_2$ O_{11}	592.2616	
Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0242	
Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.1482	
Harderoporphyrin	$C_{35} H_{36} N_4$ O_6	608.2554	

7,8-Didehydroastaxanthin	C ₄₀ H ₅₀ O ₄	594.3668	
GPGroP(16:0/18:1(9Z))	C ₄₀ H ₇₈ O ₁₃ P ₂	828.4888	
1-Hexadecylamine	C ₁₆ H ₃₅ N	241.2738	
1-heptadecanoyl-rac-glycero	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	344.299	
Benazepril	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	424.2016	
1-Octadecanamine	C ₁₈ H ₃₉ N	269.3045	
Tiaprofenic acid	C ₁₄ H ₁₂ O ₃ S	260.0543	
Tetroquinone	C ₆ H ₄ O ₆	172.004	

Tablo 3. 17.Etil asetat özütü alt fraksiyonlarından E fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

Adı	Formül	Moleküler Ağırlığı	Şekli
-----	--------	--------------------	-------


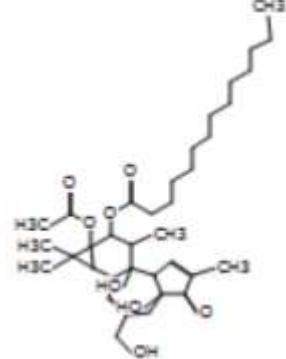
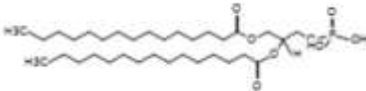
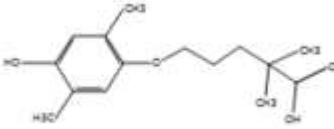
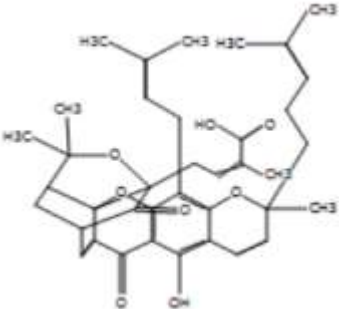




TUBITAN

DL-erythronic acid	$C_4 H_8 O_5$	136.0373	
L-2-Aminoadipic acid	$C_6 H_{11} N O_4$	161.0689	
Uracil	$C_4 H_4 N_2 O_2$	112.0273	
Idebenone Metabolite (beta-DGlucopyranosiduronic acid, 4-hydroxy-3-(10-hydroxydecyl)-5,6-dimethoxy-	$C_{25} H_{40} O_{11}$	516.257	
3-Methylsuberic acid	$C_9 H_{16} O_4$	188.1049	
9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_5$	328.2251	
1,2-di-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)icosapentaenoic acid	$C_{43} H_{64} O_5$	660.4815	
Traumatic acid	$C_{12} H_{20} O_4$	228.1366	
3E-undecenoic acid	$C_{11} H_{20} O_2$	184.1465	




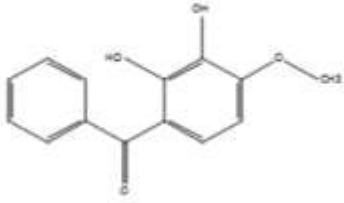
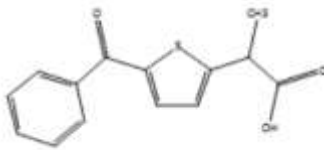
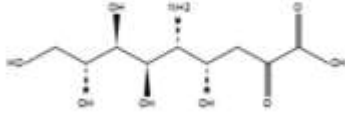
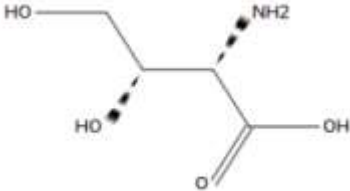

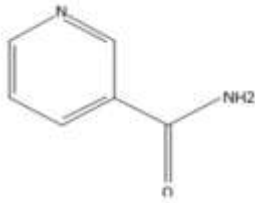
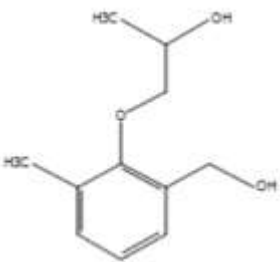
FIDR

16-hydroperoxy- 9Z,12,14Eoctadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_4$	310.2152	
Phorbol myristate acetate	$C_{36} H_{56} O_8$	616.3983	
GPA(15:0/15:0)[U]	$C_{33} H_{65} O_8$ P	620.4294	
5-(4-hydroxy-2,5- dimethylphenoxy)-2,2- dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)	$C_{15} H_{22} O_4$	266.1556	
Gambogic acid	$C_{38} H_{44} O_8$	628.3076	
3,6-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.2095	
12-oxo-9-octadecynoic acid	$C_{18} H_{30} O_3$	294.2205	



Sodium tetradecyl sulfate	$C_{14} H_{30} O_4$ S	294.1875	
5(6)-EpETrE-EA	$C_{22} H_{37} N$ O_3	363.2771	
Ramipril glucuronide	$C_{29} H_{40} N_2$ O_{11}	592.2686	
Coenzyme A, S-(3-hydroxypentanoate)	$C_{26} H_{44} N_7$ $O_{18} P_3 S$	867.1823	
7-palmitoleic acid	$C_{16} H_{30} O_2$	254.225	
1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homovitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homoc	$C_{30} H_{50} O_3$	458.3795	
1-Hydroxyvitamin D3 cellobioside	$C_{39} H_{64} O_{12}$	724.4396	



Stearic acid	$C_{18} H_{36} O_2$	284.2714	
3-desmethyl-5-deshydroxyscleroin	$C_{14} H_{12} O_4$	244.0764	
Tiaprofenic acid	$C_{14} H_{12} O_3$ S	260.054	
Neuraminic acid	$C_9 H_{17} N O_8$	267.0934	
4-Hydroxy-L-threonine	$C_4 H_9 N O_4$	135.053	
Uracil	$C_4 H_4 N_2 O_2$	112.0261	
Niacinamide	$C_6 H_6 N_2 O$	122.0468	
Benzenemetanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl-	$C_{11} H_{16} O_3$	196.1074	



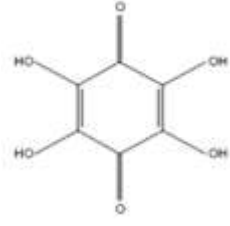
2-Phenylbutyramide	$C_{10} H_{13} N O$	163.0981	
8-hydroxy-9,11-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_3$	292.2007	
2-Pyrrolidinone, 4-(2-morpholinoethyl)-3,3-diphenyl	$C_{22} H_{26} N_2 O_2$	350.2026	
isopropamide	$C_{23} H_{32} N_2 O$	352.2584	
6-[5]-ladderane-1-hexanol	$C_{18} H_{28} O$	260.2113	
LTB4-d4	$C_{20} H_{28} D_4 O_4$	340.2556	
9,12,14-octadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_2$	278.2213	
Atenolol	$C_{14} H_{22} N_2 O_3$	266.1615	



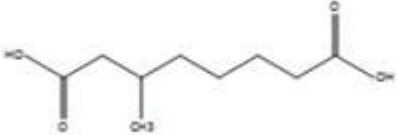
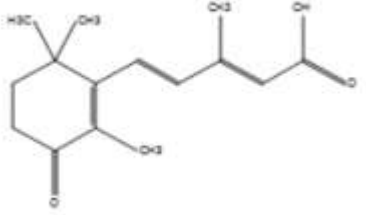
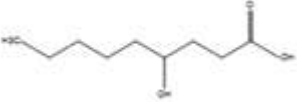
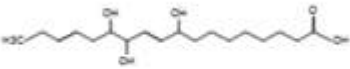
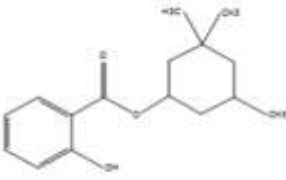
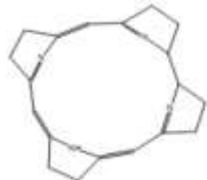
Tridemorph	$C_{19} H_{39} N O$	297.3	
Dihydroceramide C2	$C_{20} H_{41} N$ O_3	343.3045	
n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.2587	
5(6)-EpETrE-EA	$C_{22} H_{37} N$ O_3	363.2739	
Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0238	
Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.1483	
Antimycin A (A1 shown)	$C_{27} H_{38} N_2$ O_9	534.2563	
Linoleamide	$C_{18} H_{33} N O$	279.2529	



N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N$ O_2	327.3096	
Harderoporphyrin	$C_{35} H_{36} N_4$ O_6	608.256	
7,8-Didehydroastaxanthin	$C_{40} H_{50} O_4$	594.3665	
GPGroP(16:0/18:1(9Z))	$C_{40} H_{78} O_{13}$ P_2	828.4891	
1-Hexadecylamine	$C_{16} H_{35} N$	241.2736	
Benazepril	$C_{24} H_{28} N_2$ O_5	424.2009	
1-Octadecanamine	$C_{18} H_{39} N$	269.3042	
1-heptadecanoyl-rac-glycerol	$C_{20} H_{40} O_4$	344.2988	
Tiaprofenic acid	$C_{14} H_{12} O_3$ S	260.054	

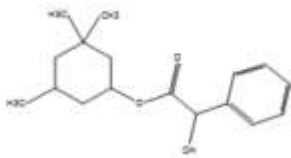
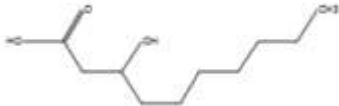

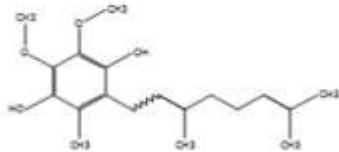
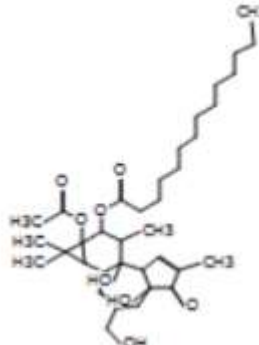
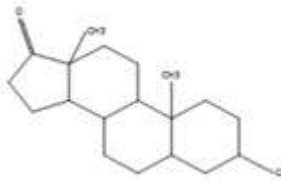
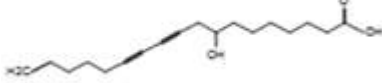
Tetroquinone	$C_6 H_4 O_6$	172.0036	
--------------	---------------	----------	---

Tablo 3. 18. Kloroform ana fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

Adı	Formül	Moleküler Ağırlığı	Şekli
3-Methylsuberic acid	$C_9 H_{16} O_4$	188.1044	
2,4-Pentadienoic acid, 3-methyl 5-(2,6,6-trimethyl-3-oxo-1-cyclohexen-1-yl)-	$C_{15} H_{20} O_3$	248.1444	
4-hydroxy pelargonic acid	$C_9 H_{18} O_3$	174.1251	
9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_5$	328.2244	
homosalate	$C_{16} H_{22} O_3$	262.16	
Corrinoid	$C_{19} H_{22} N_4$	306.1861	



KEMKES RI

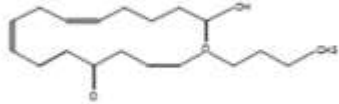
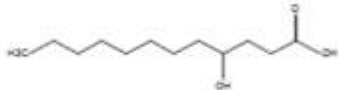
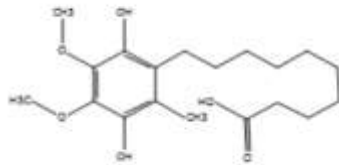
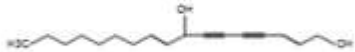

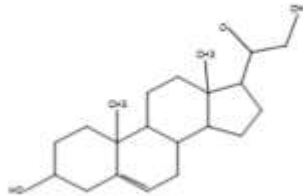
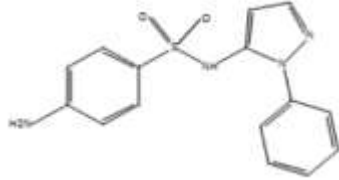
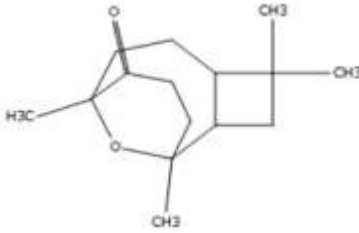
cyclandelate	$C_{17} H_{24} O_3$	276.1755	
3-Hydroxycapric acid	$C_{10} H_{20} O_3$	188.141	
16-hydroperoxy-9Z,12,14Eoctadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_4$	310.2141	
QH2	$C_{19} H_{28} O_4$	320.2024	
Phorbol myristate acetate	$C_{36} H_{56} O_8$	616.3967	
3beta- chloroandrostano-3-one	$C_{19} H_{29} Cl O$	308.1983	
8-hydroxy-17-octadecene-10,12-diynoic acid	$C_{18} H_{26} O_3$	290.191	



FIAT



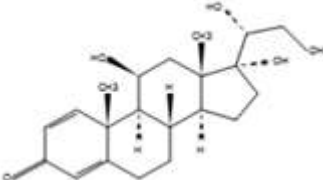
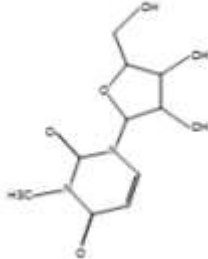
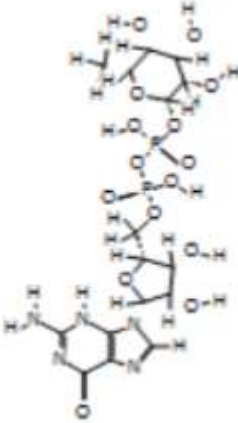
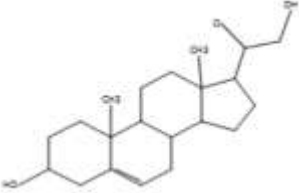
bicyclo-PGE2	$C_{20} H_{30} O_4$	334.2174	
10-hydroxy-undecanoic acid	$C_{11} H_{22} O_3$	202.1567	
2E,8E-Undecadiene-4,6-diyonic acid	$C_{11} H_{10} O_2$	174.0711	
Tetranor Iloprost	$C_{18} H_{26} O_4$	306.1835	
5,8,11-dodecatriynoic acid	$C_{12} H_{12} O_2$	188.0871	
16alpha-Hydroxytestosterone	$C_{19} H_{28} O_3$	304.2075	
12-methoxy-4,4-bisnor-5alpha-8,11,13-podocarpatrien-3-ol	$C_{16} H_{22} O_2$	246.1652	
5-(4-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)	$C_{15} H_{22} O_4$	266.155	



12-oxo-EETE	$C_{20} H_{30} O_3$	318.2226	
4-hydroxy lauric acid	$C_{12} H_{24} O_3$	216.1725	
Idebenone Metabolite (Benzenedecanoic acid, 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-)	$C_{19} H_{30} O_6$	354.2069	
2,9-heptadecadien-4,6-diy- 1,8-diol	$C_{17} H_{24} O_2$	260.1815	
12-oxo-9-octadecynoic acid	$C_{18} H_{30} O_3$	294.2187	
21-Hydroxypregnenolone	$C_{21} H_{32} O_3$	332.2392	
Sulfaphenazole	$C_{15} H_{14} N_4$ $O_2 S$	314.085	
3,7-epoxycaryophyllan-6-one	$C_{15} H_{24} O_2$	236.1777	

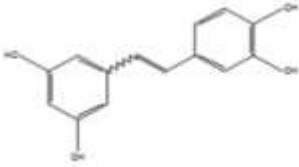
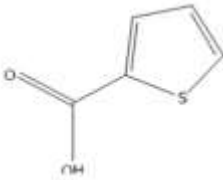

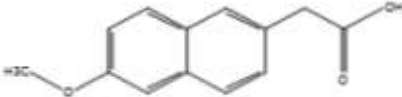
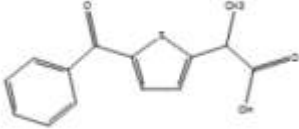

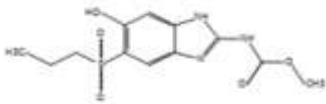


INDONESIA

3,6-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.2084	
1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)- 2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)- sn-glycerol	$C_{40} H_{66} O_5$	626.4908	
20alpha-Dihydroprednisolone	$C_{21} H_{30} O_5$	362.2088	
3-Methyluridine	$C_{10} H_{14} N_2$ O_6	258.0869	
Guanosine diphosphofucose	$C_{16} H_{25} N_5$ $O_{15} P_2$	589.0841	
21-Hydroxypregnenolone	$C_{21} H_{32} O_3$	332.2425	



FODITAN

3,3',4,5'-Tetrahydroxystilbene	$C_{14} H_{12} O_4$	244.0721	
alpha-Thiophenecarboxylic acid	$C_5 H_4 O_2 S$	127.9928	
2-nonene-4,6,8-triynal	$C_9 H_4 O$	128.0266	
6-Methoxy-2-naphthylacetic acid	$C_{13} H_{12} O_3$	216.0775	
Tiaprofenic acid	$C_{14} H_{12} O_3$ S	260.051	
Tetroquinone	$C_6 H_4 O_6$	171.9988	
albendazole (II)	$C_{12} H_{15} N_3$ $O_5 S$	313.0745	




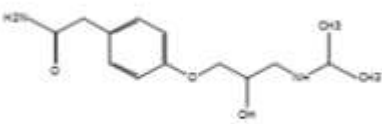
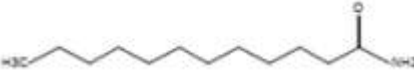
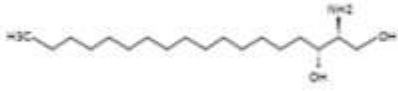


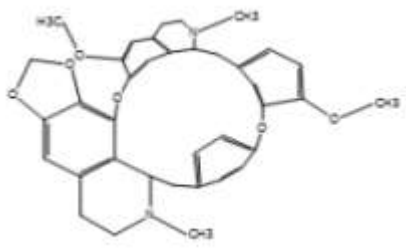
3-Hydroxy-N-glycyl-2,6-xylidine (3-Hydroxyglycinexylidide)	$C_{10} H_{14} N_2$ O_2	194.1085	
5-Phenylvaleric acid	$C_{11} H_{14} O_2$	178.0952	
Benzenemetanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl	$C_{11} H_{16} O_3$	196.1054	
LTB4 ethanol amide	$C_{22} H_{37} N$ O_4	379.2679	
C16 Sphinganine	$C_{16} H_{35} N$ O_2	273.2627	
5a-Tetrahydrocorticosterone	$C_{21} H_{34} O_4$	350.2402	



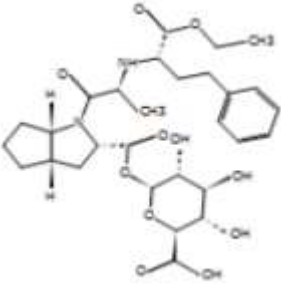
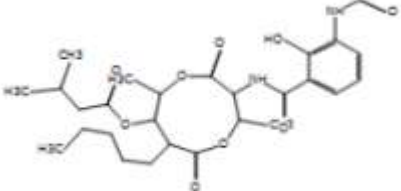

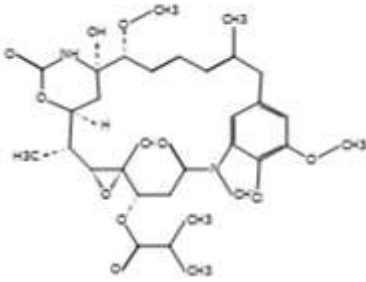
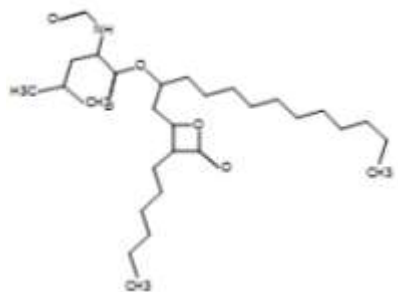

isopropamide	$C_{23} H_{32} N_2$ O	352.2562	
Probucol spiroquinone	$C_{31} H_{46} O_2$ S ₂	514.3063	
Tridemorph	$C_{19} H_{39} N O$	297.2988	
Dihydrosphingosine	$C_{18} H_{39} N$ O ₂	301.2939	
15-deoxy-ä-12,14-PGJ2	$C_{20} H_{28} O_3$	316,1967	
3,6-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.2049	



TUBITAN

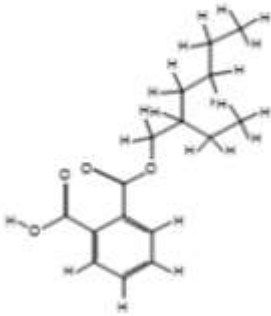
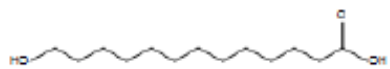
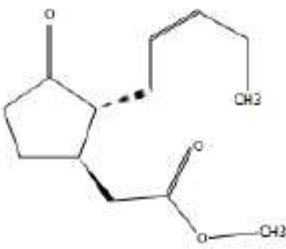
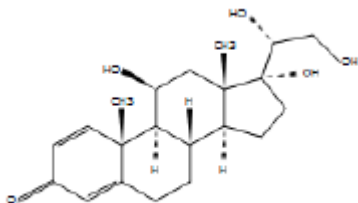


8-hydroxy-9,11-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_3$	292.1996	
Atenolol	$C_{14} H_{22} N_2 O_3$	266.1607	
dodecanamide	$C_{12} H_{25} N O$	199.1906	
Dihydrosphingosine	$C_{18} H_{39} N O_2$	301.2938	
12-oxo-9-octadecynoic acid	$C_{18} H_{30} O_3$	294.2148	
N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N O_2$	327.3087	
Cepharanthine	$C_{37} H_{38} N_2 O_6$	606.2753	



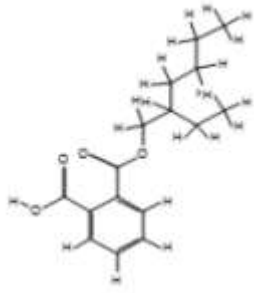
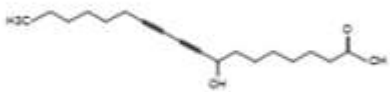
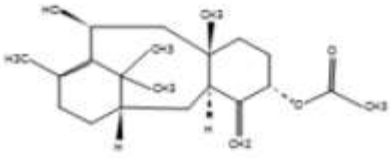
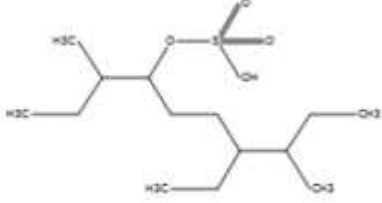

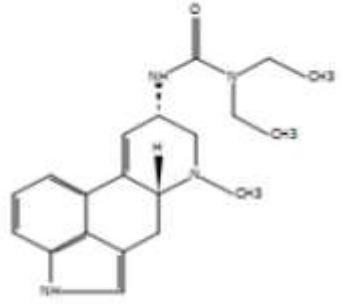
Ramipril glucuronide	$C_{29} H_{40} N_2$ O_{11}	592.2601	
Antimycin A (A1 shown)	$C_{27} H_{38} N_2$ O_9	534.2549	
n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.2579	
Ansamitocin P3	$C_{32} H_{43} Cl$ $N_2 O_9$	634.2751	
Orlistat	$C_{29} H_{53} N$ O_5	495.4047	
Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0234	



FBI/DOJ

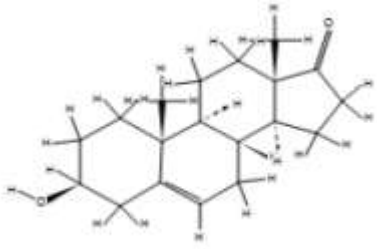
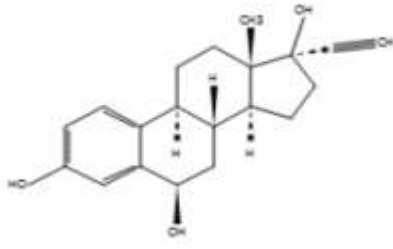
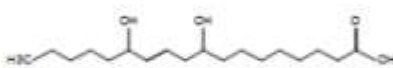
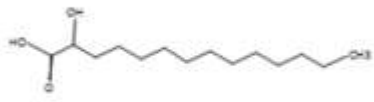
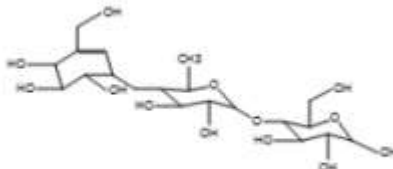
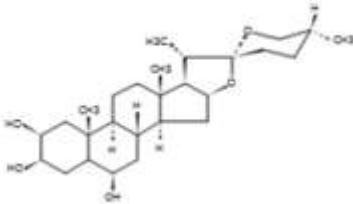
Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.1473	
13-hydroxy-tridecanoic acid	$C_{13} H_{26} O_3$	230.1877	
Methyl jasmonate	$C_{13} H_{20} O_3$	224.141	
20alpha-Dihydroprednisolone	$C_{21} H_{30} O_5$	362.2092	
3,6,9,12,15-octadecapentaenoic acid	$C_{18} H_{26} O_2$	274.1966	
1,2-di-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoyl)-sn-glycerol	$C_{43} H_{64} O_5$	660.4669	



Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	C16 H22 O4	278.1517	
8-hydroxy-9,11-octadecadiynoic acid	C18 H28 O3	292.2032	
Taxa-4(20),11(12)-dien-5alpha-acetoxy-10beta-ol	C22 H34 O3	346.2524	
Sodium tetradecyl sulfate	C14 H30 O4 S	294.1862	
13S-hydroxy-9E,11Z-octadecadienoic acid	C18 H32 O3	296.2346	
Lisuride	C20 H26 N4 O	338.2122	

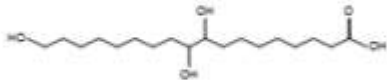
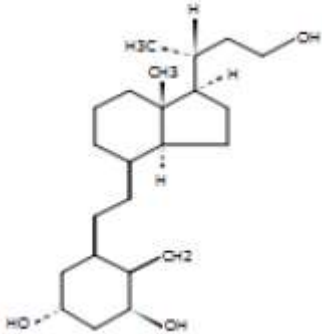
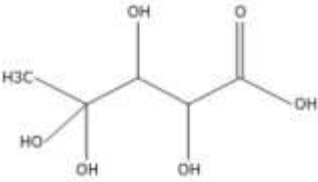

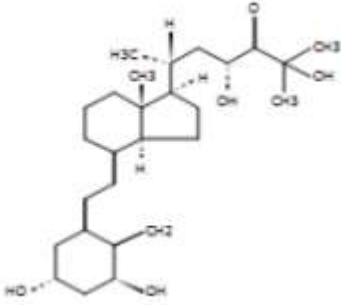



UNIVERSITY OF BOTSWANA

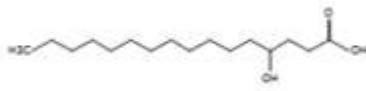
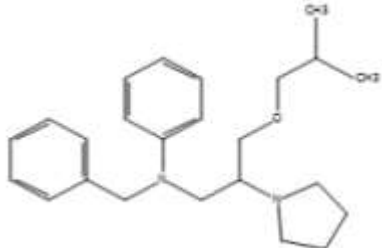

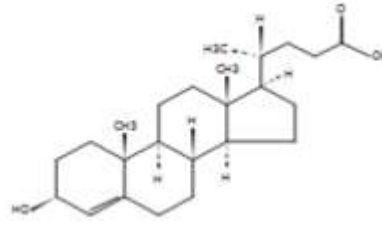
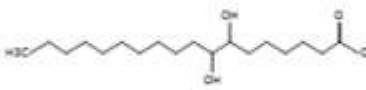
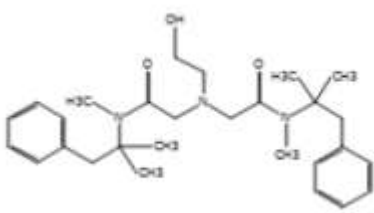
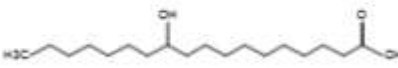
trans-Dehydroandrosterone	C19 H28 O2	288.2131	
19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,6,17-triol, (6b,17a)-	C20 H24 O3	312.177	
9,13-dihydroxy-11-octadecenoic acid	C18 H34 O4	314.2459	
2-Hydroxymyristic acid	C14 H28 O3	244.2031	
Acarbose (component 2)	C20 H34 O13	482.2083	
Porrigenin A	C27 H44 O5	448.32	

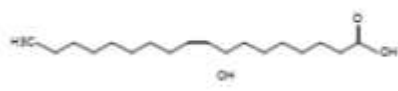
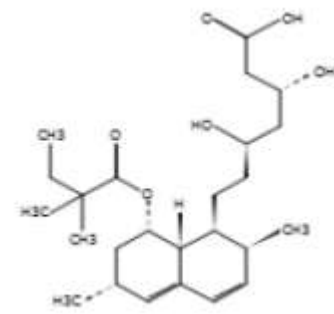
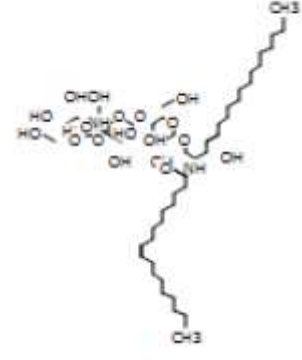
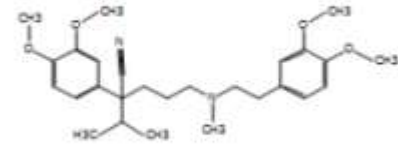
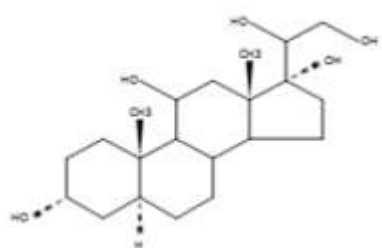


BPOM

Phloionolic acid	C18 H36 O5	332.2563	
1alpha,23-dihydroxy- 24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1alpha,23-dihydroxy- 24,25,26,27-tetranorcholeca	C23 H36 O3	360.2676	
Apionic acid	C5 H10 O6	166.0477	
2E,5Z,8Z,11Z,14Z- eicosapentaenoic acid	C20 H30 O2	302.2295	
(23R)-1alpha,23,25-trihydroxy- 24-oxovitamin D3 / (23R)- 1alpha,23,25- trihydroxy-24- oxocholecalciferol	C27 H42 O5	446.3053	
15-hydroxy-pentadecanoic acid	C15 H30 O3	258.2187	



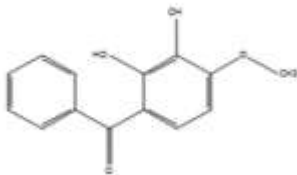

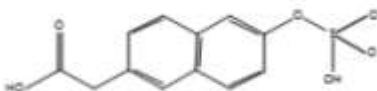
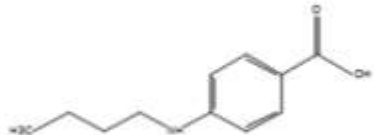
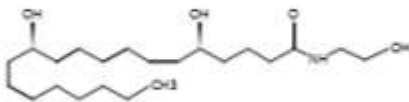

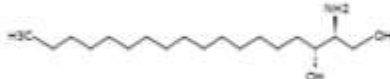


4-hydroxy palmitic acid	C16 H32 O3	272.2345	
Bepiridil	C24 H34 N2 O	366.2759	
7-palmitoleic acid	C16 H30 O2	254.2256	
3beta-Hydroxychol-4-en-24-oic Acid	C24 H38 O3	374.2837	
7,8-dihydroxy stearic acid	C18 H36 O4	316.2551	
Oxethazaine	C28 H41 N3 O3	467.3263	
DL-11-hydroxy stearic acid	C18 H36 O3	300.265	

8R-hydroxy-9Z-octadecenoic acid	C18 H34 O3	298.2499	
Simvastatin acid	C25 H40 O6	436.282	
Ganglioside GA2 (d18:1/9Z-18:1)	C56 H102 N2 O18	1090.7122	
Verapamil	C27 H38 N2 O4	454.2877	
Allocortol	C21 H36 O5	368.2495	


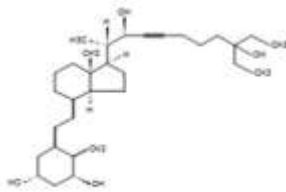
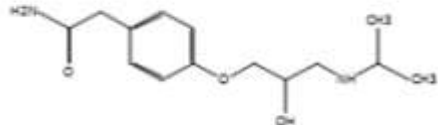
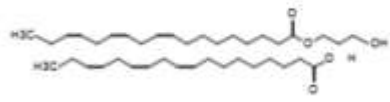



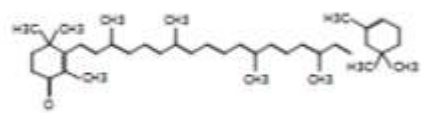
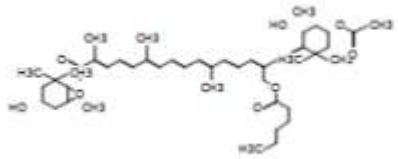
Tablo 3. 19. Kloroform alt fraksiyonlarından 1 fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

Adı	Formül	Moleküler Ağırlığı	Şekli
-----	--------	--------------------	-------



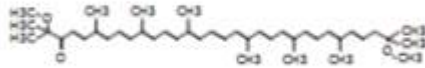

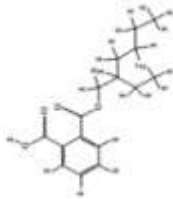
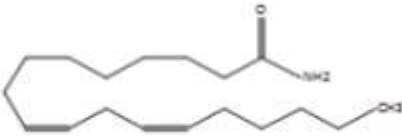
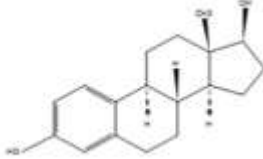
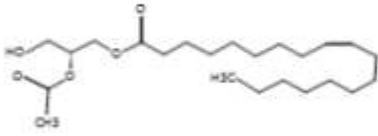
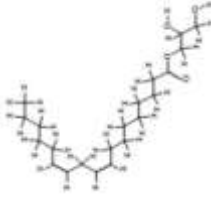
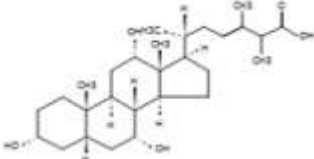
3-desmethyl-5-deshydroxyscleroin	$C_{14} H_{12} O_4$	244.0758	
11-amino-undecanoic acid	$C_{11} H_{23} N O_2$	201.1694	
2-Naphthaleneacetic acid, 6-(sulfooxy)-	$C_{12} H_{10} O_6 S$	282.0238	
p-Butylaminobenzoic acid	$C_{11} H_{15} N O_2$	193.1069	
LTB4 ethanol amide	$C_{22} H_{37} N O_4$	379.2694	
C16 Sphinganine	$C_{16} H_{35} N O_2$	273.2627	
Dihydrosphingosine	$C_{18} H_{39} N O_2$	301.2943	
9,12,14-octadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_2$	278.2207	
Tridemorph	$C_{19} H_{39} N O$	297.2992	



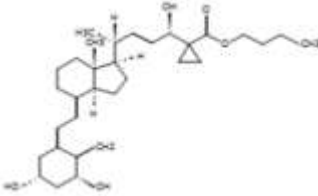
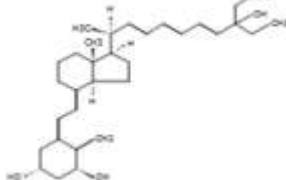

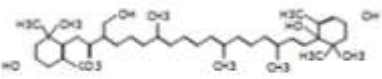
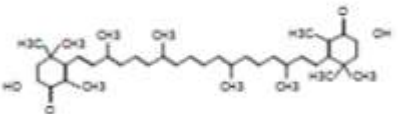
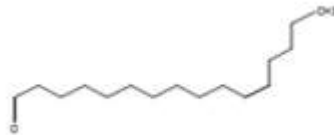


3,6-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.2048	
(22R)-1alpha,22,25-trihydroxy-26,27-dimethyl-23,23,24,24-tetrahydro-24a,24b,24c trihomovitamin D3	$C_{32} H_{50} O_4$	498.364	
Atenolol	$C_{14} H_{22} N_2 O_3$	266.161	
1,2-di-(9Z,12Z,15Z octadecatrienoyl)-sn-glycerol	$C_{39} H_{64} O_5$	612.4665	
dodecanamide	$C_{12} H_{25} N O$	199.1912	
N-(2-hydroxyethyl)stearamide	$C_{20} H_{41} N O_2$	327.309	
n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.258	
alpha-Echinenone/ Phoenicopterone	$C_{40} H_{54} O$	550.4092	
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	$C_{48} H_{68} O_8$	772.5021	



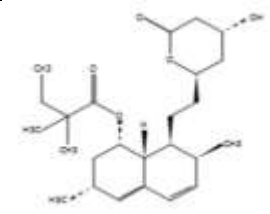
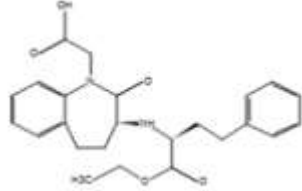


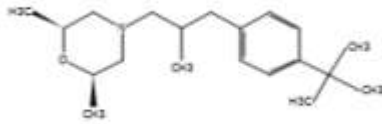
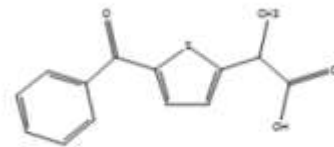
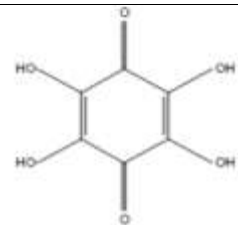
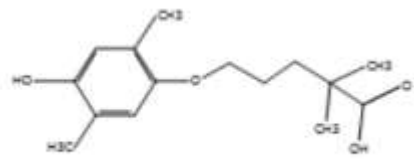
FIAT

Ketospirilloxanthin	$C_{42} H_{58} O_3$	610.4505	
Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0238	
Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.1477	
Linoleamide	$C_{18} H_{33} N O$	279.2517	
Estradiol	$C_{18} H_{24} O_2$	272.1722	
2-Acetyl-1-oleoyl-sn-glycerol	$C_{23} H_{42} O_5$	398.2949	
1-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-rac-glycerol	$C_{21} H_{38} O_4$	354.2692	
3alpha,7alpha,12alphaTrihydroxy-24-methyl-5betacholest-23-en-26-oic acid	$C_{28} H_{46} O_5$	462.3416	



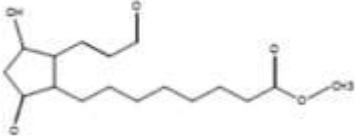
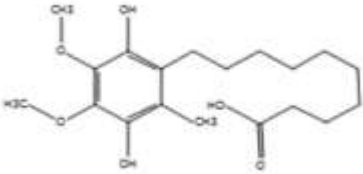

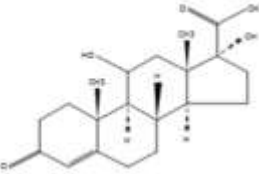
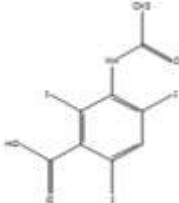
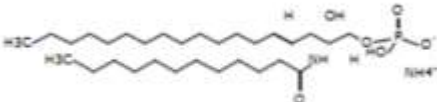
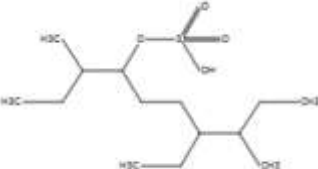
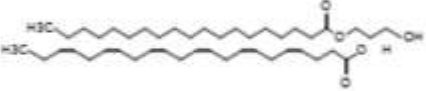
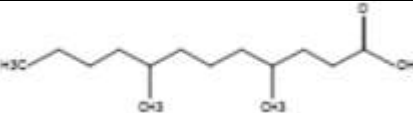
ZK 159222	$C_{32} H_{48} O_5$	512.3429	
(22E,24E,24bE)-1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-22,23,24,24a,24b,24c-hexadecydro-24a,24b,24c-trihydro	$C_{32} H_{48} O_3$	480.3535	
Harderoporphyrin	$C_{35} H_{36} N_4 O_6$	608.2558	
6'-Hydroxysiphonaxanthin	$C_{40} H_{56} O_5$	616.4101	
7,8-Didehydroastaxanthin	$C_{40} H_{50} O_4$	594.3654	
cis-11-Hexadecenal	$C_{16} H_{30} O$	238.2262	
1-Hexadecylamine	$C_{16} H_{35} N$	241.2734	
Stearaldehyde	$C_{18} H_{36} O$	268.2722	



Simvastatin	$C_{25} H_{38} O_5$	418.2672	
Benazepril	$C_{24} H_{28} N_2$ O_5	424.2008	
1-heptadecanoyl-rac-glycerol	$C_{20} H_{40} O_4$	344.2983	
Oleamide	$C_{18} H_{35} N O$	281.2677	
cis-Fenpropimorph	$C_{20} H_{33} N O$	303.2489	
Tiaprofenic acid	$C_{14} H_{12} O_3 S$	260.0537	
Tetroquinone	$C_6 H_4 O_6$	172.0037	
5-(4-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)	$C_{15} H_{22} O_4$	266.155	



TUBITAN

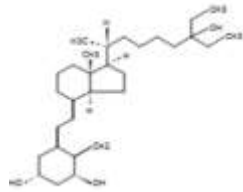


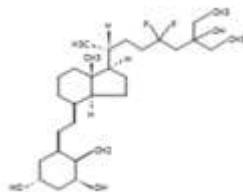
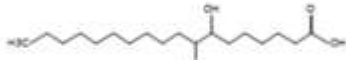
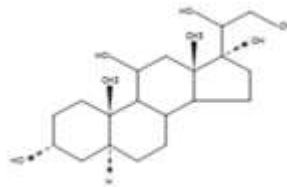

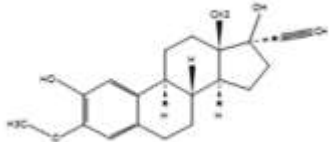

methyl 8-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-octanoate	$C_{17} H_{26} O_5$	310.1819	
Idebenone Metabolite (Benzenedecanoic acid, 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-	$C_{19} H_{30} O_6$	354.2076	
12-oxo-9-octadecynoic acid	$C_{18} H_{30} O_3$	294.2195	
21-Deoxycortisol	$C_{21} H_{30} O_4$	346.2154	
Acetriazoic Acid	$C_9 H_6 I_3 N O_3$	556.75	
CerP(d18:1/12:0)	$C_{30} H_{63} N_2 O_6 P$	578.4302	
Sodium tetradecyl sulfate	$C_{14} H_{30} O_4 S$	294.1864	
1-nonadecanoyl-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Zdocosa hexaenoyl)-sn-glycerol	$C_{44} H_{74} O_5$	682.5532	
4,8-dimethyl-dodecanoic acid	$C_{14} H_{28} O_2$	228.209	

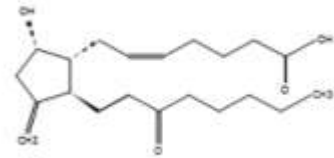


TG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) [iso3]	C ₆₉ H ₁₀₀ O ₆	1024.7304	
Lisuride	C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O	338.2125	
1(3)-glyceryl-PGE2	C ₂₃ H ₃₈ O ₇	426.2668	
Acarbose (component 2)	C ₂₀ H ₃₄ O ₁₃	482.2095	
17-hydroxy-heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₃	286.2507	
Etn-1-P-Cer(d14:1/18:0)	C ₃₈ H ₇₇ N ₂ O ₆ P	688.5469	
Avocadene Acetate	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	328.2599	
26,27-diethyl-1alpha,25-dihydroxy-20,21-didehydro-23-oxavitamin D3 / 26,27-diethyl-1alpha,25-dihydro	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.3562	

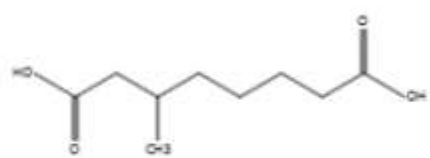
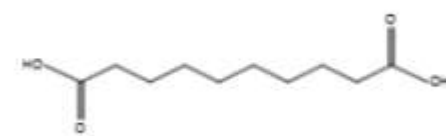
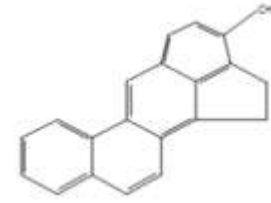
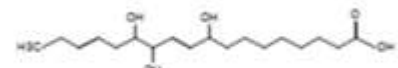

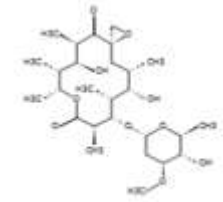


INDONESIA

1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homovitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homoc	$C_{30} H_{50} O_3$	458.3788	
7-palmitoleic acid	$C_{16} H_{30} O_2$	254.2253	
DL-11-hydroxy stearic acid	$C_{18} H_{36} O_3$	300.2646	
24,24-difluoro-1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24ahomovitamin D3 / 24,24-difluoro-1alpha,25-dihy	$C_{30} H_{48} F_2 O_3$	494.3486	
7,8-dihydroxy stearic acid	$C_{18} H_{36} O_4$	316.2611	
Allocortol	$C_{21} H_{36} O_5$	368.2504	
14-methyl-8-hexadecen-1-ol	$C_{17} H_{34} O$	254.2547	
2-Hydroxymestranol	$C_{21} H_{26} O_3$	326.1922	
13E,17-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_2$	280.2399	

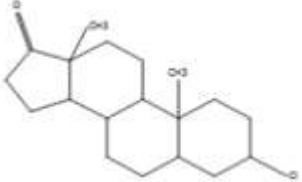
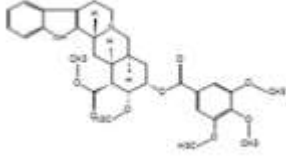
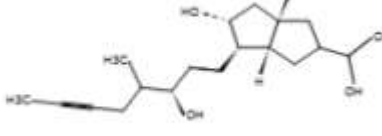
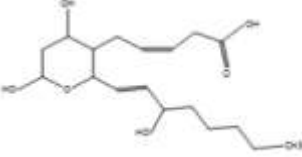
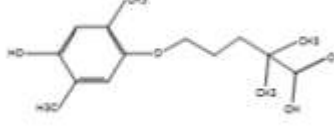
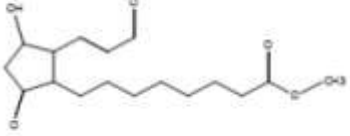
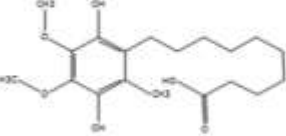

11-deoxy-11-methylene-15-keto-PGD2	$C_{21} H_{32} O_4$	348.2276	
------------------------------------	---------------------	----------	---

Tablo 3. 20. Kloroform alt fraksiyonlarından 7 fraksiyonunun LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

Adı	Formül	Moleküler Ağırlığı	Şekli
3-Methylsuberic acid	$C_9 H_{16} O_4$	188.1044	
Sebacic Acid	$C_{10} H_{18} O_4$	202.1196	
3-Methylcholanthrene	$C_{21} H_{16}$	268.1302	
9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_5$	328.2239	
16-hydroperoxy-9Z,12,14Eoctadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_4$	310.2134	
L-Oleandrosyl-oleandrolide	$C_{27} H_{46} O_{10}$	530.3075	



FIAT

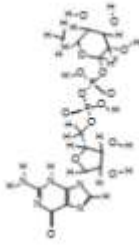
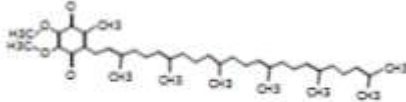
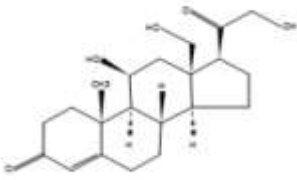

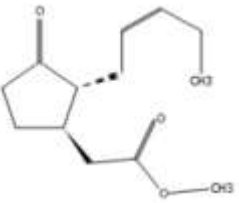
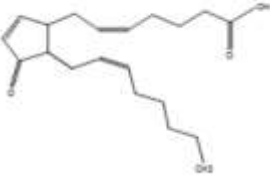
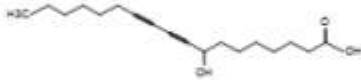
3beta-Chloroandrostanone	C ₁₉ H ₂₉ Cl O	308.1979	
Deserpidine	C ₃₂ H ₃₈ N ₂ O ₈	578.274	
Tetranor Iloprost	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	306.1824	
2,3-Dinor-TXB2	C ₁₈ H ₃₀ O ₆	342.2034	
5-(4-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	266.1547	
methyl 8-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-octanoate	C ₁₇ H ₂₆ O ₅	310.1814	
Idebenone Metabolite (Benzenedecanoic acid, 2,5-dihydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyl-)	C ₁₉ H ₃₀ O ₆	354.2066	
12-oxo-9-octadecynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2182	



TUBITAK

8,13-dihydroxy-9,11-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_4$	312.2288	
Rifabutin	$C_{46} H_{62} N_4 O_{11}$	846.4594	
9,12,14-octadecatrienoic acid	$C_{18} H_{30} O_2$	278.2237	
Gambogic acid	$C_{38} H_{44} O_8$	628.3058	
3,7-Epoxycaryophyllan-6-one	$C_{15} H_{24} O_2$	236.1767	
3,6-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{28} O_2$	276.2079	
9-hydroxy-5Z-nonenoic acid	$C_9 H_{16} O_3$	172.1092	
1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-2-(5Z, 8Z, 11Z, 14Z eicosatetraenoyl)-sn-glycerol	$C_{40} H_{66} O_5$	626.4912	



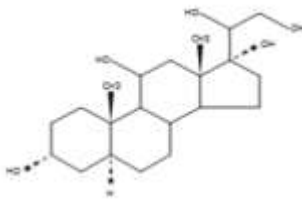
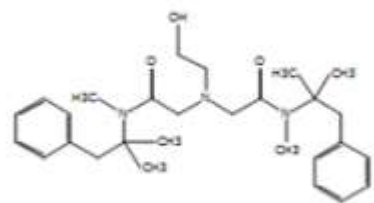
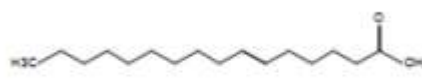
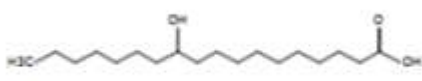
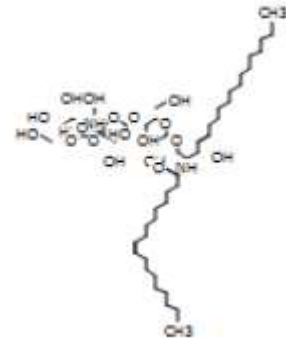
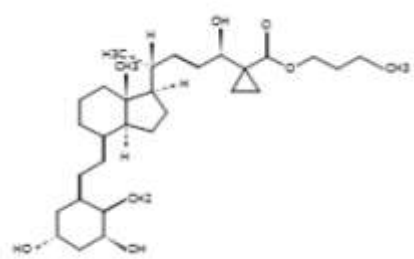
Guanosine diphosphofucose	$C_{16} H_{25} N_5$ $O_{15} P_2$	589.0754	
Coenzyme Q6	$C_{39} H_{58} O_4$	590.4438	
18-Hydroxycorticosterone	$C_{21} H_{30} O_5$	362.2058	
3E-undecenoic acid	$C_{11} H_{20} O_2$	184.1455	
Methyl jasmonate	$C_{13} H_{20} O_3$	224.1401	
15-deoxy- α -12,14-PGJ2	$C_{20} H_{28} O_3$	316.2012	
8-hydroxy-9,11-octadecadiynoic acid	$C_{18} H_{28} O_3$	292.2024	



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI

13S-hydroxy-9E,11Zoctadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_3$	296.2342	
Lisuride	$C_{20} H_{26} N_4 O$	338.2112	
Allotetrahydrocortisone	$C_{21} H_{32} O_5$	364.2211	
1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-2-(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoyl)-sn-glycerol	$C_{40} H_{68} O_5$	628.507	
13E,17-octadecadienoic acid	$C_{18} H_{32} O_2$	280.2387	
2-Hydroxyethinylestradiol	$C_{20} H_{24} O_3$	312.1746	
Ramipril glucuronide	$C_{29} H_{40} N_2 O_{11}$	592.2664	
9-deoxy-9-methylene-16,16-dimethyl -PGE2	$C_{23} H_{38} O_4$	378.2783	

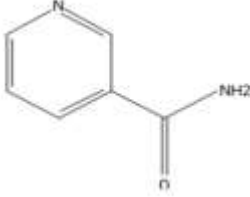
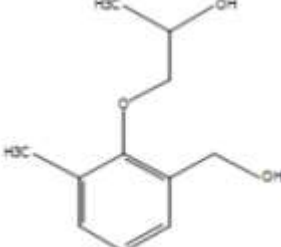

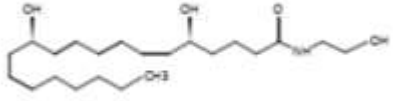
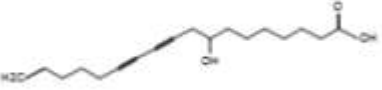
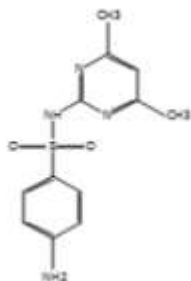
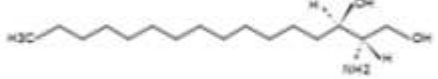


Allocortol	$C_{21} H_{36} O_5$	368.2514	
Oxethazaine	$C_{28} H_{41} N_3$ O_3	467.3253	
7-palmitoleic acid	$C_{16} H_{30}$ O_2	254.2238	
DL-11-hydroxy stearic acid	$C_{18} H_{36}$ O_3	300.2646	
Ganglioside GA2 (d18:1/9Z-18:1)	$C_{56} H_{102}$ $N_2 O_{18}$	1090.713	
ZK 159222	$C_{32} H_{48}$ O_5	512.3629	



methyl-10-hydroperoxy-8E,12Z,15Z-octadecatrienoate	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	324.226	
2-propyl-tridecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.2387	
3-Desmethyl-5-Deshydroxyscleroin	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	244.0764	
2,4-Dichlorophenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	161.9657	
Tetroquinone	C ₆ H ₄ O ₆	172.0049	
Tiaprofenic acid	C ₁₄ H ₁₂ O ₃ S	260.054	
11-amino-undecanoic acid	C ₁₁ H ₂₃ N O ₂	201.1701	
Uracil	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	112.026	



Niacinamide	$C_6 H_6 N_2 O$	122.0464	
Benzenemetanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl-	$C_{11} H_{16} O_3$	196.1067	
5-Phenylvaleric acid	$C_{11} H_{14} O_2$	178.0959	
LTB4 ethanol amide	$C_{22} H_{37} N$ O_4	379.2706	
8-hydroxy-17-octadecene-10,12-diyonic acid	$C_{18} H_{26} O_3$	290.185	
Sulfamethazine	$C_{12} H_{14} N_4$ $O_2 S$	278.0831	
C16 Sphinganine	$C_{16} H_{35} N$ O_2	273.2636	



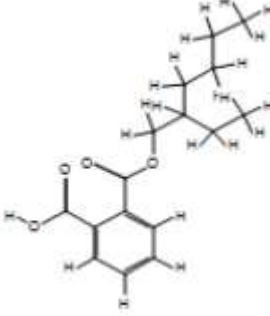



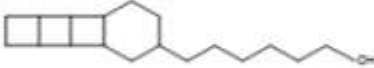
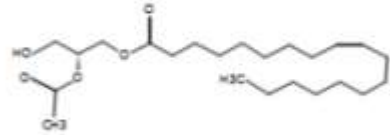
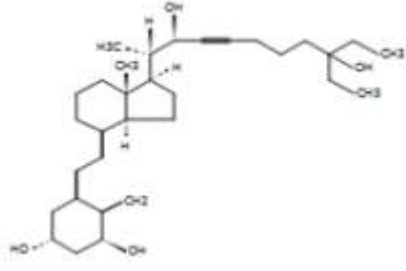
isopropamide	$C_{23} H_{32} N_2$ O	352.2565	
PGB3	$C_{20} H_{28} O_4$	332.1926	
Met His Lys	$C_{17} H_{30} N_6$ O ₄ S	414.1992	
Dihydrosphingosine	$C_{18} H_{39} N$ O ₂	301.2956	
Tridemorph	$C_{19} H_{39} N O$	297.3002	
6-[5]-ladderane-1-hexanol	$C_{18} H_{28} O$	260.2113	
dodecanamide	$C_{12} H_{25} N O$	199.1913	



UNIVERSITY OF BOTSWANA

GS 1500	$C_{31} H_{44} O_3$ S	496.2992	
LTB4-d4	$C_{20} H_{28} D_4$ O ₄	340.2558	
Nandrolone	$C_{18} H_{26} O_2$	274.1903	
Atenolol	$C_{14} H_{22} N_2$ O ₃	266.1619	
Madecassic acid	$C_{30} H_{48} O_6$	504.3387	
Anandamide (18:3, n-6)	$C_{20} H_{35} N$ O ₂	321.2627	

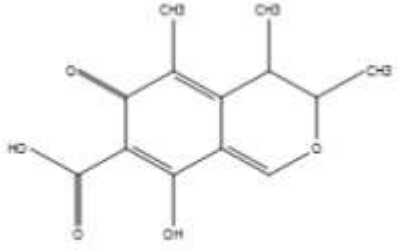


Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	$C_{16} H_{22} O_4$	278.1481	
Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0241	
n-Pentadecylamine	$C_{15} H_{33} N$	227.2585	
1-heptadecanoyl-rac-glycerol	$C_{20} H_{40} O_4$	344.2991	
6-[3]-ladderane-1-hexanol	$C_{18} H_{30} O$	262.2263	
2-Acetyl-1-oleoyl-sn-glycerol	$C_{23} H_{42} O_5$	398.2955	
(22R)-1alpha,22,25-trihydroxy-26,27-dimethyl-23,23,24,24-tetrahydro-24a,24b,24ctrihomovitamin D3	$C_{32} H_{50} O_4$	498.3644	



TUBITAN

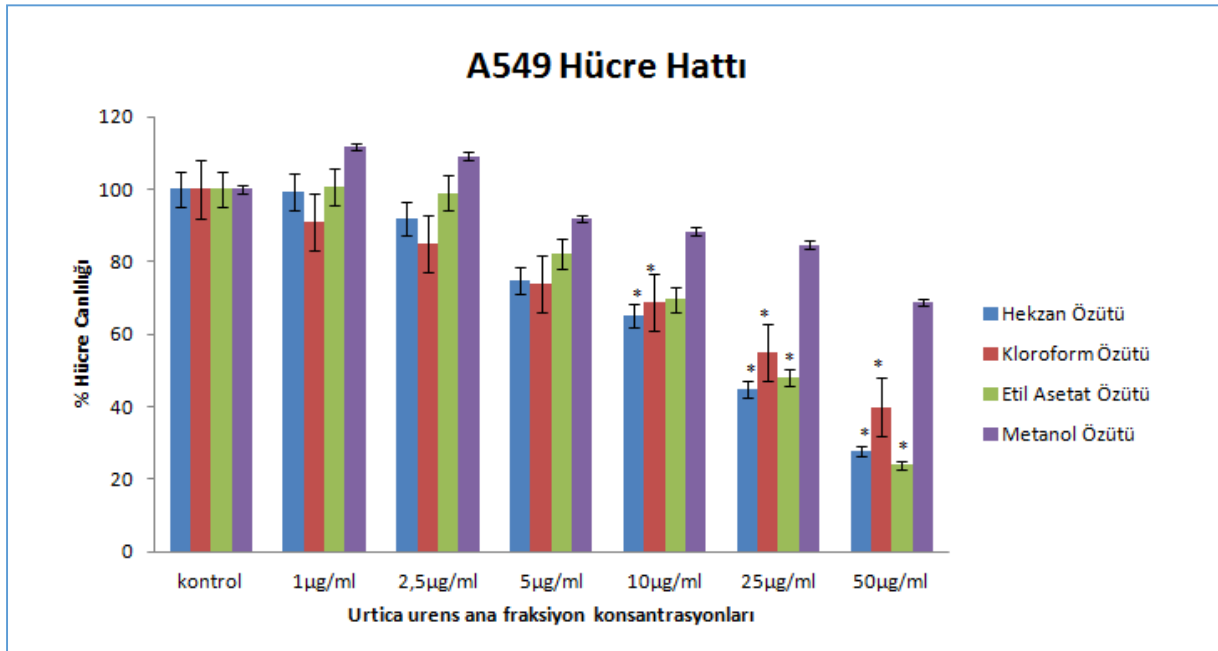
(22E,24E,24bE)-1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-22,23,24,24a,24b,24c-hexadecahydro-24a,24b,24c-tri-	$C_{32} H_{48} O_3$	480.3545	
1-(9Z,12Z-octadecadienyl)-rac-glycerol	$C_{21} H_{38} O_4$	354.2699	
Linoleamide	$C_{18} H_{33} N O$	279.2526	
GPGroP(16:0/18:1(9Z))	$C_{40} H_{78} O_{13}$ P ₂	828.4879	
7,8-Didehydroastaxanthin	$C_{40} H_{50} O_4$	594.3657	
1-Hexadecylamine	$C_{16} H_{35} N$	241.2734	
1-Octadecanamine	$C_{18} H_{39} N$	269.3041	

Citrinin	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250.0838	
----------	--	----------	---

3.1.1.3 *Urtica urens* Bitkisinde Yaprak Özütlerinin Sitotoksisite Çalışmaları

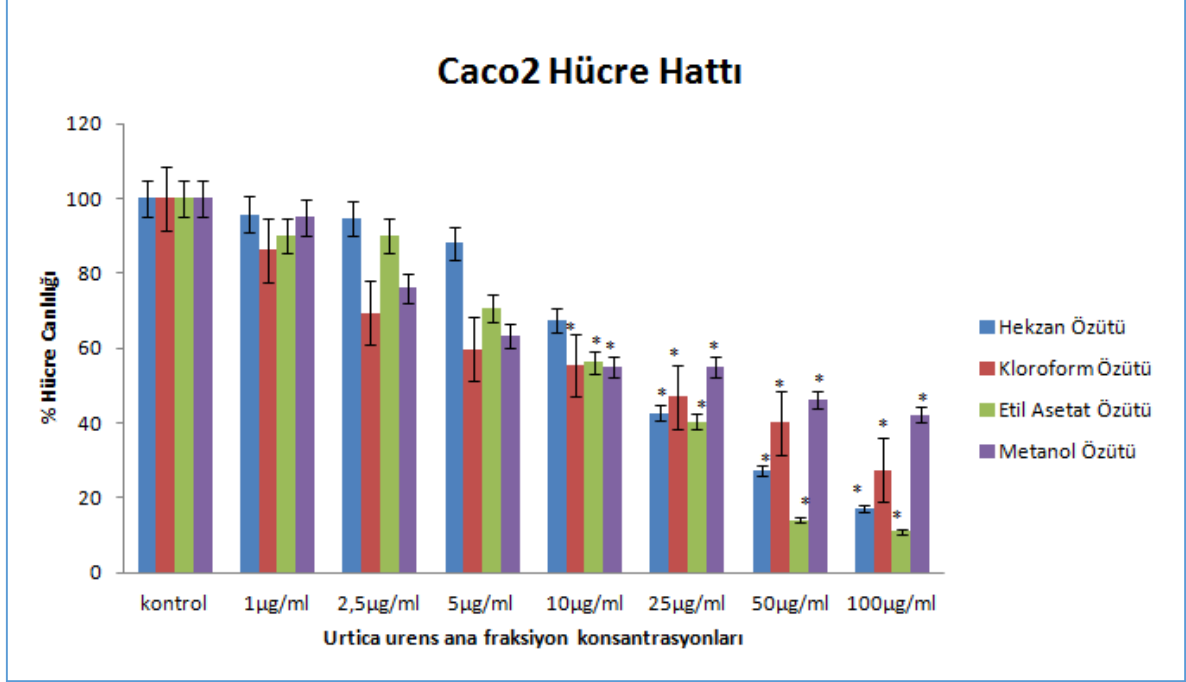
3.1.1.3.1 Ana Özütlerin Sitotoksisitesi

A549 (insan akciğer adenocarcinoma hücre hattı) hücre hattında ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve alkol özütlerinin sitotoksik etkileri Şekil 3.23'te verilmiştir. Sitotoksisite sonuçlarından elde edilen verilere göre LD50 değerleri, hekzan özütü için 27,8 µg/ml, etil asetat özütü için 29 µg/ml, kloroform özütü için 35,1 µg/ml ve alkol özütü için 73,6 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, hekzan, etil asetat ve kloroform özütlerinin yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



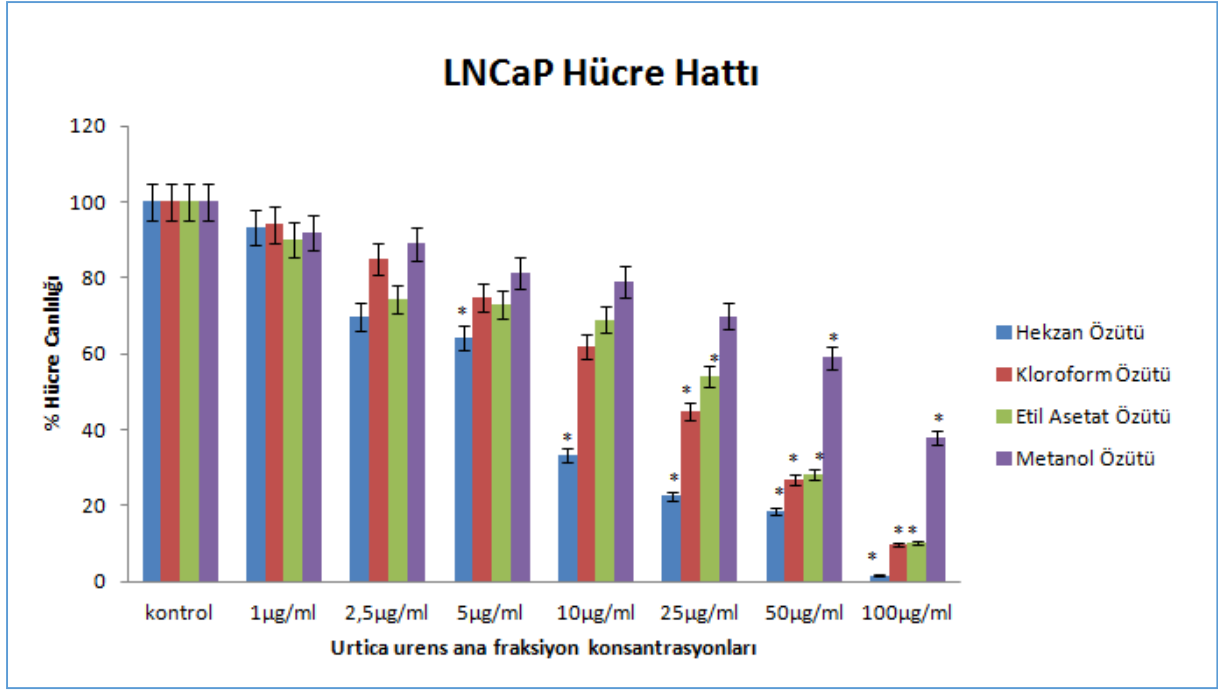
Şekil 3. 23. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin A549 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

Caco-2 (insan kolon kanser hücre hattı) hücre hattında yapılan sitotoksikite sonuçlarından elde edilen verilere göre hesaplanan LD50 değerleri sırasıyla, hekzan özütü için 35,3 µg/ml, etil asetat özütü için 31,2 µg/ml, kloroform özütü için 42,5 µg/ml ve alkol özütü için 72,5 µg/ml'dir (Şekil 3.24). Bu sonuçlar, hekzan, etil asetat ve kloroform özütlerinin alkol özütüne göre yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 24. Değişik konsantrasyonlarda ki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin Caco2 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

Son olarakta küçük ısırgan otu yapraklarının değişik çözücülerle hazırlanmış özütlerinin LNCaP (insan prostat kanser hücre hattı) hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre LD50 değerleri, hekzan özütü için 20.5 µg/ml, etil asetat özütü için 25.6 µg/ml, kloroform özütü için 35.9µg/ml ve alkol özütü için 78.1 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.25). Bu sonuçlar, diğer hücre hatlarında olduğu gibi, hekzan, etil asetat ve kloroform özütlerinin alkol özütüne göre yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



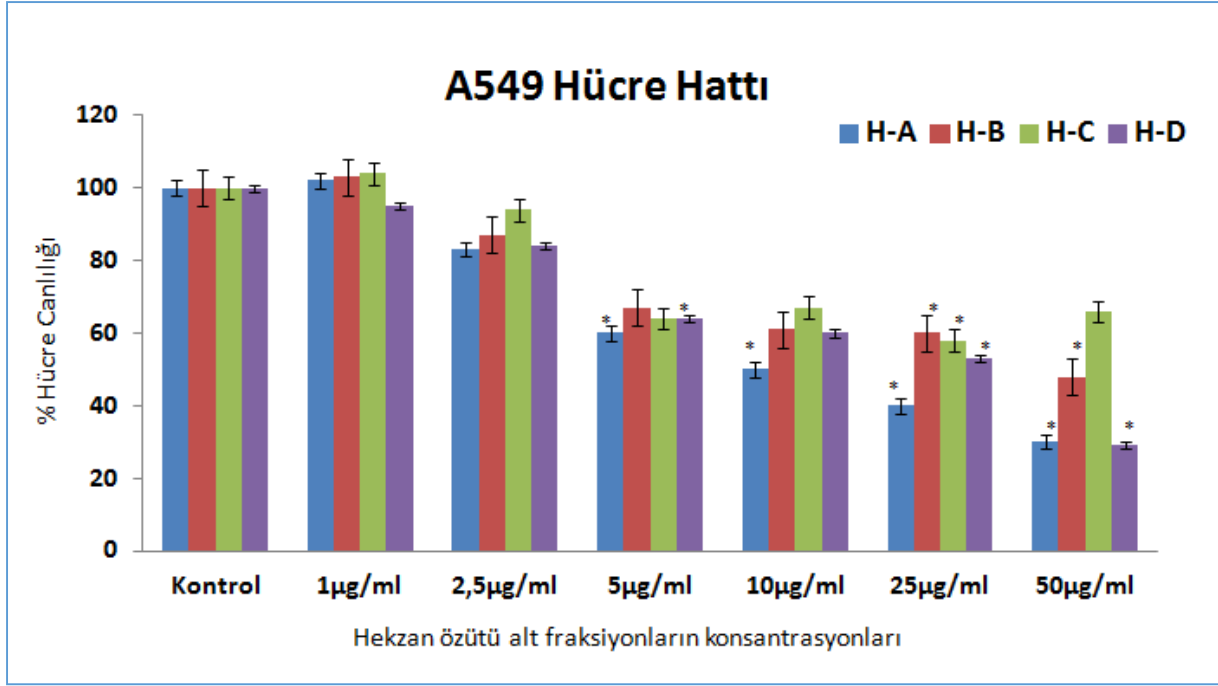
Şekil 3. 25. Değişik konsantrasyonlarda ki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol özütlерinin LNCaP hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

3.1.1.3.2 Ana Özütlерden Elde Edilen Alt Fraksiyonların Sitotoksitesisi

Yaprak özütlерinin fraksiyonlanması sonucunda elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat alt fraksiyonlarının sitotoksitesite çalışmaları yapılmıştır.

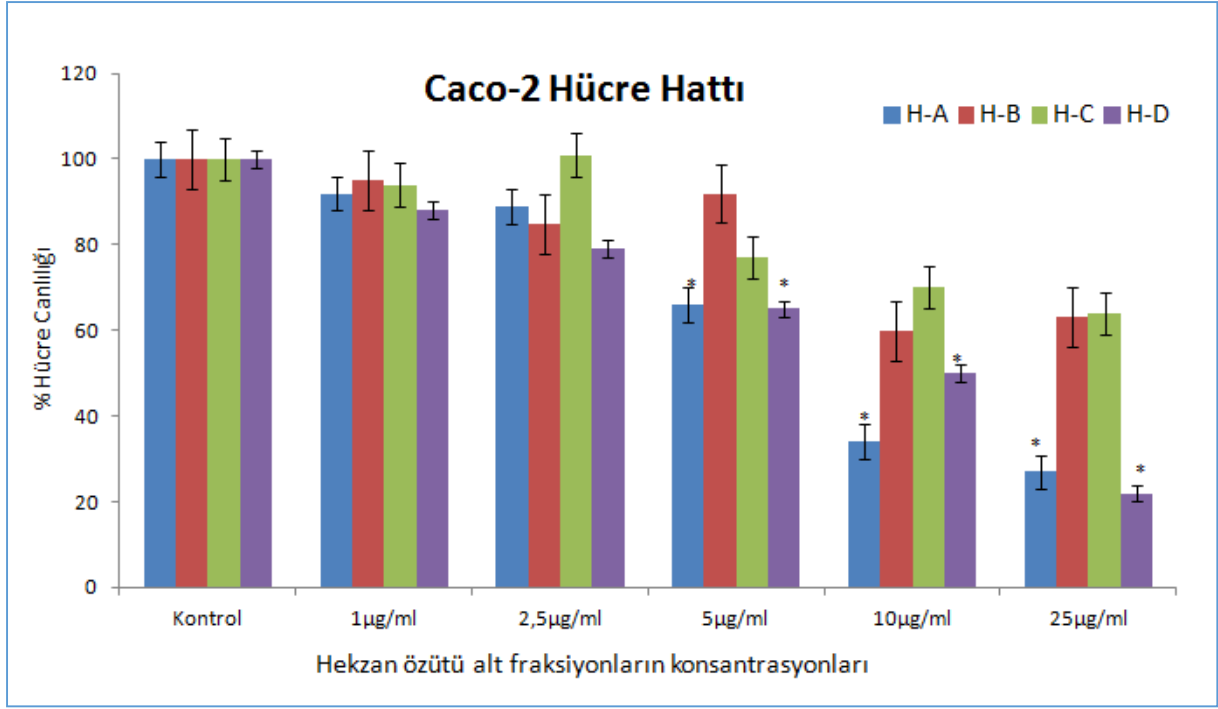
- **Hekzan Özütü Alt Fraksiyonlarının Sitotoksitesisi**

A549 hücre hattında ısırgan otu yapraklarının hekzan özütlünün A; B; C ve D olarak adlandırılan alt fraksiyonlarının sitotoksik etkileri Şekil 3.26'da verilmektedir. Sitotoksitesite sonuçlarından elde edilen değerlere göre LD50 değerleri sırasıyla, hekzan özütlünün; A fraksiyonu 21,86 µg/ml, B fraksiyonu 42,2 µg/ml, C fraksiyonu 67,37 µg/ml ve D fraksiyonu için 25,18 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, hekzan özütlünün A ve D fraksiyonlarının yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



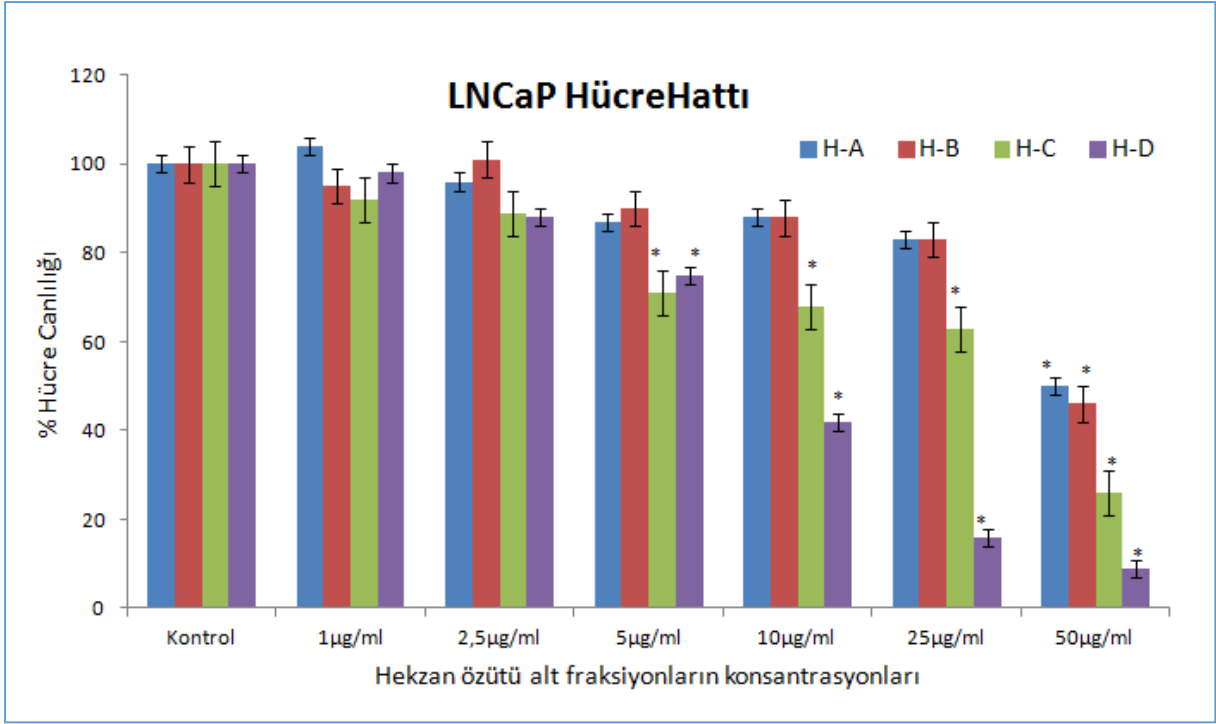
Şekil 3. 26. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının A549 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve hekzan özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

Aynı zamanda Caco-2 hücre hattında da ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Şekil 3.27). Sitotoksikite sonuçlarından elde edilen değerlere göre LD50 değerleri sırasıyla, hekzan özütünün; A fraksiyonu 10.7 µg/ml, B fraksiyonu 32.5 µg/ml, C fraksiyonu 35.3 µg/ml ve D fraksiyonu için 10.45 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, hekzan özütünün A ve D fraksiyonlarının yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 27. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının Caco-2 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve hekzan özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

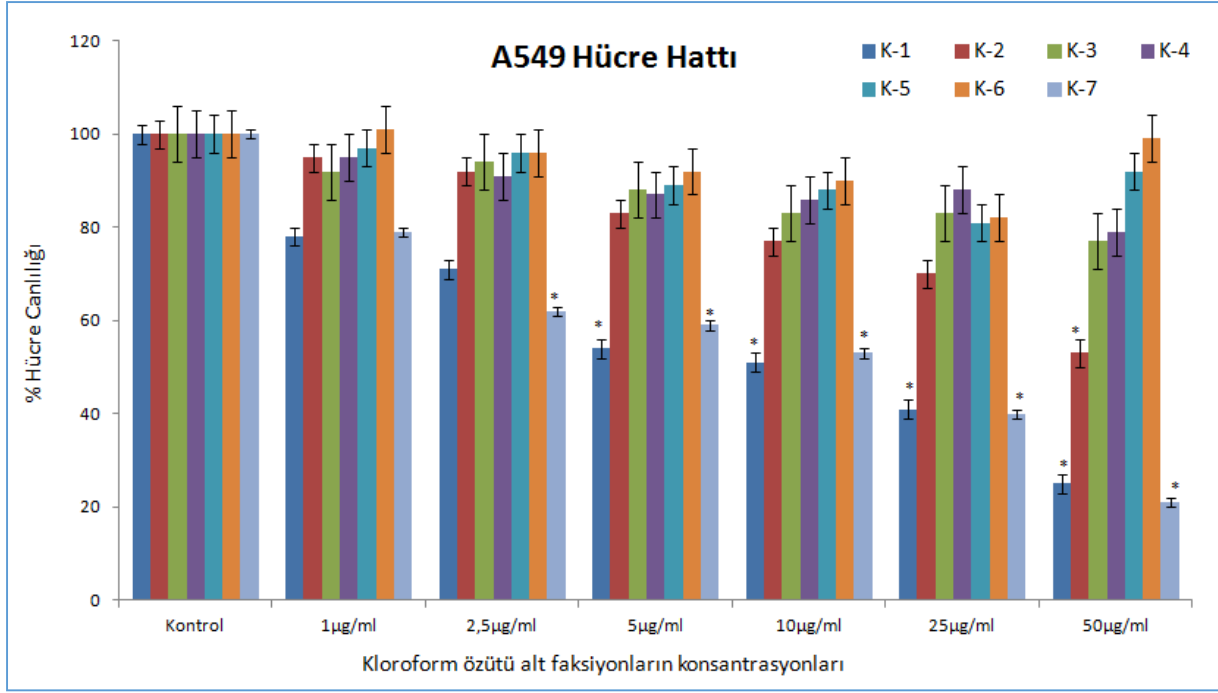
LNCaP hücre hattında ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının sitotoksik etkileride Şekil 3.28'de gösterilmektedir. Elde edilen verilere göre LD50 değerleri sırasıyla, hekzan özütünün; A fraksiyonu 53,30 µg/ml, B fraksiyonu 50,21 µg/ml, C fraksiyonu 25,83 µg/ml ve D fraksiyonu için 11,29 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, hekzan özütünün A ve D fraksiyonlarının yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 28. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün A; B; C ve D fraksiyonlarının LNCaP hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve hekzan özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

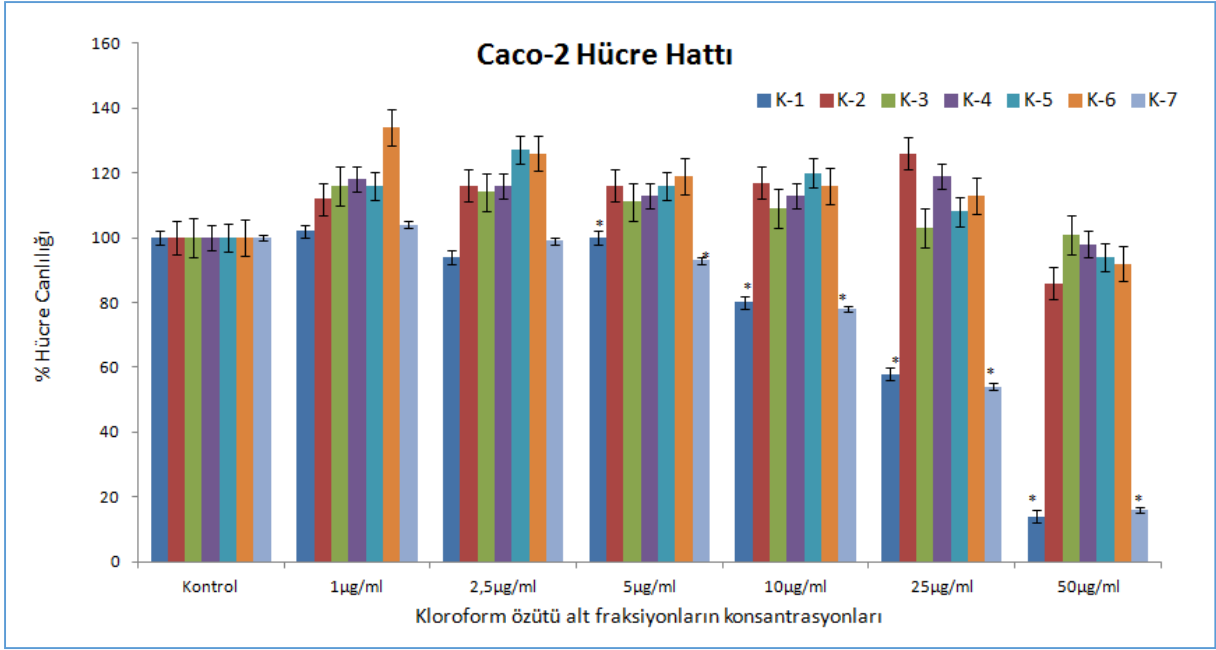
- **Kloroform Özütü Alt Fraksiyonlarının Sitotoksitesi**

Çalışma kapsamında A549 hücre hattında ısırgan otu yapraklarından elde edilen kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 olarak adlandırılan alt fraksiyonlarının sitotoksik etkileri Şekil 3.29'da verilmektedir. Sitotoksite sonuçlarından elde edilen verilere göre LD50 değerleri sırasıyla, kloroform özütünün; 1. fraksiyonu 17.6 µg/ml, 2. fraksiyonu 52 µg/ml, 3. fraksiyonu 154.75 µg/ml, 4. fraksiyonu 208 µg/ml, 5. fraksiyonu 313.5 µg/ml, 6. fraksiyonu 914.28 µg/ml ve 7. fraksiyonu için 16.07 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, kloroform özütünün 1 ve 7 numaralı fraksiyonlarının yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



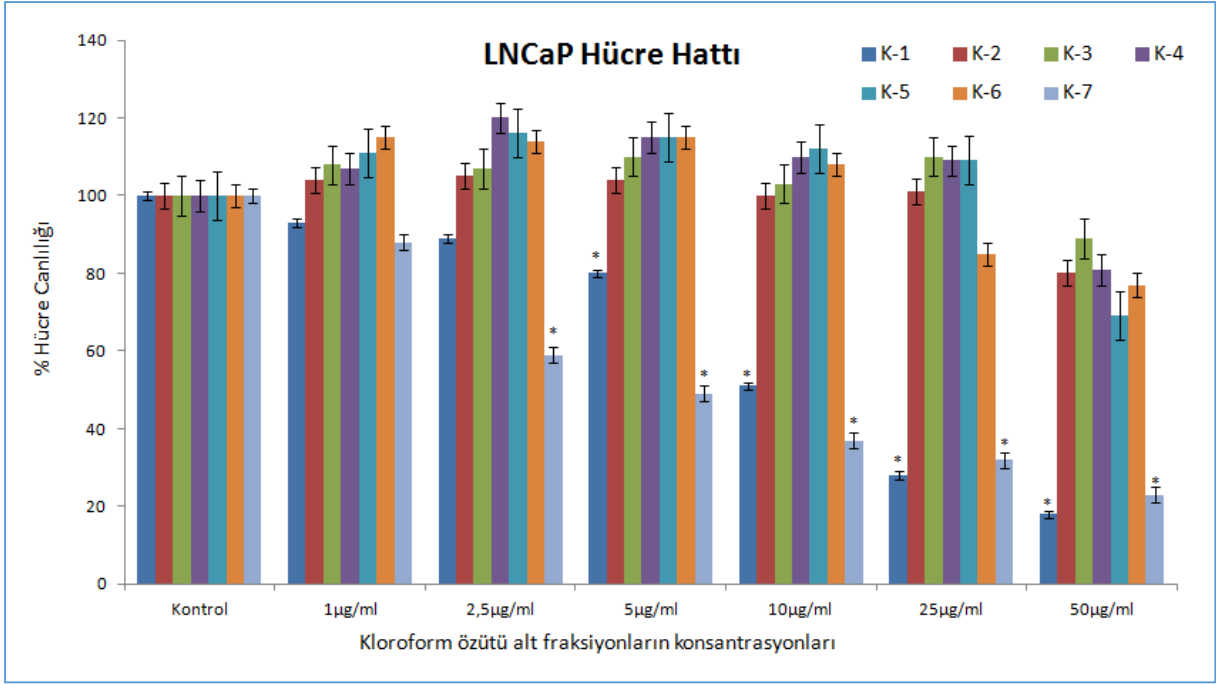
Şekil 3. 29. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının A549 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve kloroform özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

Caco-2 hücrelerinde ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 olarak adlandırılan alt fraksiyonlarının sitotoksik etkileri Şekil 3.30'da verilmektedir. Sitotoksikite sonuçlarından elde edilen verilere göre LD50 değerleri sırasıyla, kloroform özütünün; 1. fraksiyonu 20.15 µg/ml, 2. fraksiyon 209 µg/ml, 3. fraksiyonu 394 µg/ml, 4. fraksiyonu 409.5 µg/ml, 5. fraksiyonu 210.25 µg/ml, 6. fraksiyonu 176.6 µg/ml ve 7. fraksiyonu için 19.7 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, kloroform özütünün 1 ve 7 numaralı fraksiyonlarının yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 30. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının Caco-2 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve kloroform özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

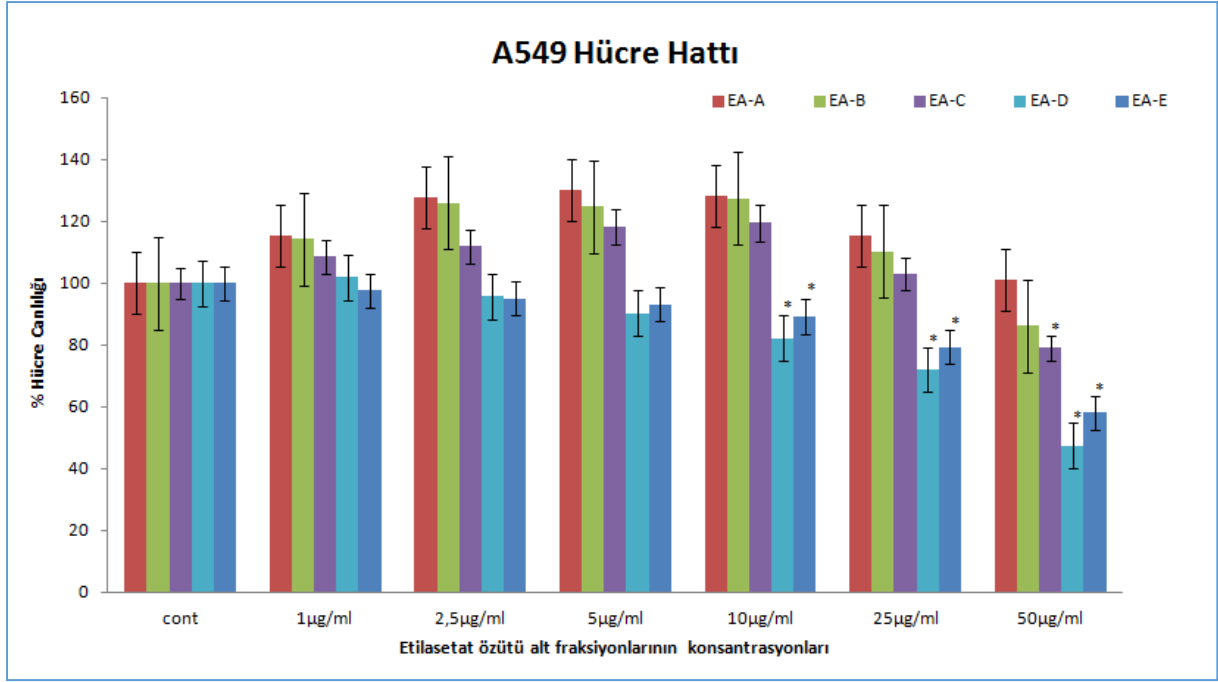
Son olarak ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının LNCaP hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri Şekil 3.31'de gösterilmektedir. Elde edilen verilere göre LD50 değerleri sırasıyla, kloroform özütünün; 1. fraksiyonu 16 µg/ml, 2. fraksiyonu 148,6 µg/ml, 3. fraksiyonu 256,6 µg/ml, 4. fraksiyonu 163 µg/ml, 5. fraksiyonu 105,12 µg/ml, 6. fraksiyonu 100,75 µg/ml ve 7. fraksiyonu için 12,28 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, kloroform özütünün 1 ve 7 numaralı fraksiyonlarının yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 31. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 fraksiyonlarının LNCaP hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve kloroform özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

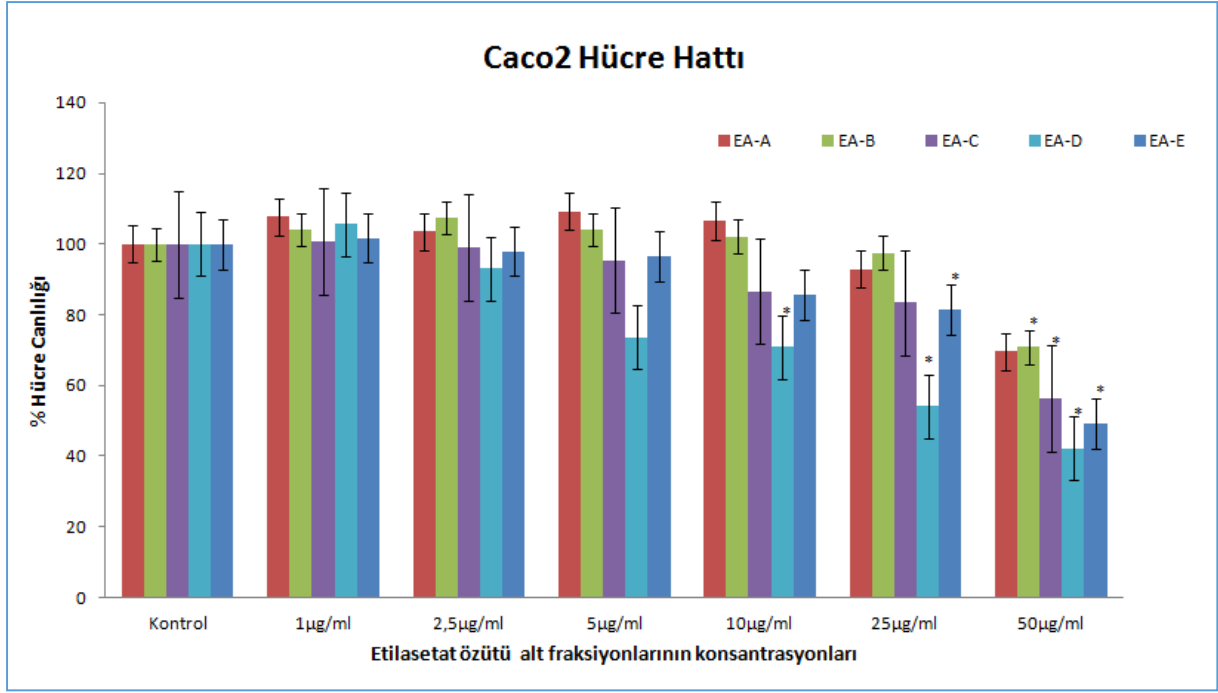
- **Etil Asetat Özütü Alt Fraksiyonlarının Sitotoksitesi**

A549 hücre hattında ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E olarak adlandırılan fraksiyonlarının sitotoksik etkileri Şekil 3.32'de verilmiştir. Sitotoksite sonuçlarından elde edilen verilere göre LD50 değerleri sırasıyla, etil asetat özütünün; A fraksiyonu 292 µg/ml, B fraksiyonu 145,8 µg/ml, C fraksiyonu 136,6 µg/ml, D fraksiyonu için 41,6 µg/ml ve E fraksiyonu için 58,1 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, etil asetat özütünün D ve E fraksiyonlarının A549 hücre hattında diğer fraksiyonlara göre yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



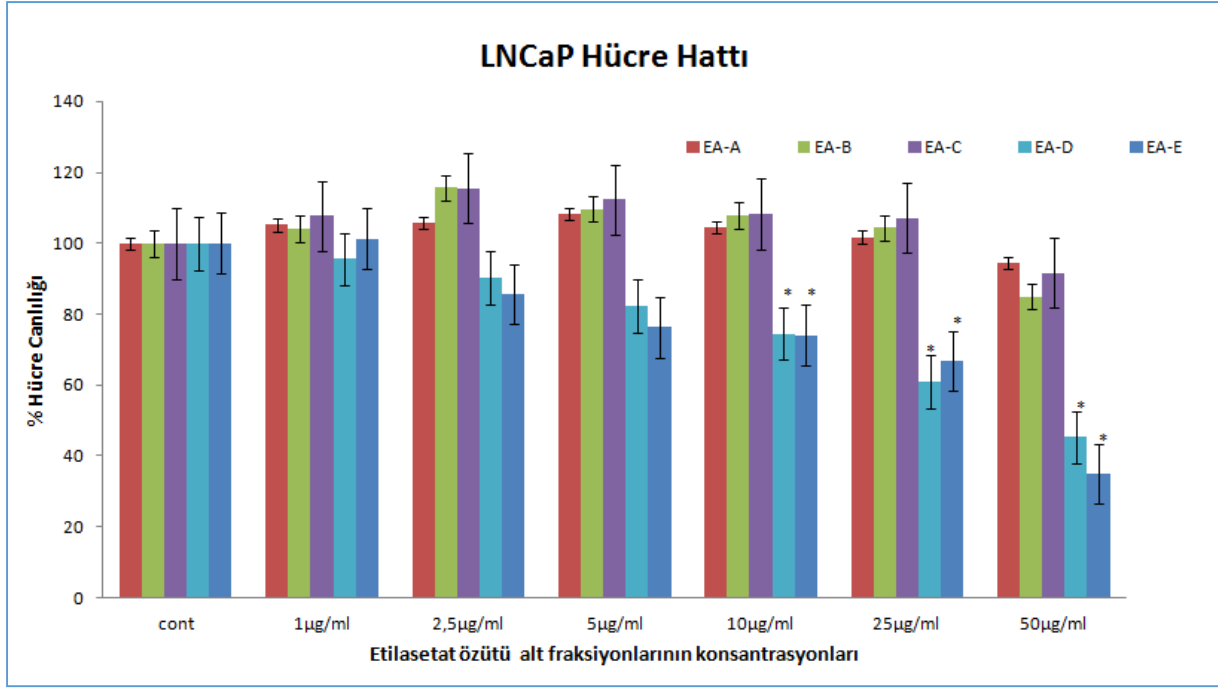
Şekil 3. 32. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının A549 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve etil asetat özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

A549 hücre hattında olduğu gibi ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının sitotoksik etkileri Caco-2 hücre hattında da belirlenmiştir (Şekil 3.33). Sitotoksikite sonuçlarından elde edilen verilere göre LD50 değerleri sırasıyla, etil asetat özütünün A fraksiyonu 96.6 µg/ml, B fraksiyonu 108.7 µg/ml, C fraksiyonu 63.6 µg/ml, D fraksiyonu için 31.4 µg/ml ve E fraksiyonu için 41.8 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, A549 hücre hattında olduğu gibi etil asetat özütünün D ve E fraksiyonlarının diğer fraksiyonlara göre Caco-2 hücre hattında yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 33. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özüütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının Caco-2 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve etil asetat özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

A549 ve Caco-2 kanser hücre hatlarının yanı sıra, ısırgan otu yapraklarının etil asetat özüütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının LNCaP hücre hattı üzerine sitotoksik etkileride bu dönemde belirlenmiş olup elde edilen sonuçlara göre LD50 değerleri sırasıyla, etil asetat özüütünün; A fraksiyonu 371,50 µg/ml, B fraksiyonu 195,2 µg/ml, C fraksiyonu 262,3 µg/ml, D fraksiyonu için 35,06 µg/ml ve E fraksiyonu için 33,2 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.34). Bu sonuçlar, LNCaP hücre hattında D ve E fraksiyonlarının diğer fraksiyonlara nazaran daha yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.

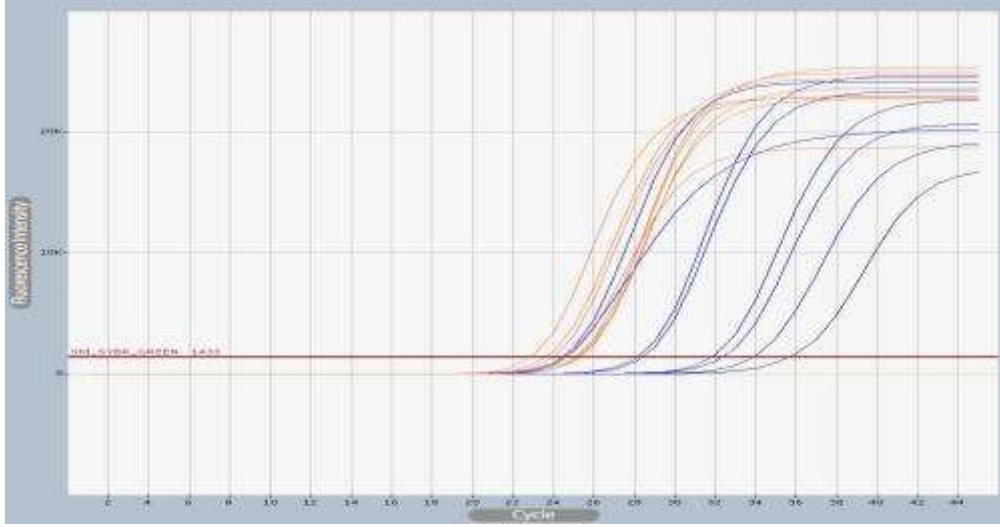


Şekil 3. 34. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün A; B; C; D ve E fraksiyonlarının LNCap hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve etil asetat özütü sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

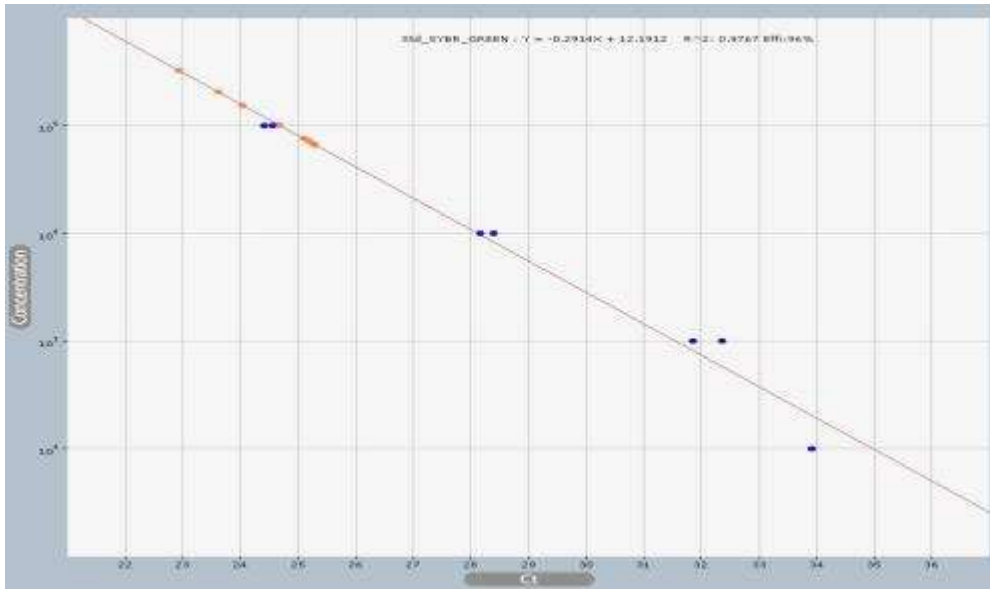
3.1.1.4 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR

Proje kapsamında tüm mRNA düzeyindeki ekspresyon analizleri laboratuvarımızda bulunan Bioneer marka Gerçek Zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir. Yapılan sitotoksitesite çalışmalarında hesaplanan LD50 konsantrasyonları A549, Caco-2 ve LNCap hücre hatlarına 24 saat boyunca uygulanmıştır. Bu zaman sonunda hücreler parçalama tamponu ile toplandı. 24 saat sonunda toplanan hücrelerden Total RNA izolasyonu TRIzol® solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve konsantrasyonları Nano Drop cihazında ölçüldü. Elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve AMV Reverse Transkriptaz (MBI Fermentas, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları Bioneer AccuPower® GreenStar qPCR premix Sybergreen kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre yapıldı. Primer ve cDNA miktarları laboratuvarımızda optimize edildi. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar Exicycler 3 Analiz Programı kullanılarak hesaplandı ve vekilharç gen olan (house keeping) ribozomal RNA'ya (18S) göre normalize edilmiştir. Her gen için ayrı ayrı

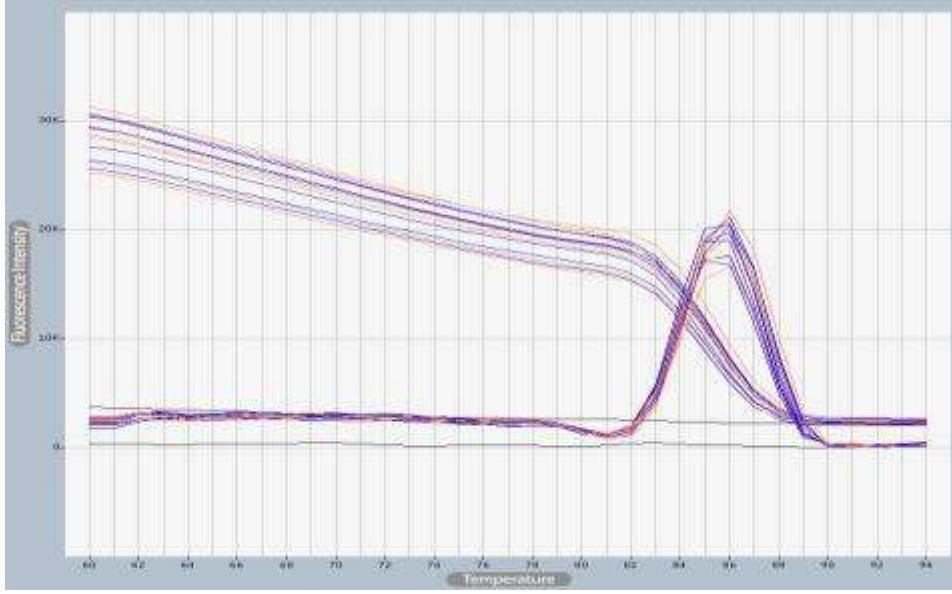
amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı (Şekil 3.35-3.37).



Şekil 3. 35. Amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3. 36. Standart kalibrasyon eğrisi.

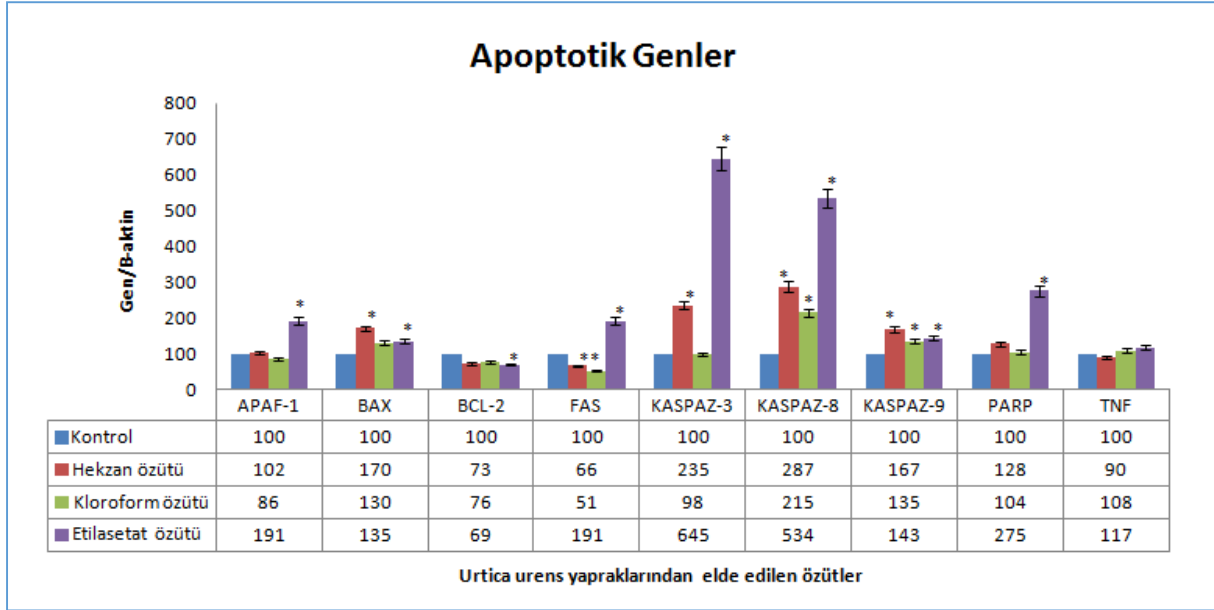


Şekil 3. 37. Erime eğrisi analizi.

3.1.1.4.1 A549 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

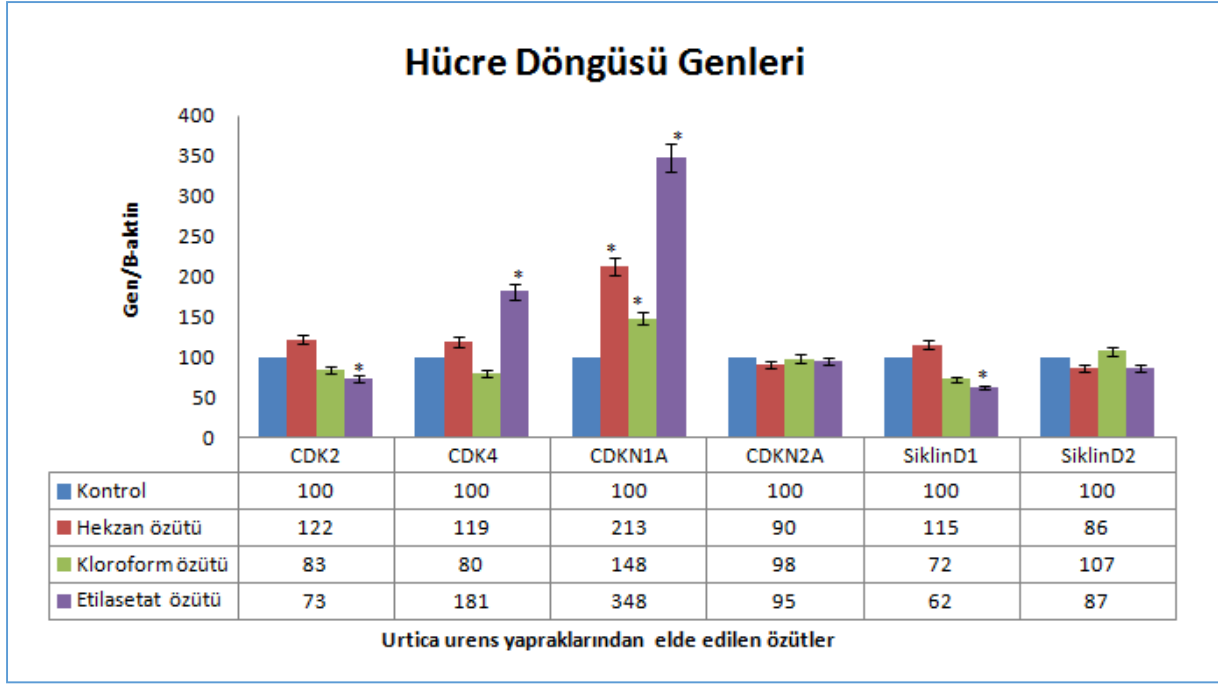
A549 hücre hattında apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; Kaspaz-3; Kaspaz-8; Kaspaz-9; PARP ve TNF genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan ve etil asetat uygulaması sonucunda APAF1 mRNA seviyesinde sırasıyla %2 ve %91 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %14 azalış gözlemlenmiştir. BAX geni içinse mRNA seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulanması sonucunda sırasıyla %70, %30 ve %35 artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık BCL2 geninde ise hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda mRNA seviyesinde sırasıyla %27; %24 ve %31 azalma gözlemlenmiştir. FAS mRNA seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %34 ve %49 azalış gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında ise %91 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-3 mRNA seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %135 ve %545 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Kaspaz-8 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %187; %115 ve %434 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-9 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %67; %35 ve %43 artış elde edilmiştir. PARP mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %28; %4 ve %175 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da TNF mRNA seviyesinde de kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %8 ve %17 artış gözlemlenirken; hekzan uygulamasında ise %10 azalış gözlemlenmiştir (Şekil 3.38). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens*

özütlerinin apoptoz mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



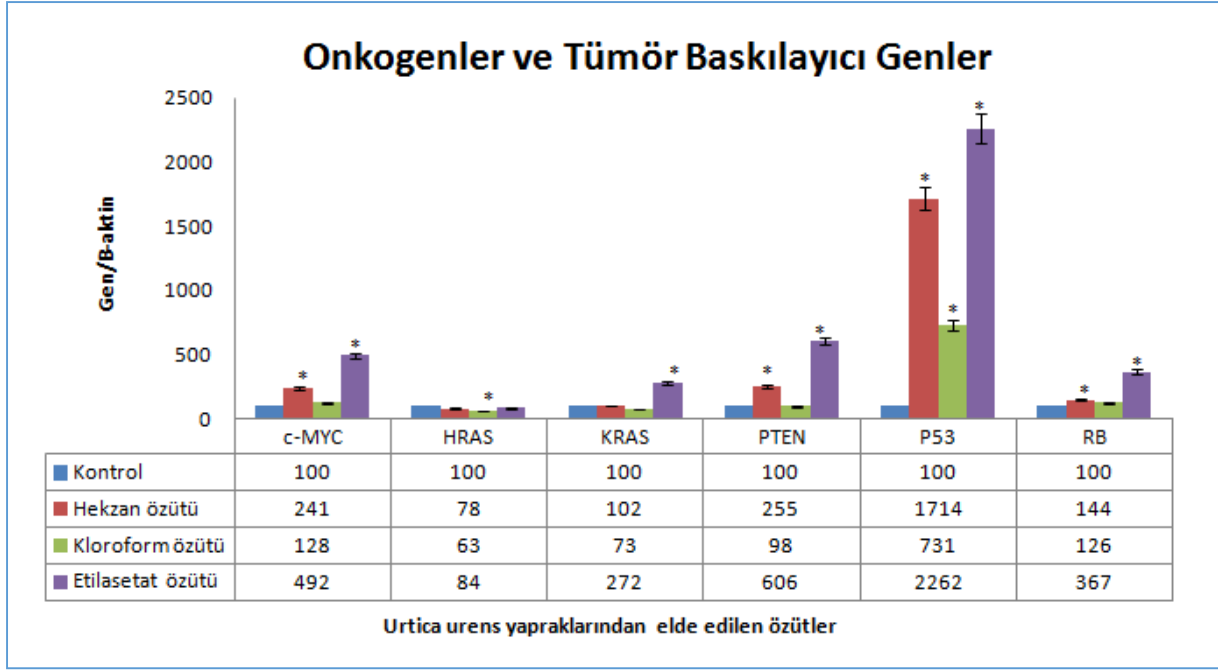
Şekil 3. 38. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Bunlara ek olarak, A549 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A; SiklinD1 ve SiklinD2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda CDK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %17 ve %27 azalış gözlemlenirken; hekzan uygulamasında ise %22 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan ve etilasetat özütleri uygulaması sonucunda CDK4 mRNA seviyesinde sırasıyla %19 ve %81 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %20 azalış elde edilmiştir. CDKN1A mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %113; %48 ve %248 artış elde edilmiştir. Buna karşılık CDKN2A mRNA seviyesinde hekzan kloroform ve etilasetat özütleri ile muamele sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim olmamıştır. SiklinD1 mRNA seviyesinde de kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %28 ve %38 azalış gözlemlenirken; hekzan uygulamasında %15 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da SiklinD2 mRNA seviyesinde hekzan ve etilasetat uygulamasında sırasıyla %14 ve %13 azalış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %7 artış gözlemlendi (Şekil 3.39). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) hücrelerin bölünmesinin engelleyebileceği düşünülmektedir.



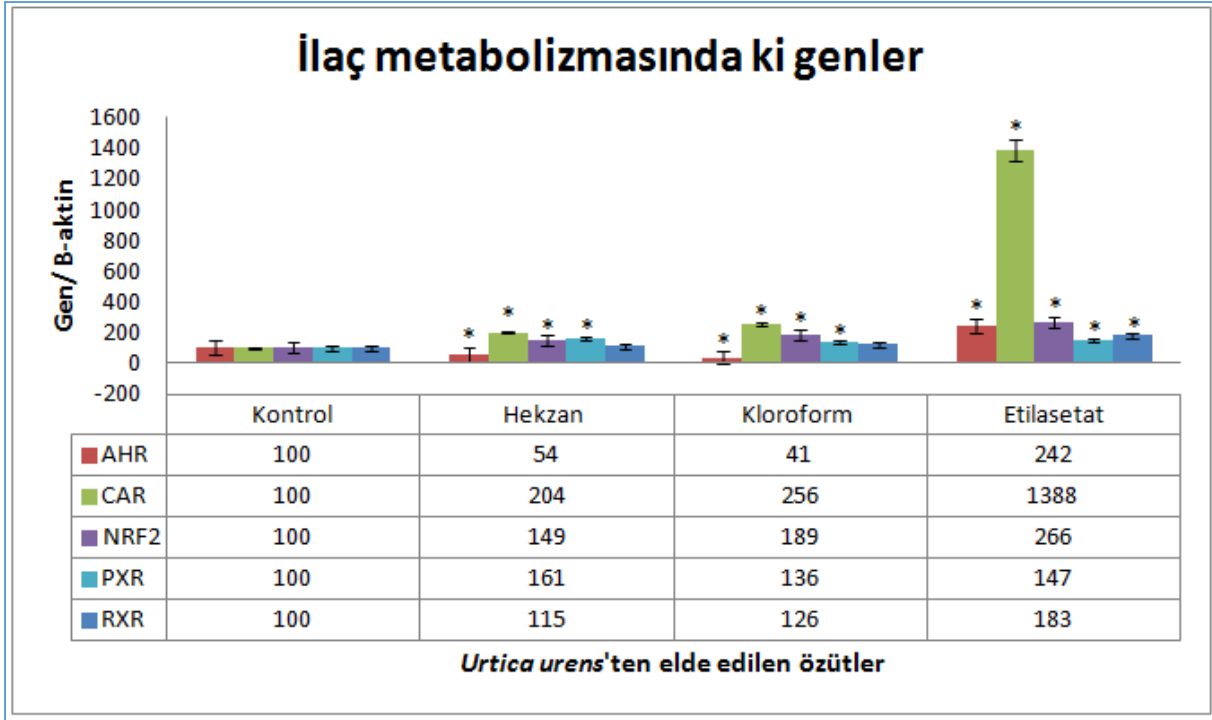
Şekil 3. 39. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında hücre döngüsünde rol alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak görev alan c-MYC; HRAS; KRAS; PTEN; P53 ve RB genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. A549 hücre hattında hekzan; kloroform ve etilasetat uygulaması sonucunda c-MYC mRNA seviyesinde sırasıyla %141; %28 ve %392 artış gözlemlenmiştir. HRAS mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etilasetat uygulamasında sırasıyla %22; %37 ve %16 azalış elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan ve etilasetat özütleri uygulaması sonucunda KRAS mRNA seviyesinde sırasıyla %2 ve %172 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %27 azalış gözlemlenmiştir. Ayrıca hekzan ve etilasetat özütleri PTEN mRNA seviyesinde sırasıyla %155 ve %506 artışa sebep olurken, kloroform özütü ile muamele edilmiş hücrelerde bir değişime rastlanmamıştır. Hekzan, kloroform ve etilasetat uygulanması P53 mRNA seviyesinde ise sırasıyla %1614, %631 ve %2162 artışa sebep olmuştur. Tüm bunlara ek olarak da RB mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etilasetat uygulamasında sırasıyla %44; %26 ve %267 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.40).



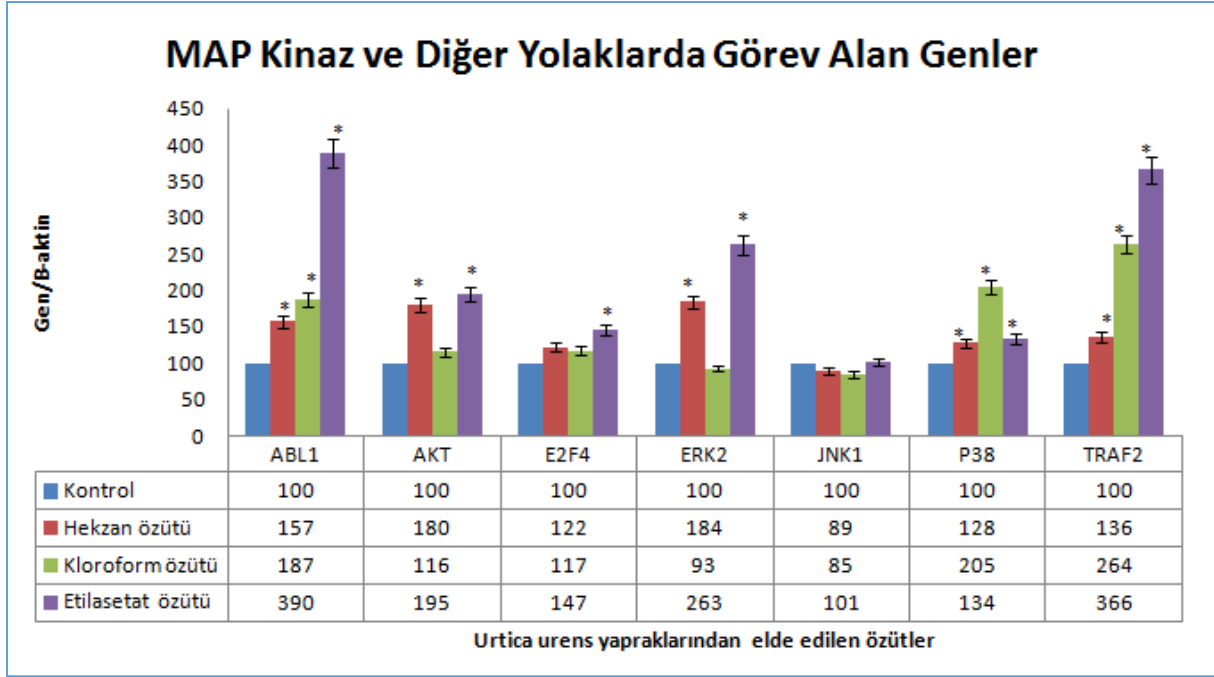
Şekil 3. 40. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında onkogen ve tümör baskılayıcı bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; NRF2; PXR ve RXR genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. A549 hücre hattında hekzan ve kloroform uygulaması sonucunda AHR mRNA seviyesinde sırasıyla %46 ve %59 azalış gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında %142 artış saptanmıştır. CAR mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etilasetat uygulamasında sırasıyla %104; %156 ve %1288 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri NRF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %49; %89 ve %166 artış gözlemlenmiştir. PXR mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %61; %36 ve %47 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RXR mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %15; %26 ve %83 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.41).



Şekil 3. 41. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında MAP kinaz yolağı ve diğer yollarda görev alan ABL1; AKT; E2F4; ERK2; JNK1 ve P38 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. A549 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda ABL1 mRNA seviyesinde sırasıyla %57; %87 ve %290 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde AKT mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %80; %16 ve %95 artış gözlemlenmiştir. Hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda E2F4 mRNA seviyesinde sırasıyla %22; %17 ve %47 artış gözlemlenmiştir. Hekzan ve etilasetat özütleri uygulaması sonucunda ERK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %84 ve %163 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %7 azalma gözlemlenmiştir. A549 hücre hattında hekzan ve kloroform uygulaması sonucunda JNK1 mRNA seviyesinde sırasıyla %11 ve %15 azalış gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. P38 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etilasetat uygulamasında sırasıyla %28; %105 ve %34 artış elde edilmiştir (Şekil 3.42).



Şekil 3. 42. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında MAP Kinaz yolağı ve diğer yolaklarda görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

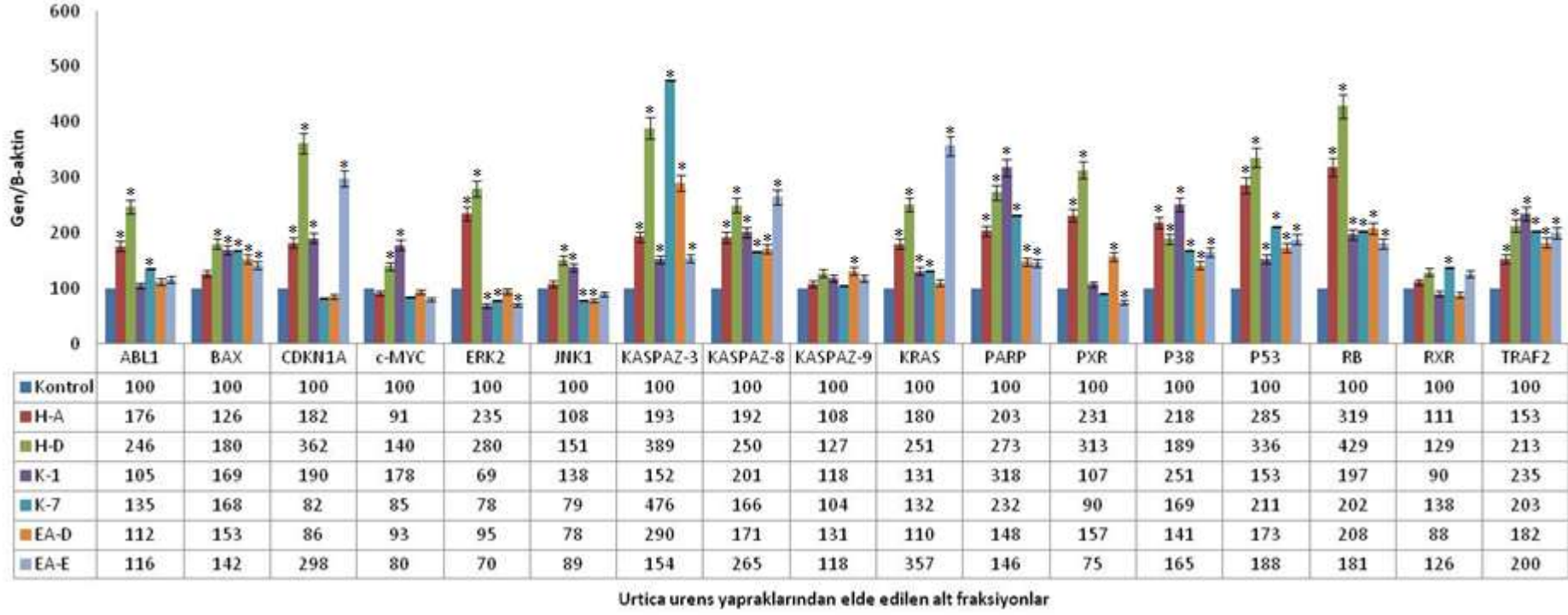
- **Hekzan, Kloroform ve Etil Asetat Aktif Alt Fraksiyonlarının mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi**

A549 hücre hattında birçok yolkakta rol alan ABL1; BAX; CDKN1A; c-MYC; ERK2; JNK1; KASPAZ-3; KASPAZ-8; KASPAZ-9; KRAS; PARP; PXR; P38; P53; RB; RXR ve TRAF2 genlerinin hekzan özütünde anlamlı sitotoksik etki gösteren H-A ile H-D; kloroform içinse K-1 ile K-7 ve etil asetat içinse de EA-D ile EA-E aktif alt fraksiyonların uygulaması sonrasında mRNA seviyesinde meydana gelen değışimlere bakılmıştır. ABL1 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D ve K-7 uygulaması sonucunda sırasıyla %76, %146 ve %35 artış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değışim saptanmamıştır. BAX geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %26; %80; %69; %68; %53 ve %42 artış elde edilmiştir. CDKN1A geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1 ve EA-E uygulaması sonucunda sırasıyla %82, %262, %90 ve %198 artış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı bir değışim saptanmamıştır. Benzer şekilde c-MYC geninin mRNA seviyesinde H-D ve K-1 uygulaması sonucunda sırasıyla %40 ve %78 artış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı bir değışim saptanmamıştır. ERK2 geninin mRNA seviyesinde H-A ve H-D uygulaması sonucunda sırasıyla %135 ve %180 artış elde edilirken, K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulamaları sonucunda %31; %22; %5 ve %30 azalış elde edilmiştir. Benzer şekilde JNK1 geninin mRNA



seviyesinde H-A; H-D ve K-1 uygulaması sonucunda sırasıyla %8; %51 ve %38 artış elde edilirken, K-7; EA-D ve EA-E uygulamaları sonucunda %21; %22 ve %11 azalış elde edilmiştir. Kaspaz-3 geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %93; %289; %52; %376; %190 ve %54 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde Kaspaz-8 geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %92; %150; %101; %66; %71 ve %165 artış elde edilmiştir. Kaspaz-9 geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %8; %27; %18; %4; %31 ve %18 artış elde edilmiştir. KRAS geninde mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %80; %151; %31; %32; %10 ve %257 artış elde edilmiştir. Diğer bir önemli gen olan PARP geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %103; %173; %218; %132; %48 ve %46 artış saptanmıştır. PXR geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1 ve EA-D uygulaması sonucunda sırasıyla %131; %213; %7 ve %57 artış elde edilirken, K-7 ve EA-E uygulamaları sonucunda %10 ve %25 azalış elde edilmiştir. P38 geninde mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %118; %89; %151; %69; %41 ve %65 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde P53 geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %118; %89; %151; %69; %41 ve %65 artış saptanmıştır. RB geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %219; %329; %97; %102; %108 ve %81 artış elde edilmiştir. RXR geninin mRNA seviyesinde H-D; K-7 ve EA-E uygulaması sonucunda sırasıyla %29; %38 ve %26 artış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Son olarak TRAF2 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %53; %113; %135; %103; %82 ve %100 artış elde edilmiştir (Şekil 3.43).

A549 Hücre Hattı

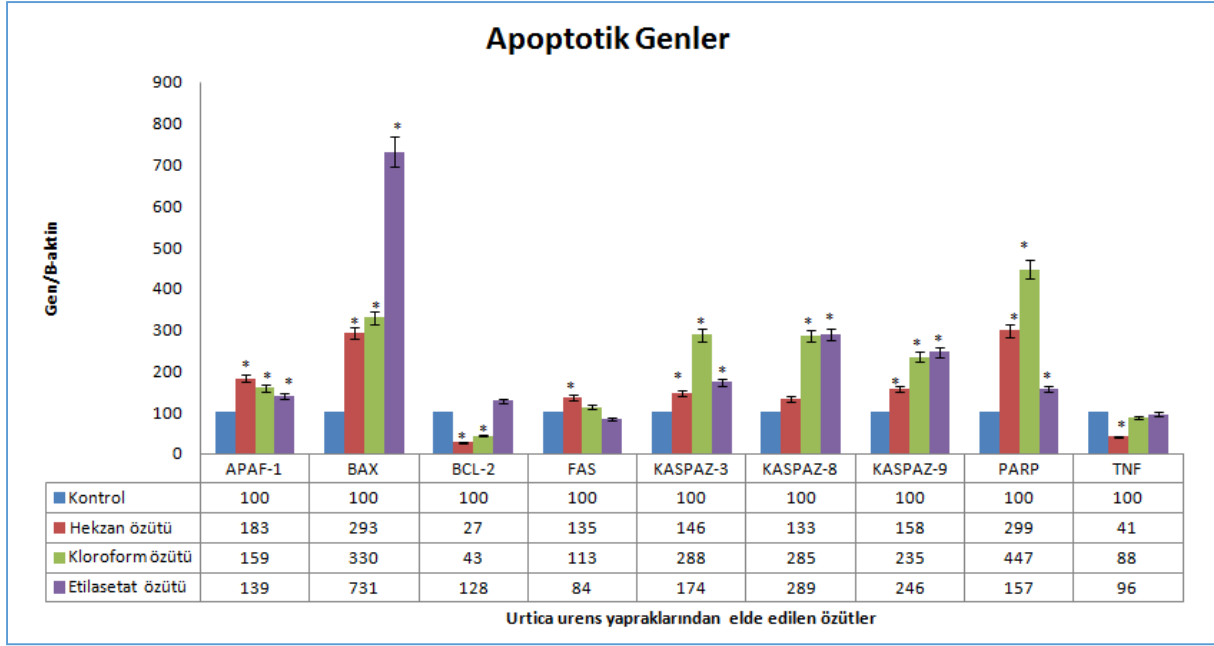


Şekil 3. 43. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütü aktif alt fraksiyonlarının insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında birçok yolakta rol alan önemli genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). H-A: Hekzan özütü A alt fraksiyonu; H-D: Hekzan özütü D alt fraksiyonu; K-1: Kloroform özütü 1 alt fraksiyonu; K-7: Kloroform özütü 7 alt fraksiyonu; EA-D: Etil asetat özütü D alt fraksiyonu; EA-E: Etil asetat özütü E alt fraksiyonu.



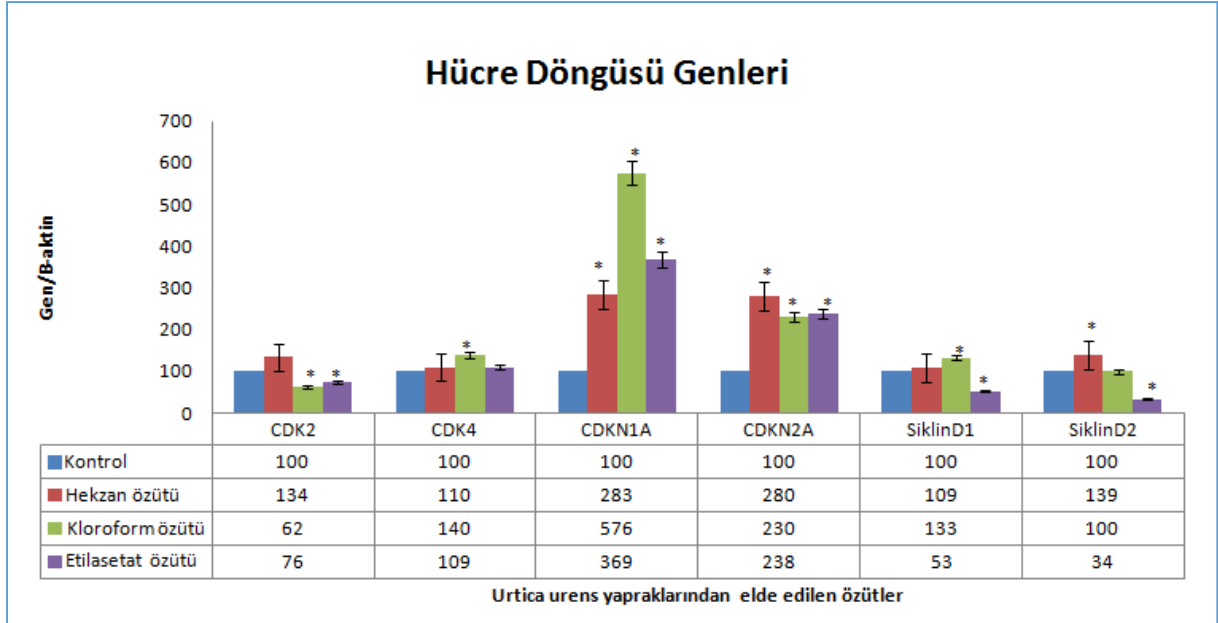
3.1.1.4.2 Caco2 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

İnsan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; Kaspaz3; Kaspaz8; Kaspaz9; PARP ve TNF genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlerine bakıldı. Caco-2 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda APAF1 mRNA seviyesinde sırasıyla %83; %59 ve %39 artış gözlemlendi. BAX mRNA seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulanması sonucunda sırasıyla %193, %230 ve %631 artış gözlemlenmiştir. Hekzan ve kloroform özütlerinde BCL2 mRNA seviyesinde ise sırasıyla %73 ve %57 azalma gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında %28 artış gözlemlendi. FAS mRNA seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %35 ve %13 artış gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında ise %16 azalış gözlemlendi. Kaspaz-3 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %46; %188 ve %74 artış gözlemlendi. Kaspaz-8 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %33; %185 ve %189 artış gözlemlendi. Kaspaz-9 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %58; %135 ve %146 artış gözlemlendi. PARP mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %199; %347 ve %57 artış gözlemlendi Tüm bunlara ek olarak da TNF mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %59; %12 ve %4 azalış gözlemlendi. (Şekil 3.44). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin apoptoz mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



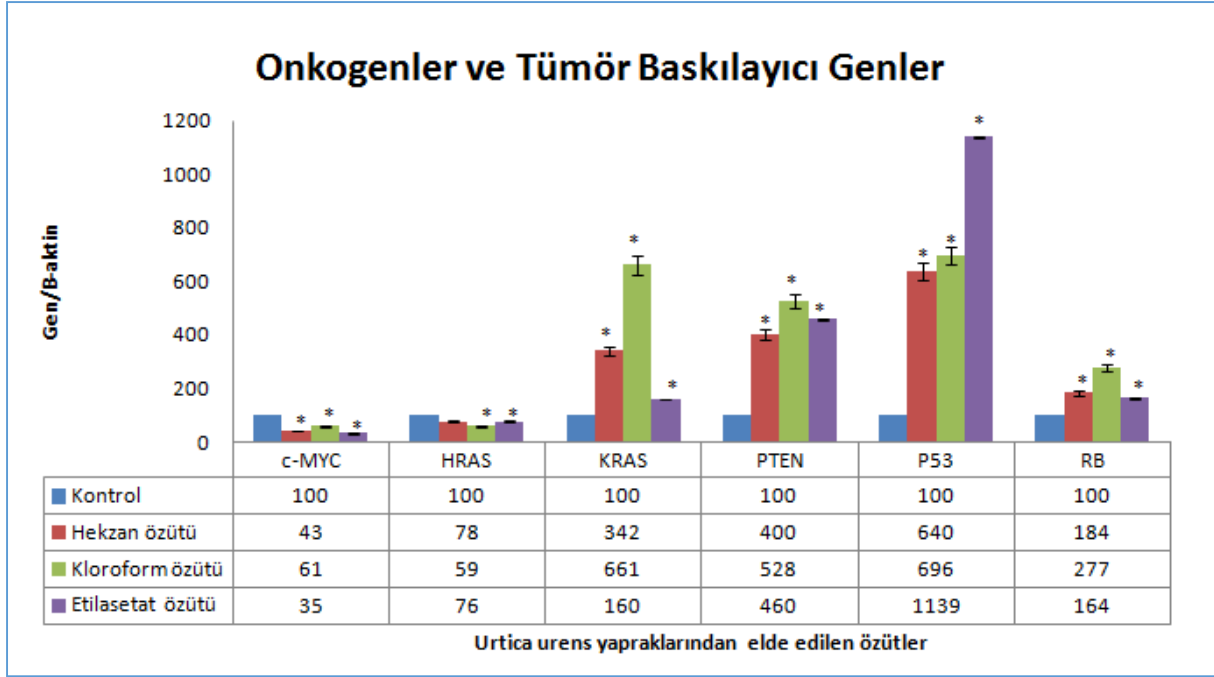
Şekil 3. 44. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A; SiklinD1 ve SiklinD2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco2 hücre hattında kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda CDK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %38 ve %24 azalış gözlemlenirken; hekzan uygulamasında ise %34 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda CDK4 mRNA seviyesinde sırasıyla %10; %40 ve %9 artış elde edilmiştir. CDKN1A mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %183; %476 ve %269 artış elde edilmiştir. CDKN2A mRNA seviyesinde ise hekzan kloroform ve etilasetat özütleri ile muamele sonucunda %180, %130 ve %138 artış gözlemlenmiştir. SiklinD1 mRNA seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %9 ve %33 artış gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında %47 azalış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da SiklinD2 mRNA seviyesinde hekzan uygulamasında %39 artış; etil asetat uygulamasında %66 azalış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 3.45). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



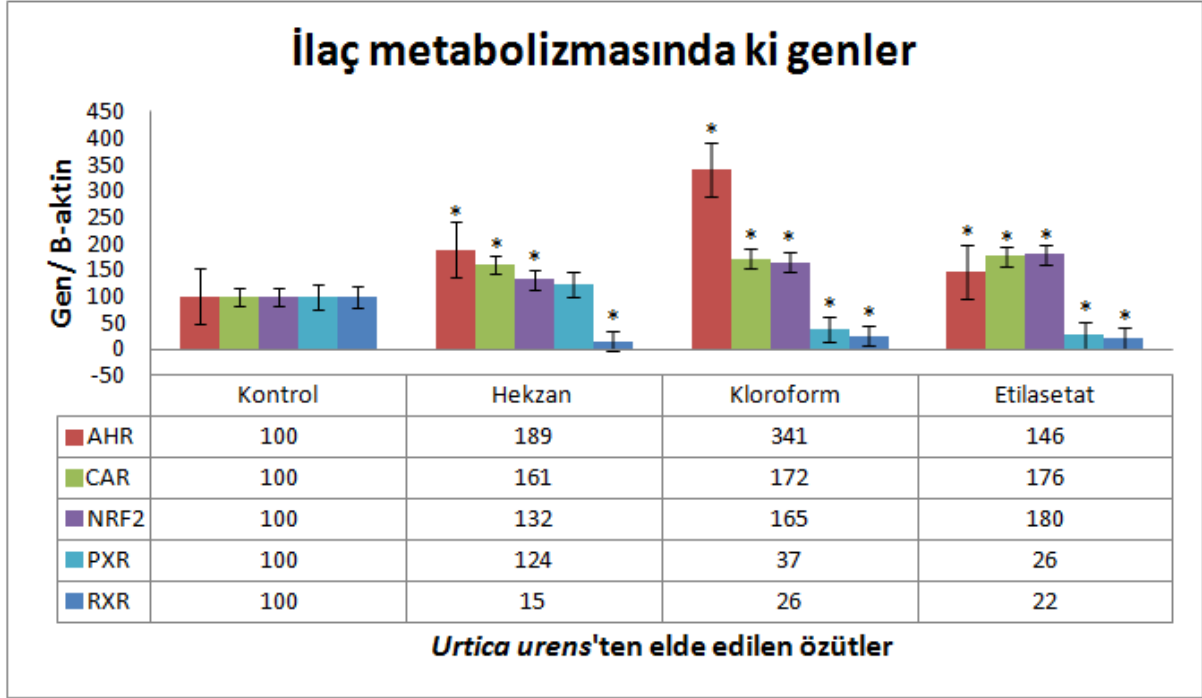
Şekil 3. 45. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında hücre döngüsünde görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattında onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak görev alan c-MYC; HRAS; KRAS; PTEN ve RB genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco2 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda c-MYC mRNA seviyesinde sırasıyla %57; %39 ve %65 azalma gözlemlenmiştir. HRAS mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %22; %41 ve %24 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri KRAS mRNA seviyesinde sırasıyla %242; %561 ve %60 artış elde edilmiştir. Ayrıca PTEN mRNA seviyesinde hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinde sırasıyla %300, %428 ve %360 artışa sebep olmuştur. Benzer şekilde hekzan, kloroform ve etilasetat uygulanması sonucunda p53 mRNA seviyesinde sırasıyla %540, %596 ve %1039 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RB mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %84; %177 ve %64 artış elde edilmiştir (Şekil 3.46).



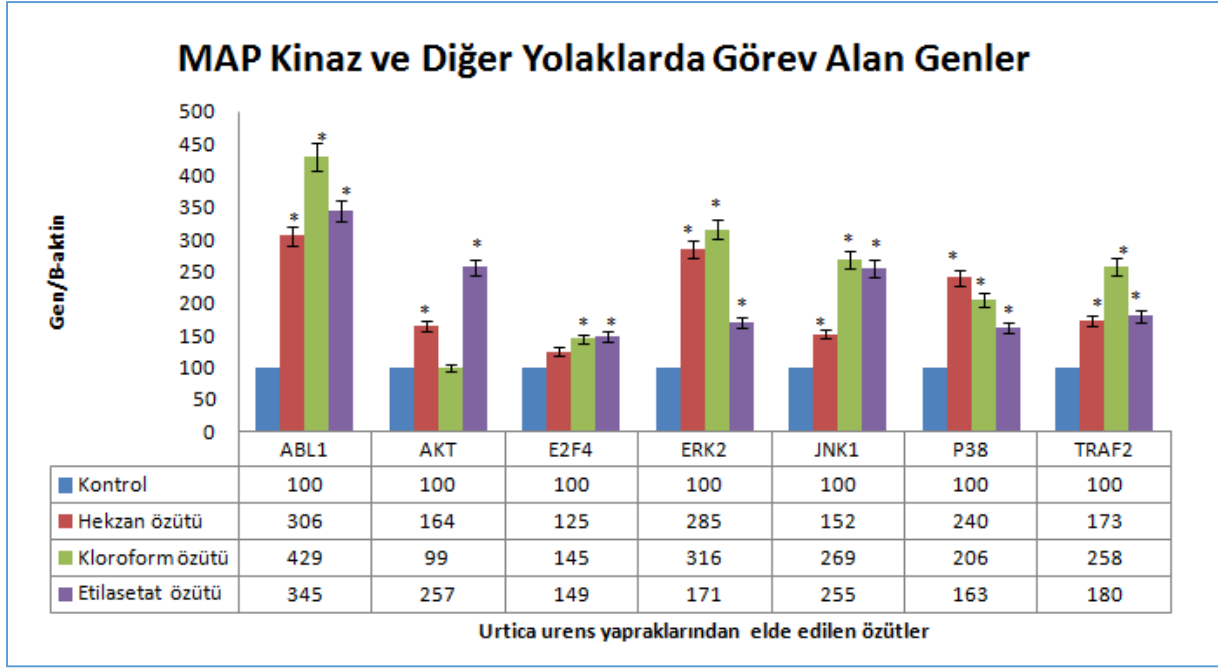
Şekil 3. 46. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında onkogen ve tümör baskılayıcı bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; NRF2; PXR ve RXR genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco2 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda AHR mRNA seviyesinde sırasıyla %89; %241 ve %46 artış gözlemlenmiştir. CAR mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %61; %72 ve %76 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri NRF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %32; %65 ve %80 artış elde edilmiştir. PXR mRNA seviyesinde de kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %63 ve %74 azalma gözlemlenirken; hekzan uygulamasında %24 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RXR mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %85; %74 ve %78 azalma saptanmıştır (Şekil 3.42).



Şekil 3. 47. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) ilaç metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattında MAP kinaz yolağı ve diğer yollarda görev alan ABL1; AKT; E2F4; ERK2; JNK1; P38 ve TRAF2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco-2 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda ABL1 mRNA seviyesinde sırasıyla %206; %329 ve %245 artış gözlemlenmiştir. AKT mRNA seviyesinde de hekzan ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %64 ve %157 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda E2F4 mRNA seviyesinde sırasıyla %25; %45 ve %49 artış saptanmıştır. Hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda ERK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %185; %216 ve %71 artış gözlemlenmiştir. JNK1 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %52; %169 ve %155 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri P38 mRNA seviyesinde sırasıyla %140; %106 ve %63 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da TRAF2 mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %73; %158 ve %80 artış elde edilmiştir (Şekil 3.48).



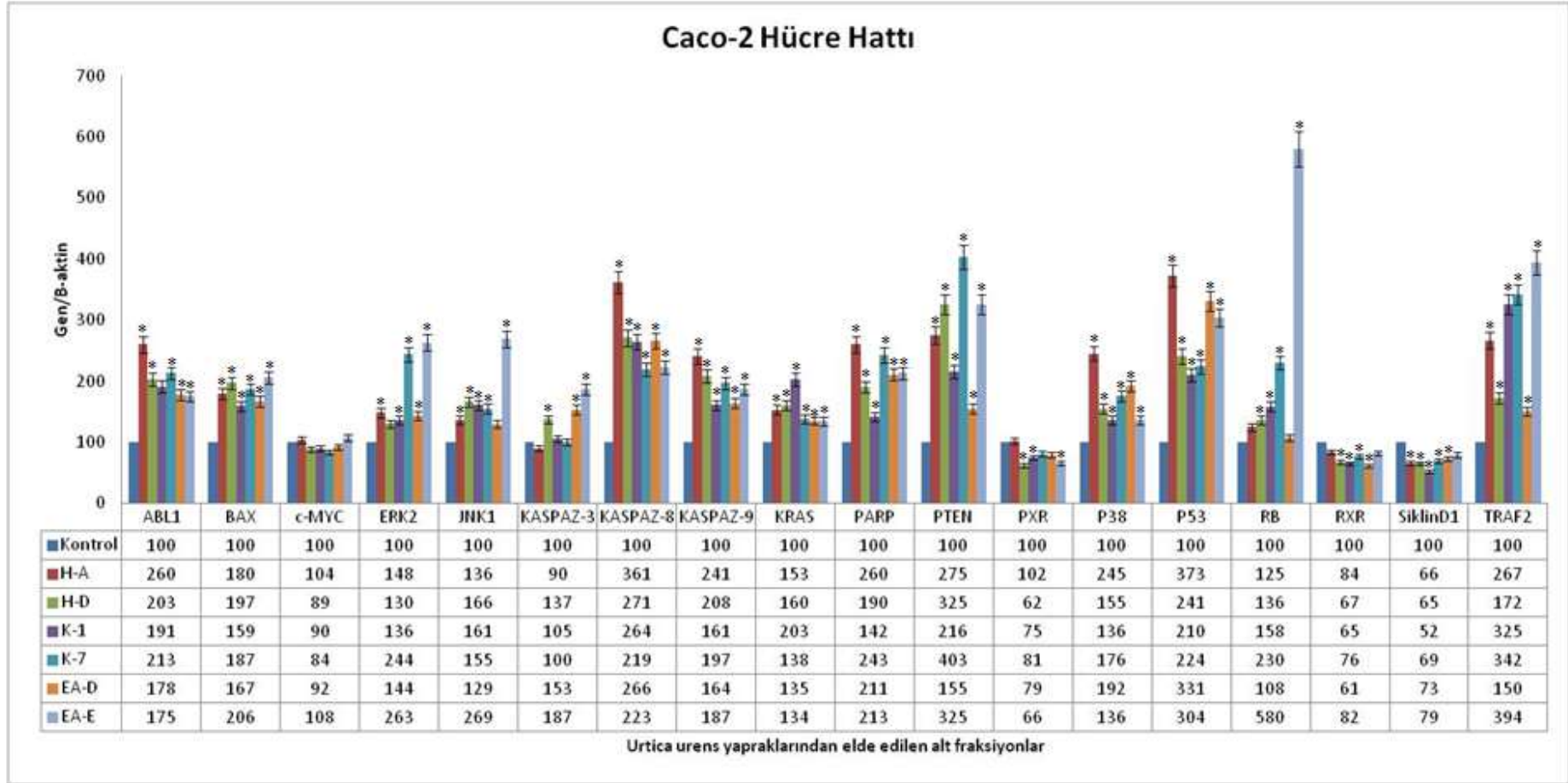
Şekil 3. 48. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında MAP Kinaz yolağı ve diğer yolaklarda görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

- **Hekzan, Kloroform ve Etil Asetat Aktif Alt Fraksiyonlarının mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi**

Caco-2 hücre hattında birçok yoklata rol alan ABL1; BAX; CDKN1A; c-MYC; ERK2; JNK1; KASPAZ-3; KASPAZ-8; KASPAZ-9; KRAS; PARP; PTEN; PXR; P38; P53; RB; RXR; SiklinD1 ve TRAF2 genlerinin hekzan özütünde anlamlı sitotoksik etki gösteren H-A ile H-D; kloroform içinse K-1 ile K-7 ve etil asetat içinse de EA-D ile EA-E aktif alt fraksiyonların uygulaması sonrasında mRNA seviyesinde meydana gelen değişimlere bakılmıştır. ABL1 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %160; %103; %91; %113; %78 ve %75 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde BAX geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %80; %97; %59; %87; %67 ve %106 artış elde saptanmıştır. c-MYC geninin mRNA seviyesinde ise özüt uygulamaları sonucunda herhangi bir anlamlı değişim elde edilememiştir. ERK2 geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %48; %30; %36; %144; %44 ve %163 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde JNK1 geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %36; %66; %61; %55; %29 ve %169 artış elde saptanmıştır. KASPAZ-3 geninin mRNA seviyesinde H-D; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %37; %53 ve %87 artış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. KASPAZ-8 geninde ise H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-



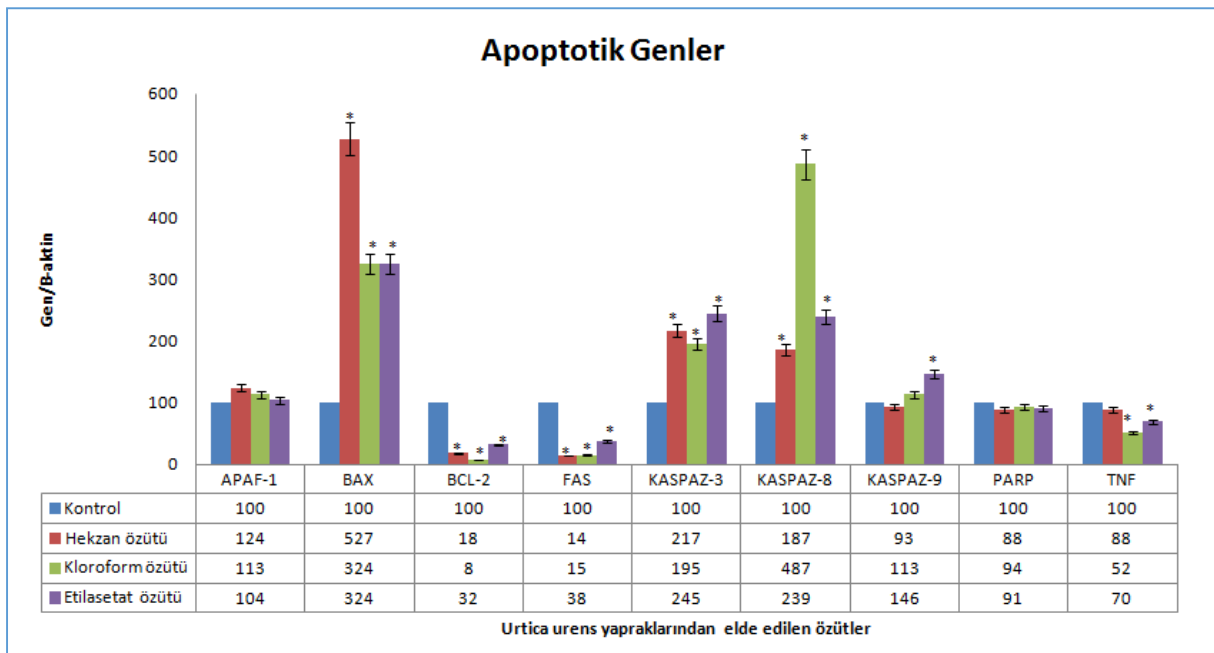
E uygulaması sonrasında sırasıyla %261; %171; %164; %119; %166 ve %123 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde KAZPAZ-9 geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %141; %108; %61; %97; %64 ve %87 artış saptanmıştır. KRAS geninde mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %53; %60; %103; %38; %35 ve %34 artış elde edilmiştir. PARP geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %160; %90; %42; %143; %111 ve %113 artış saptanmıştır. Diğer bir önemli gen olan PTEN geninin de mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %175; %225; %116; %303; %55 ve %225 artış elde edilmiştir. PXR geninin mRNA seviyesinde H-D; K-1 ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %38; %25 ve %34 azalış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. P38 geninde mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %145; %55; %36; %76; %92 ve %36 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde P53 geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %273; %141; %110; %124; %231 ve %204 artış saptanmıştır. RB geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %25; %36; %58; %130; %8 ve %480 artış elde edilmiştir. PXR geninin mRNA seviyesinde H-D; K-1 ve EA-D uygulaması sonrasında sırasıyla %33; %35 ve %39 azalış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. SiklinD1 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %34; %35; %48; %31; %27 ve %21 azalış saptanmıştır. Son olarak TRAF2 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %167; %72; %225; %242; %50 ve %294 artış elde edilmiştir (Şekil 3.49).



Şekil 3. 49. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütü aktif alt fraksiyonlarının insan kolon kanseri hücre (Caco2) hattında birçok yolakta rol alan önemli genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). H-A: Hekzan özütü A alt fraksiyonu; H-D: Hekzan özütü D alt fraksiyonu; K-1: Kloroform özütü 1 alt fraksiyonu; K-7: Kloroform özütü 7 alt fraksiyonu; EA-D: Etil asetat özütü D alt fraksiyonu; EA-E: Etil asetat özütü E alt fraksiyonu.

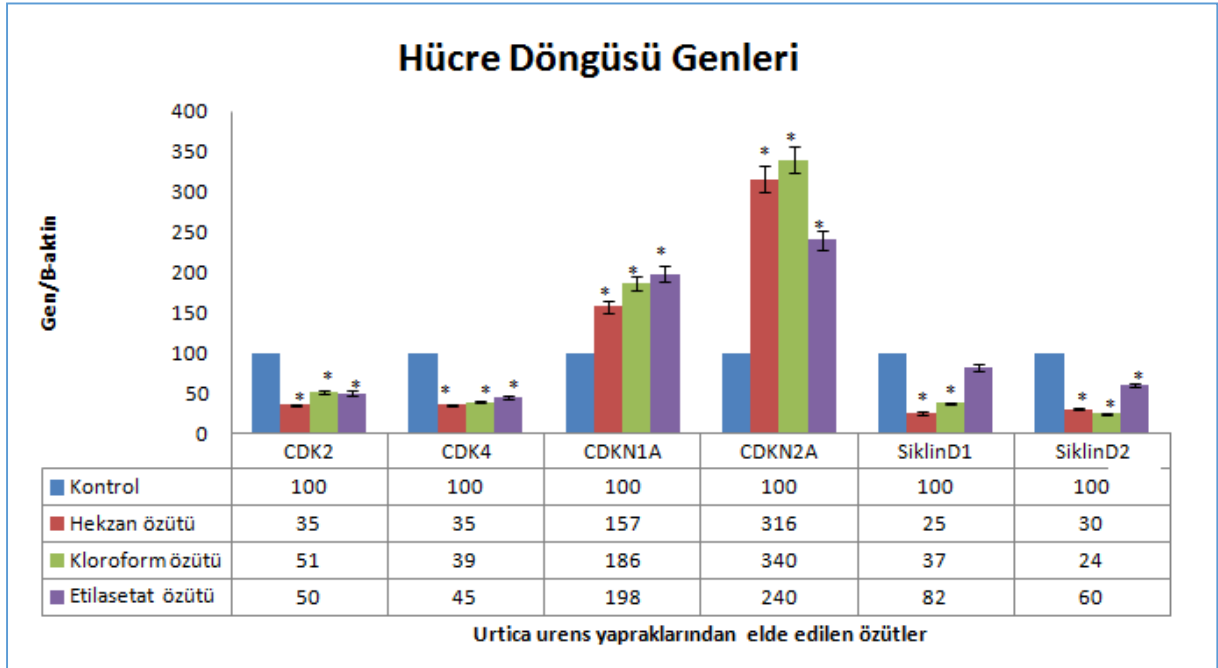
3.1.1.4.3 LNCaP Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; Kaspaz3; Kaspaz8; Kaspaz9; PARP ve TNF genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlerine bakıldı. LNCaP hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda APAF1 mRNA seviyesinde sırasıyla %24; %13 ve %4 artış gözlemlenmiştir. Bax mRNA seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulanması sonucunda sırasıyla %427, %224 ve %224 artış gözlemlenmiştir. Ayrıca hekzan; kloroform ve etil asetat özütlelerinde BCL2 mRNA seviyesinde sırasıyla %82; %92 ve %68 azalma gözlemlenmiştir. FAS mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %86; %85 ve %62 azalma elde edilmiştir. Kaspaz-3 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %117; %95 ve %145 artış saptanmıştır. Kaspaz-8 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %87; %387 ve %139 artış elde edilmiştir. Kaspaz-9 mRNA seviyesinde de kloroform ve etil asetat uygulamasında %13 ve %46 artış gözlemlenirken; hekzan uygulamasında %7 azalış gözlemlenmiştir. PARP mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %12; %6 ve %9 azalma gözlemlenmiştir Tüm bunlara ek olarak da TNF mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %12; %48 ve %30 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.50). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlelerinin apoptoz mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



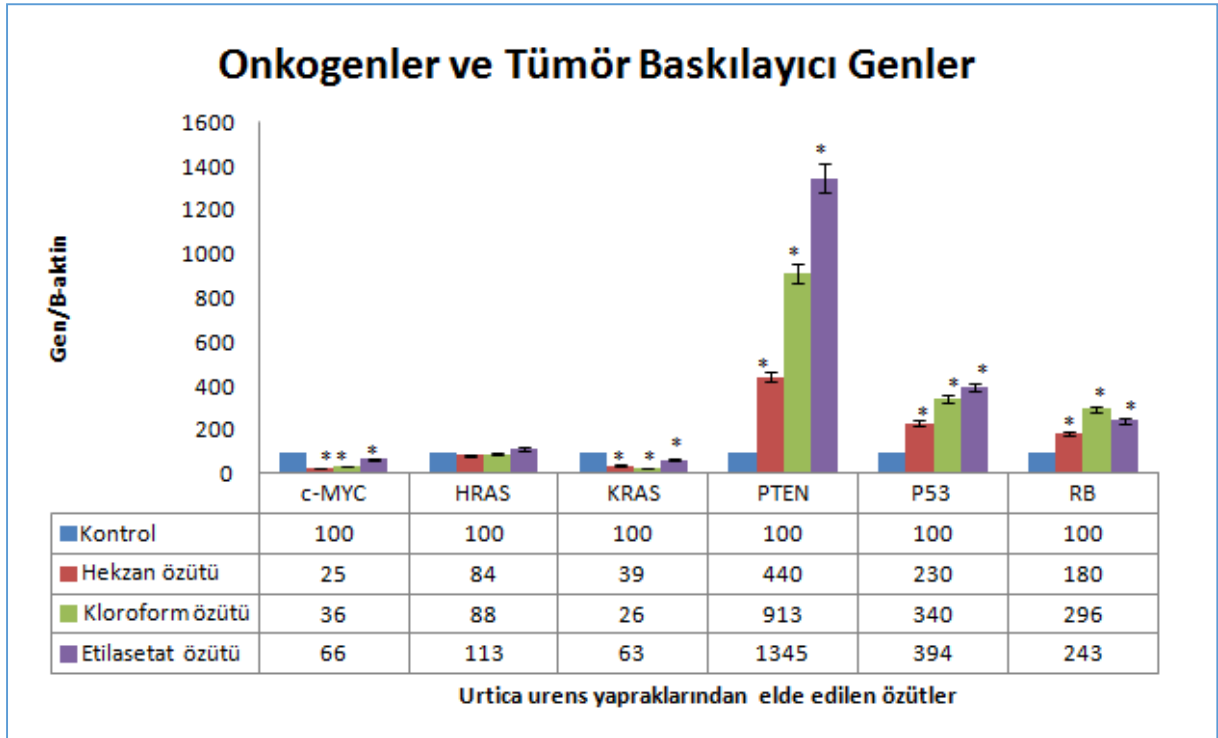
Şekil 3. 50. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

LNCap hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A; SiklinD1 ve SiklinD2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCap hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda CDK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %65; %49 ve %50 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulanması sonucunda CDK4 mRNA seviyesinde sırasıyla %65; %61 ve %55 azalma gözlemlenmiştir. CDKN1A mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %57; %86 ve %98 artış elde edilmiştir. CDKN2A mRNA seviyesi ise hekzan kloroform ve etilasetat özütlerinde sırasıyla %216, %240 ve %140 artış elde edilmiştir. SiklinD1 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %75; %63 ve %18 azalma gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da SiklinD2 mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında %70; %76 ve %40 azalma elde edilmiştir (Şekil 3.51). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 51. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) hücre döngüsünde görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

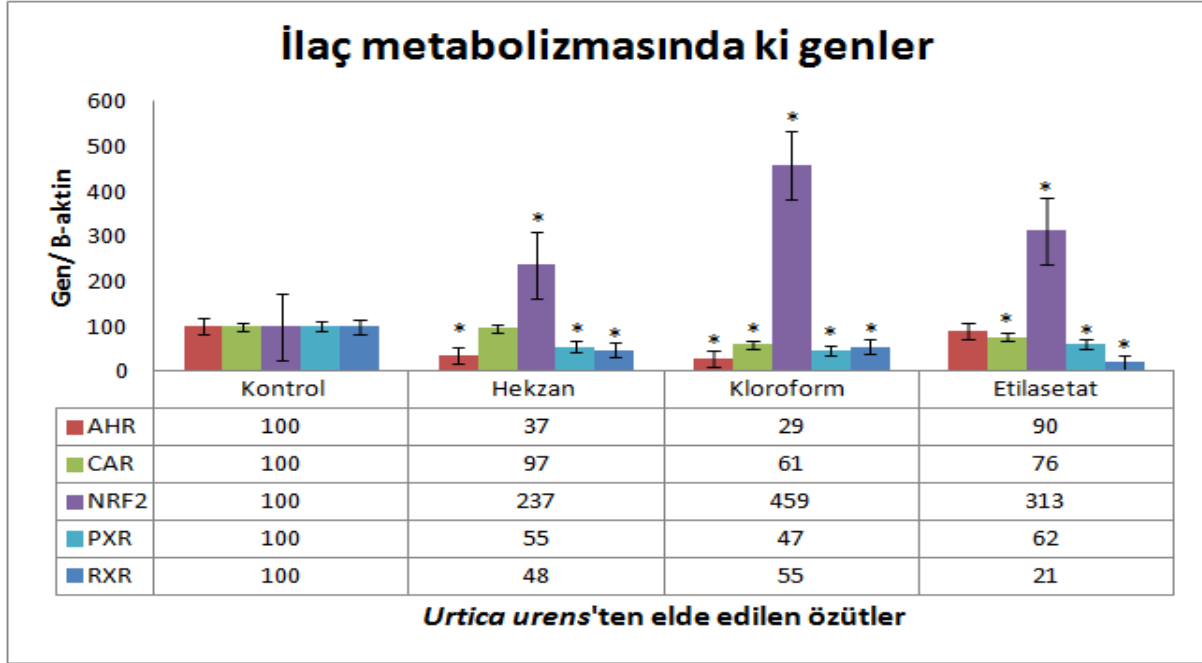
LNCaP hücre hattında onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak görev alan c-MYC; HRAS; KRAS; PTEN; P53 ve RB genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. LNCaP hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda c-MYC mRNA seviyesinde sırasıyla %75; %64 ve %34 azalma gözlemlenmiştir. HRAS mRNA seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %16 ve %12 azalma gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında %13 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri KRAS mRNA seviyesinde sırasıyla %61; %74 ve %37 azalma elde edilmiştir. Hekzan, kloroform ve etilasetat özütleri uygulaması sonucunda PTEN mRNA seviyesinde sırasıyla %340, %813 ve %1245 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak, 24 saat boyunca hekzan, kloroform ve etilasetat uygulanması p53 mRNA seviyesinde sırasıyla %130, %240 ve %294 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RB mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %80; %196 ve %143 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.52).



Şekil 3. 52. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) onkogen ve tümör baskılayıcı bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

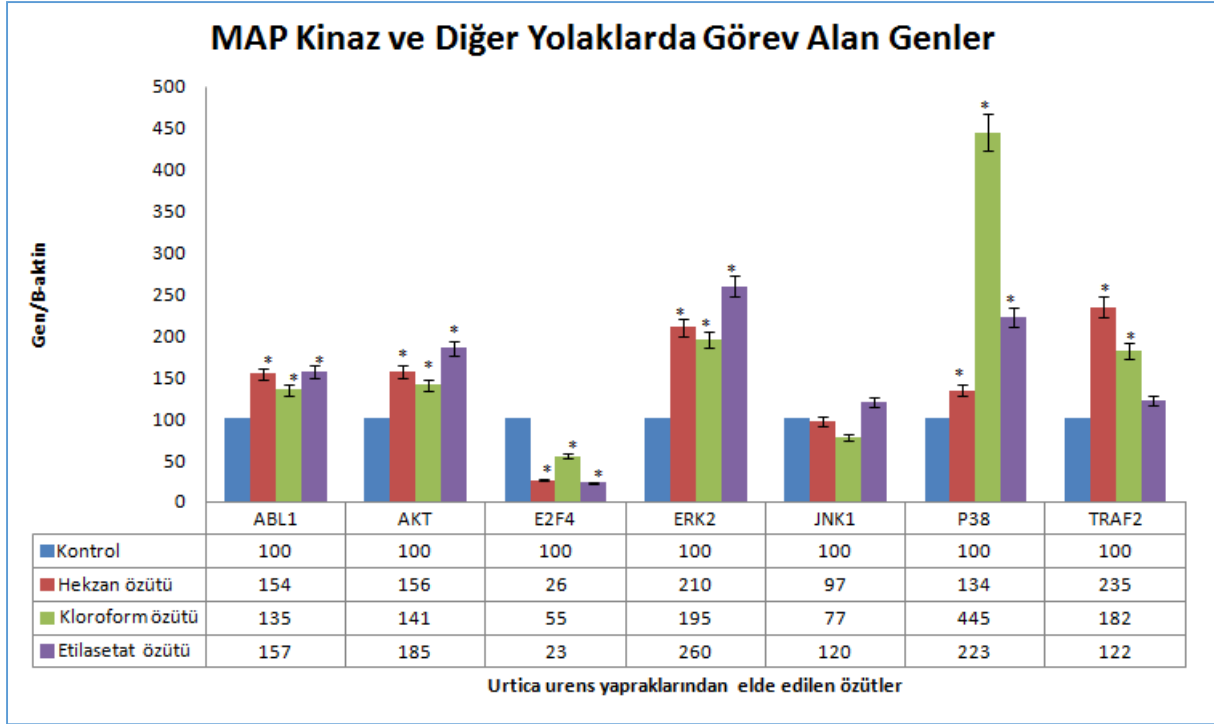
LNCap hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; NRF2; PXR ve RXR genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCap hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda AHR mRNA seviyesinde sırasıyla %63; %71 ve %10 azalma gözlemlenmiştir. CAR mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %3; %39 ve %24 azalma elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan;

kloroform ve etil asetat özütleri NRF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %137; %359 ve %213 artış gözlemlenmiştir. PXR mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %45; %53 ve %38 azalma gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RXR mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %52; %45 ve %79 azalma elde edilmiştir (Şekil 3.53).



Şekil 3. 53. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) ilaç metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

LNCap hücre hattında MAP kinaz yolağı ve diğer yollarda görev alan ABL1; AKT; E2F4; ERK2; JNK1; P38 ve TRAF2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. LNCap hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda ABL1 mRNA seviyesinde sırasıyla %54; %35 ve %57 artış gözlemlenmiştir. AKT mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %56; %41 ve %85 artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda E2F4 mRNA seviyesinde sırasıyla %74; %45 ve %77 azalma gözlemlenmiştir. LNCap hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda ERK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %110; %95 ve %160 artış elde edilmiştir. JNK1 mRNA seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında %3 ve %23 azalma gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında %20 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri P38 mRNA seviyesinde sırasıyla %34; %45 ve %113 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da TRAF2 mRNA seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %135; %82 ve %22 artış saptanmıştır (Şekil 3.54).



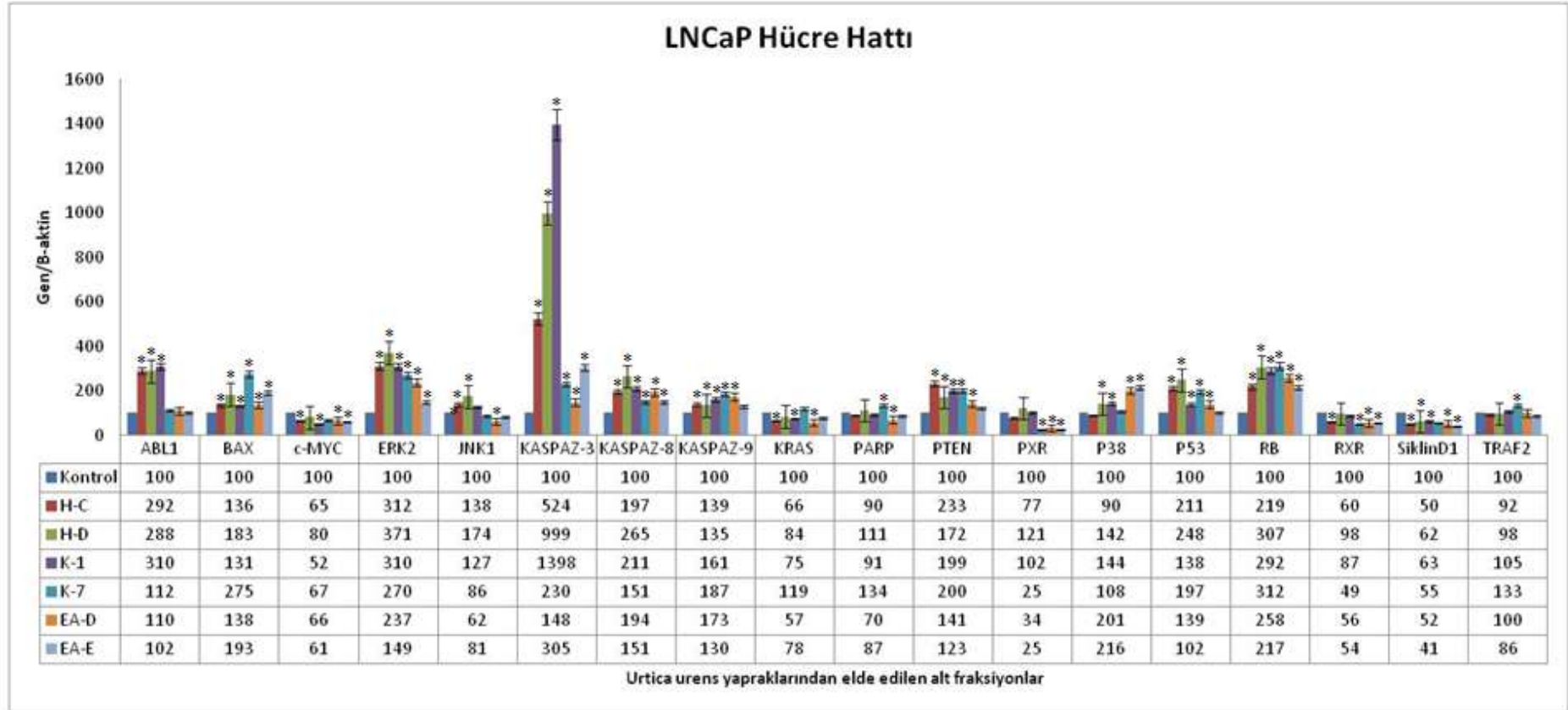
Şekil 3. 54. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin İnsan prostat kansinoma hücre hattında (LNCaP) MAP Kinaz yolağı ve diğer yolaklarda görev alan bazı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

- **Hekzan, Kloroform ve Etil Asetat Aktif Alt Fraksiyonlarının mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi**

LNCaP hücre hattında birçok yolağa rol alan ABL1; BAX; CDKN1A; c-MYC; ERK2; JNK1; KASPAZ-3; KASPAZ-8; KASPAZ-9; KRAS; PARP; PTEN; PXR; P38; P53; RB; RXR; SiklinD1 ve TRAF2 genlerinin hekzan özütünde anlamlı sitotoksik etki gösteren H-A ile H-D; kloroform içinse K-1 ile K-7 ve etil asetat içinse de EA-D ile EA-E aktif alt fraksiyonların uygulaması sonrasında mRNA seviyesinde meydana gelen değişimlere bakılmıştır. ABL1 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D ve K-1 uygulaması sonrasında sırasıyla %192; %188 ve %210 artış elde edilirken, diğer alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanamamıştır. BAX geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %36; %83; %31; %175; %38 ve %93 artış elde edilmiştir. Bu sonuçlardan farklı olarak c-MYC geninde ise H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %35; %20; %48; %33; %34 ve %39 azalış elde edilmiştir. ERK2 geni içinse H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %212; %271; %210; %170; %137 ve %49 artış elde edilmiştir. JNK1 geni içinse H-A ve H-D uygulaması sonrasında sırasıyla %38 ve %74 artış gözlemlenirken, EA-D uygulamasında %38 azalma ve kalan diğer uygulamalarda da anlamlı bir değişim elde edilememiştir. KASPAZ-3 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7;



EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %424; %899; %1298; %130; %48 ve %205 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde KAZPAZ-8 geninde ise H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %97; %165; %111; %51; %94 ve %51 artış elde edilmiştir. KAZPAZ-9 geninde de H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %39; %35; %61; %87; %73 ve %30 artış saptanmıştır. KRAS geninde mRNA seviyesinde H-A; K-1; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %34; %25; %43 ve %32 artış elde edilirken diğer özütlere anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. PARP geninin mRNA seviyesinde K-7 uygulaması sonucunda %34 artış gözlenirken diğer özütlere anlamlı bir değişim elde edilememiştir. Diğer bir önemli gen olan PTEN geninin de mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %133; %72; %99; %100; %41 ve %23 artış elde edilmiştir. PXR geninin mRNA seviyesinde H-A; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %23; %75; %66 ve %75 azalış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. P38 geninde mRNA seviyesinde H-D; K-1; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %42; %44; %101 ve %116 artış elde edilmiş olup diğer aktif alt fraksiyonlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. P53 geninin mRNA seviyesinde ise H-A; H-D; K-1; K-7 ve EA-D uygulaması sonrasında sırasıyla %111; %148; %38; %97 ve %39 artış saptanırken EA-E uygulaması sonrasında ise anlamlı bir değişim elde edilememiştir. RB geninde ise H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %119; %207; %192; %212; %158 ve %117 artış elde edilmiştir. RXR geninin mRNA seviyesinde H-A; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %30; %51; %44 ve %46 azalış saptanırken, diğer uygulamalardan anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Benzer şekilde SiklinD1 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında sırasıyla %50; %38; %37; %45; %48 ve %59 azalış elde edilmiştir. Son olarak TRAF2 geninin mRNA seviyesinde H-A; H-D; K-1; K-7; EA-D ve EA-E uygulaması sonrasında anlamlı bir değişim elde edilememiştir (Şekil 3.55).



Şekil 3. 55. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütü aktif alt fraksiyonlarının insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında birçok yolakta rol alan önemli genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$). H-A: Hekzan özütü A alt fraksiyonu; H-D: Hekzan özütü D alt fraksiyonu; K-1: Kloroform özütü 1 alt fraksiyonu; K-7: Kloroform özütü 7 alt fraksiyonu; EA-D: Etil asetat özütü D alt fraksiyonu; EA-E: Etil asetat özütü E alt fraksiyonu.

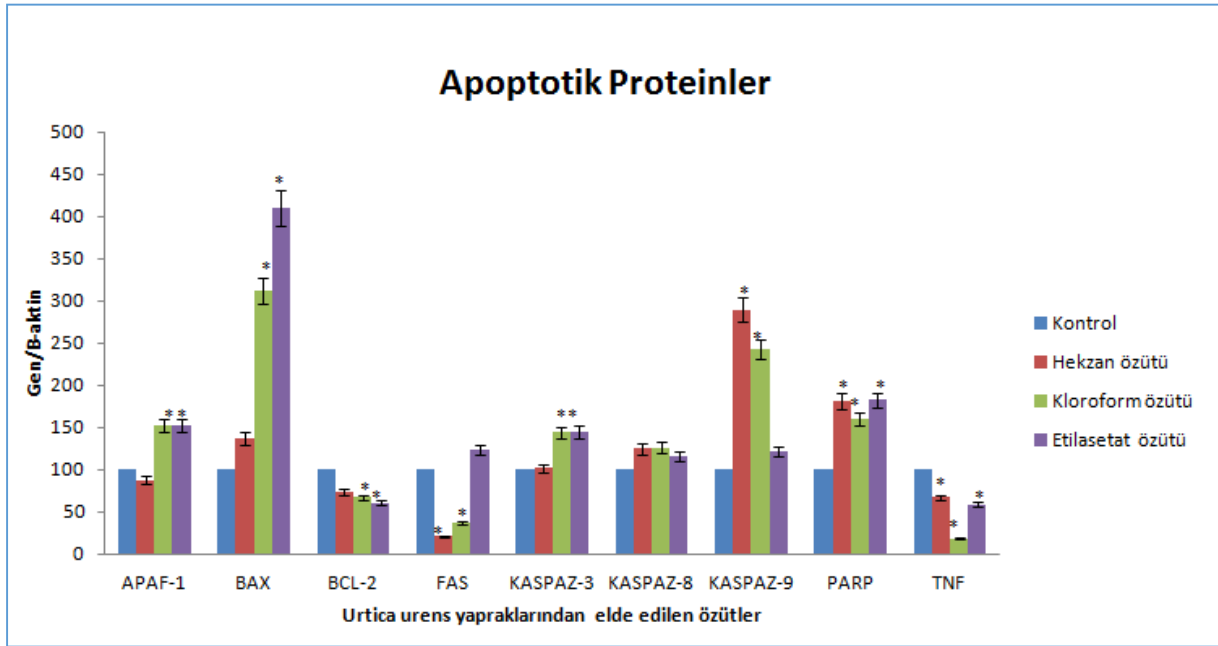
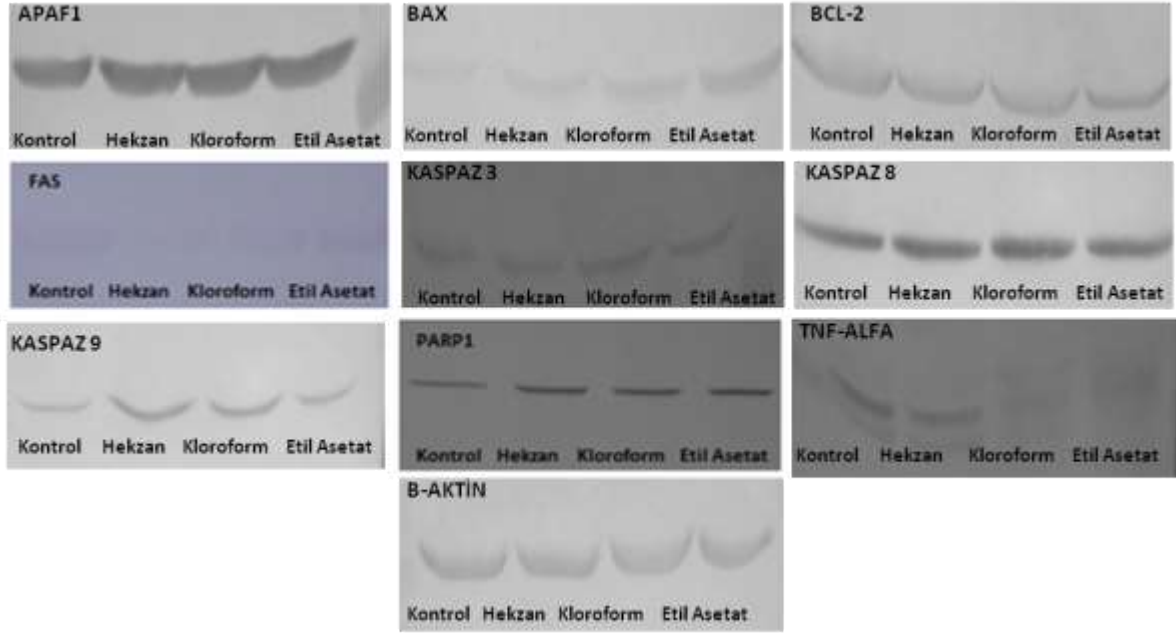


3.1.1.5 Protein Seviyesinde Ekspresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi: Western Blot

Proje kapsamında verilen genlerin protein seviyelerinde küçük ısırgan otu özütleri uygulanması sonucunda meydana gelen değişimler yapılan Western Blot çalışmaları ile A549, Caco2 ve LNCaP hücre hatlarında belirlenmeye çalışılmıştır.

3.1.1.5.1 A549 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

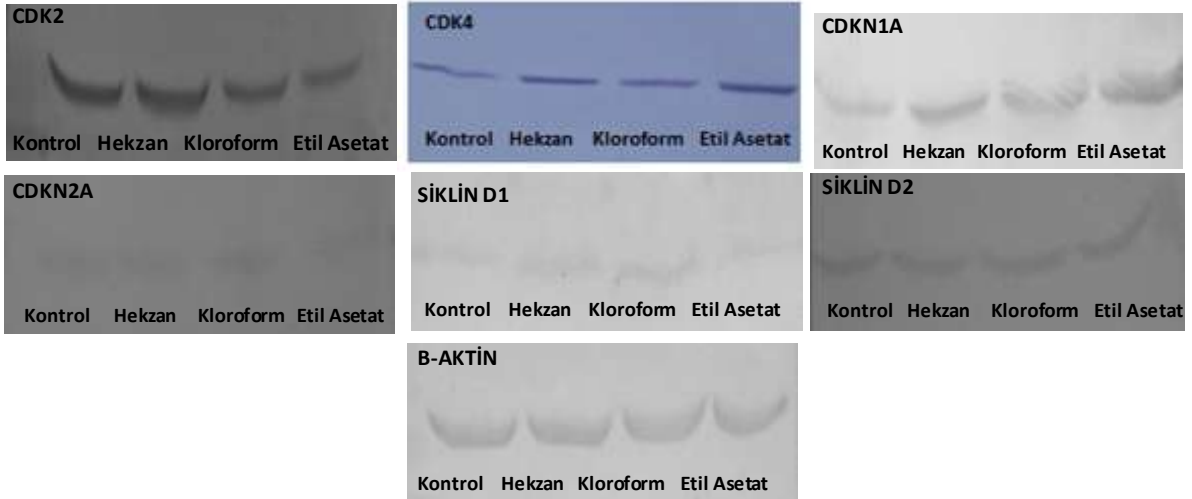
A549 hücre hattında apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; KASPAZ-3; KASPAZ-8; KASPAZ-9; PARP ve TNF-alfa protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında kloroform ve etil asetat uygulamasıyla APAF1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinin sırasıyla %53 ve %52 arttığı gözlemlenirken; hekzan uygulamasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir. Benzer şekilde hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulanan A549 hücre hattında BAX protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %37; %212 ve %310 artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık BCL2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda sırasıyla %27; %33 ve %39 azalma gözlemlenmiştir. FAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %79 ve %63 oranında bir azalış elde edilmiştir. Kaspaz-3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan uygulamasında anlamlı bir değişim gözlenmezken; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %44 ve %45 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-8 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %25; %26 ve %16 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-9 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %189; %143 ve %22 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde PARP protein seviyesinde bu özütlerin uygulanması sonucunda %81, %60 ve %82 oranında artış saptanmıştır. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında TNF protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %33; %82 ve %44 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.56).

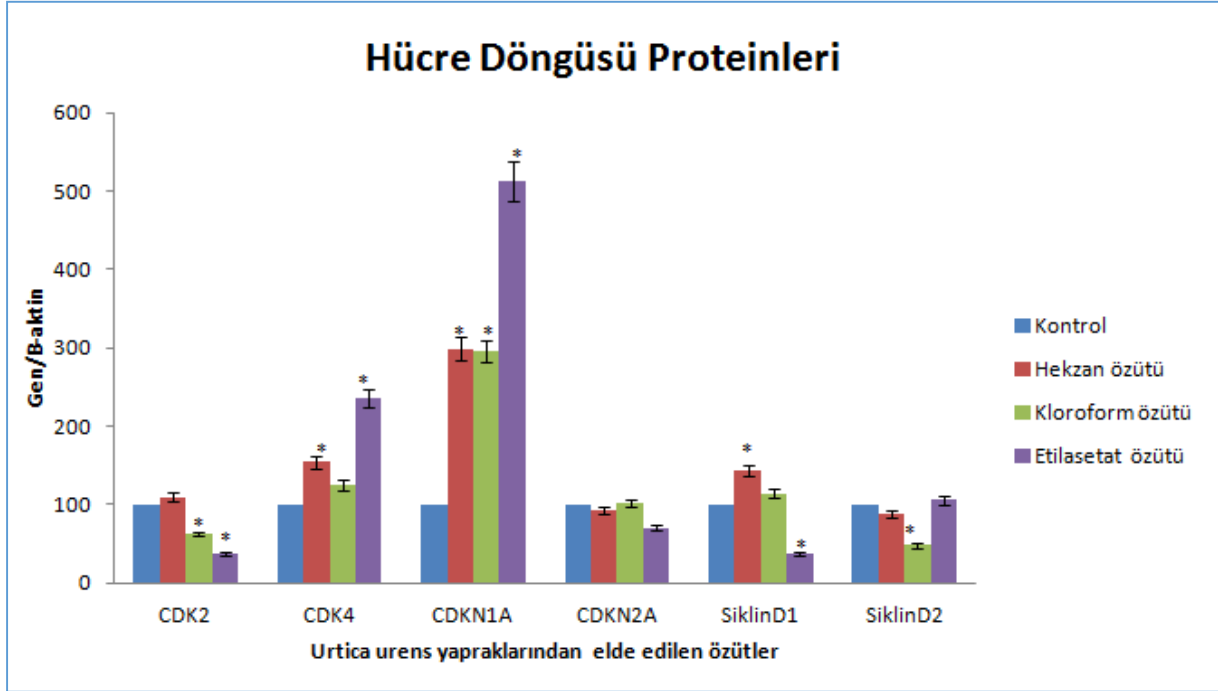


Şekil 3. 56. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A SiklinD1 ve SiklinD2 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan ve kloroform uygulamasıyla SiklinD1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinin sırasıyla %43 ve %14 attığı gözlemlenirken; etil asetat uygulamasında ise %62 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan ve etil asetat

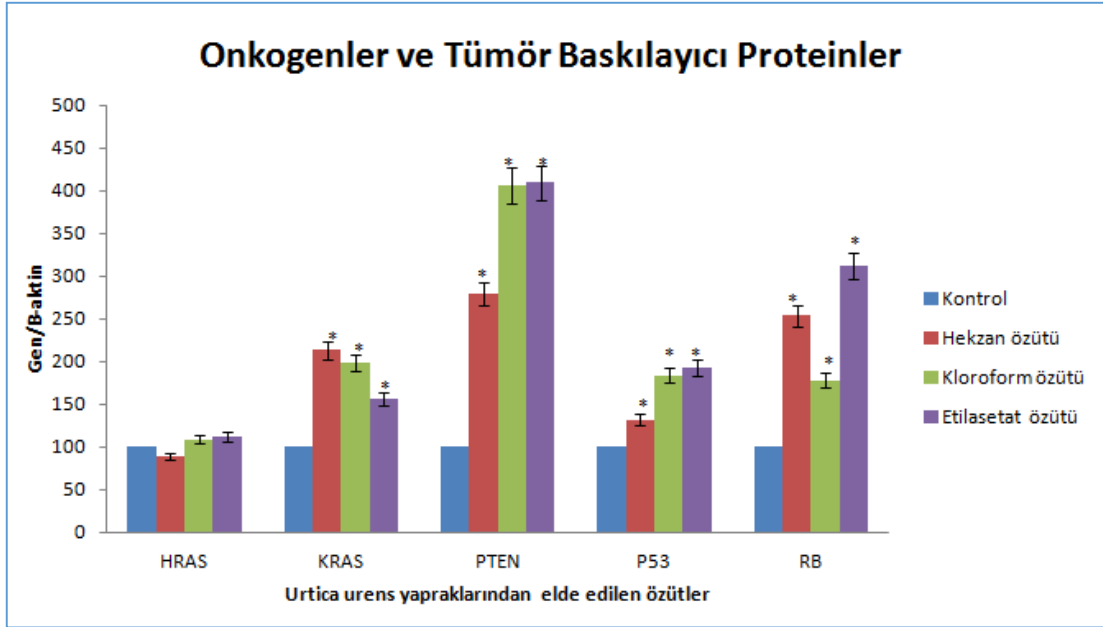
özütleri uygulanan A549 hücre hattında SiklinD2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken; kloroform uygulamasında %52 azalma elde edilmiştir. CDK4 protein seviyesinde sırasıyla %54; %24 ve %136 oranında bir artış tespit edilmiştir. CDKN1A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda sırasıyla %199; %196 ve %413 artış saptanmıştır. Buna karşın CDKN2A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan ve kloroform uygulamasında anlamlı bir değişim gözlenmezken; etil asetat uygulamasında %29 azalma gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan uygulamasında anlamlı bir değişim gözlenmezken; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %37 ve %62 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.57).





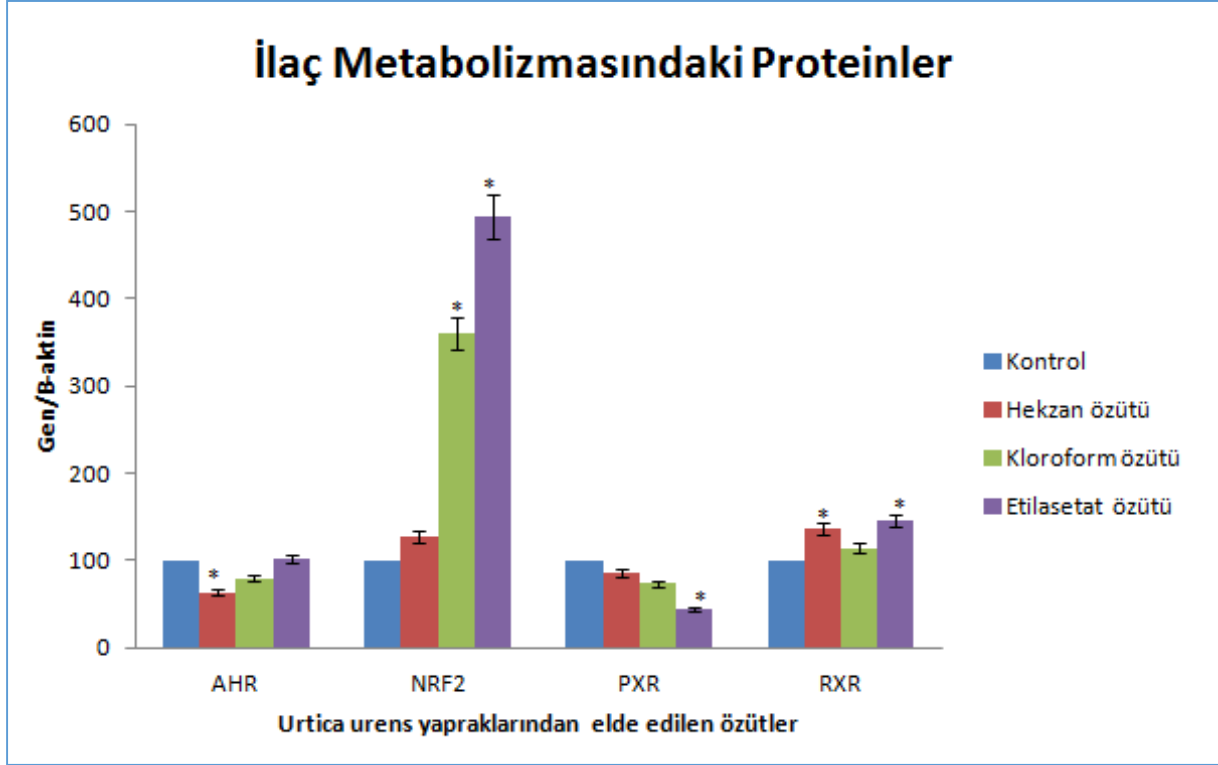
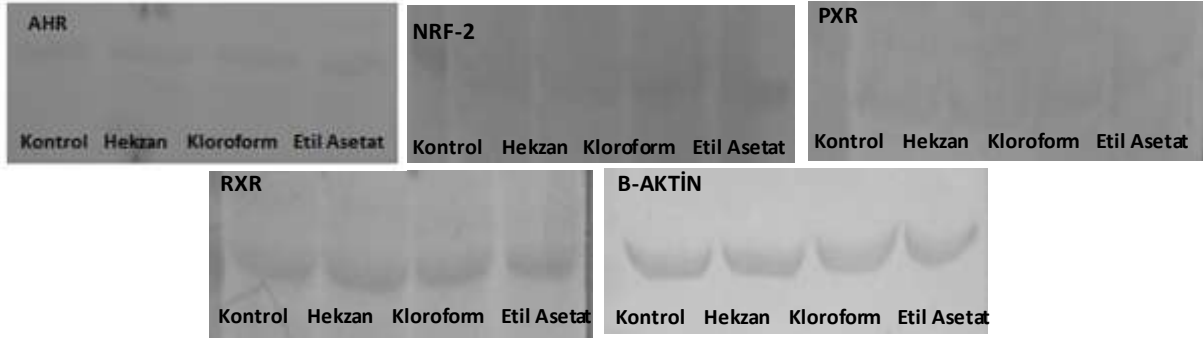
Şekil 3. 57. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinlerden HRAS; KRAS; PTEN; P53 ve RB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasıyla HRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Buna karşın hekzan; kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %32; %84 ve %93 artış gözlemlenmiştir. PTEN protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda sırasıyla %179; %306 ve %309 artış gözlemlenmiştir. RB protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan, kloroform etil asetat özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %154, %78 ve %212 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında KRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %113, %98 ve %55 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.58).



Şekil 3. 58. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında Onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

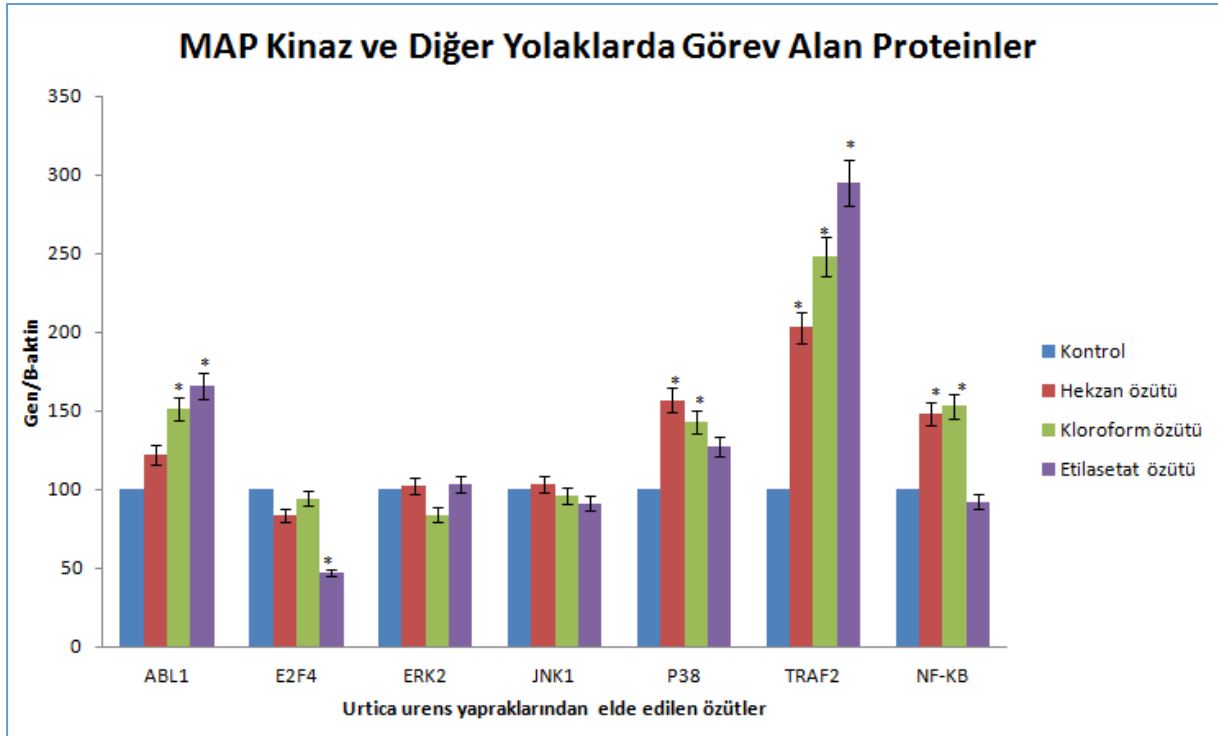
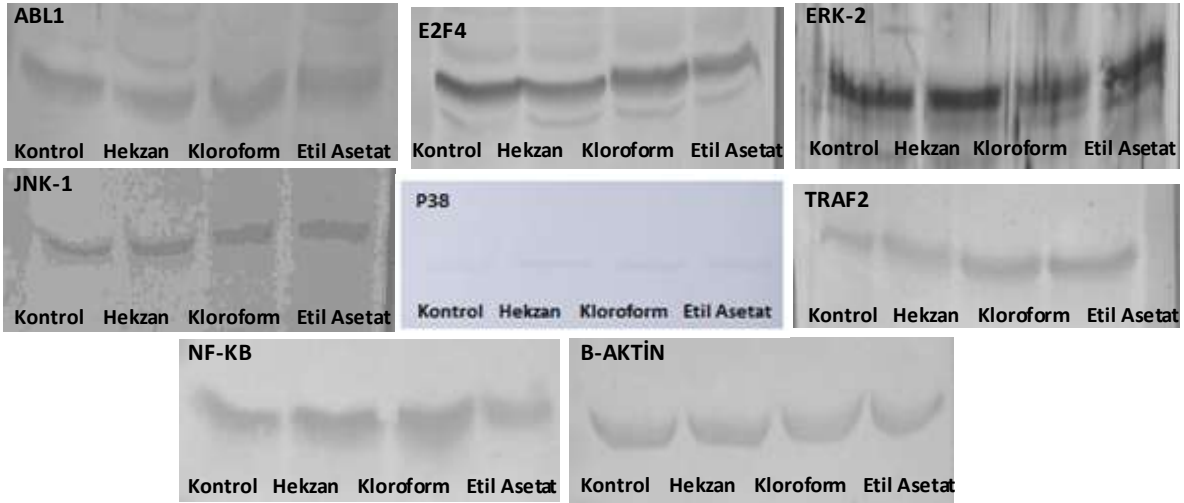
A549 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; NRF2; PXR ve RXR protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. AHR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %37 ve %21 azalış elde edilirken etil asetat özütünde değişiklik saptanmamıştır. A549 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasıyla PXR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %14; %26 ve %55 azalma gözlemlenmiştir. Buna karşın RXR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %37; %14 ve %46 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında NRF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %28; %261 ve %394 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.59).



Şekil 3. 59. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Tüm bunlara ek olarak A549 hücre hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerden ABL1; E2F4; ERK2; JNK1; P38; TRAF2 ve NF-KB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasıyla ABL1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde %22; %51 ve %66 artış gözlemlenmiştir. Buna karşın E2F4 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan ve kloroform uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik gözlenmezken; etil asetat uygulamasında %53 azalma gözlemlenmiştir. P38 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan ve

kloroform uygulamasında sırasıyla %56 ve %42 oranında bir artış gözlemlenmiştir. A549 hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasıyla ERK2 ve JNK1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir. TRAF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %103; %148 ve %195 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak NF-KB protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan ve kloroform uygulamasında sırasıyla %48 ve %53 artış gözlenirken; etil asetat uygulaması sonucunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 3.60).

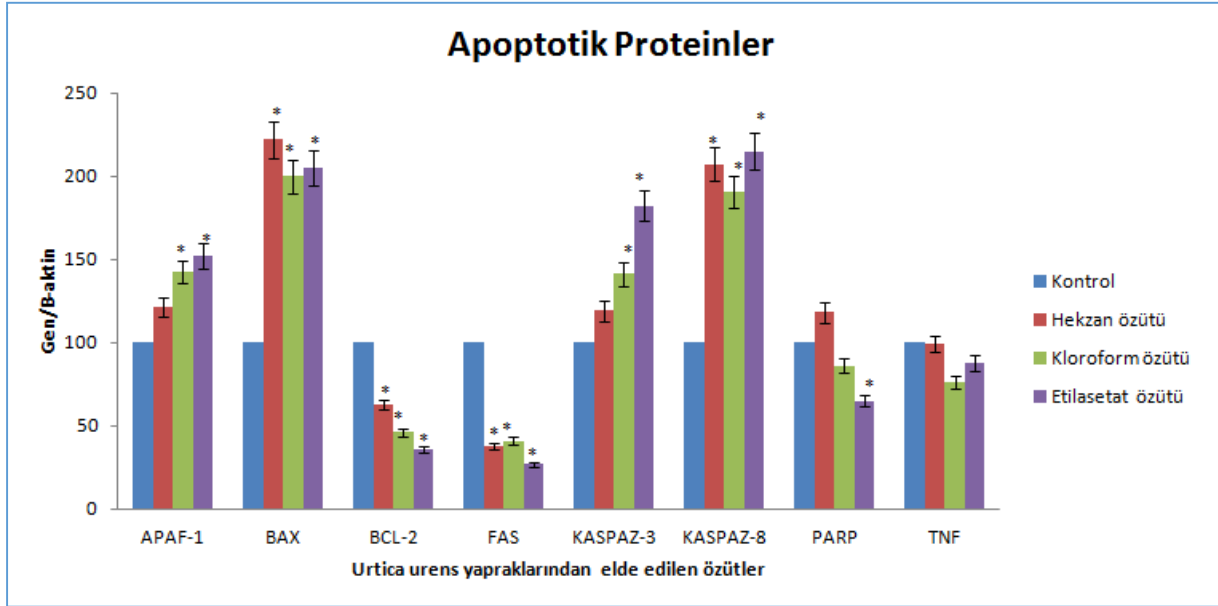




Şekil 3. 60. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.1.5.2 Caco2 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

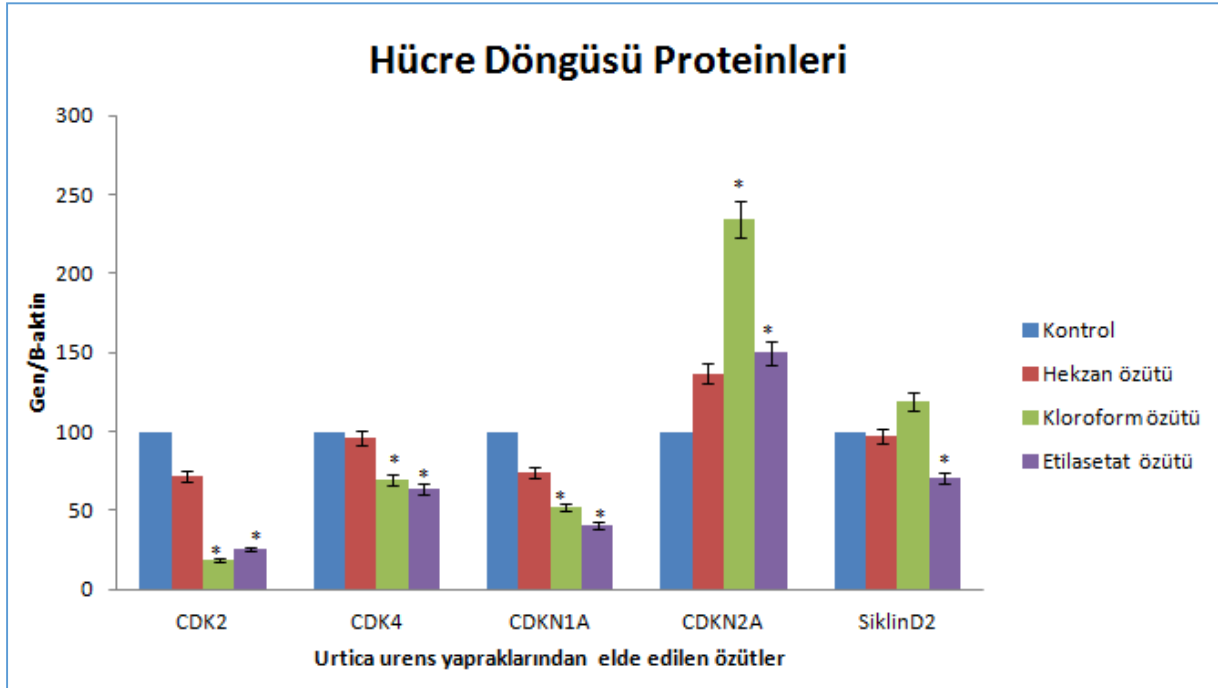
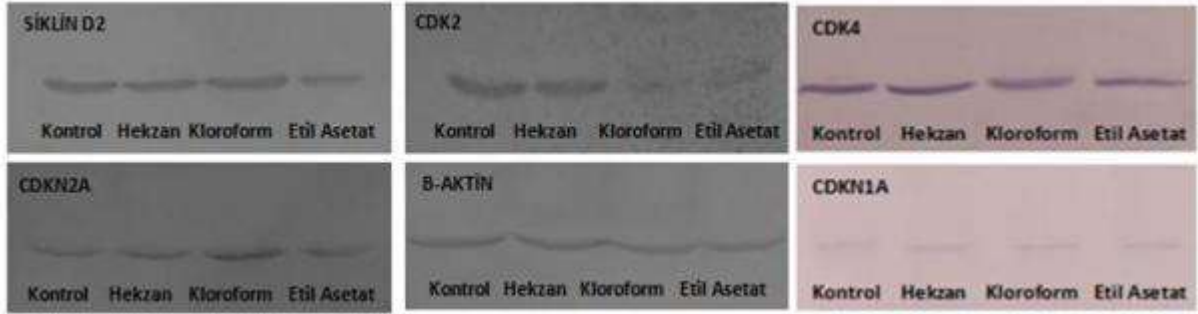
Caco-2 hücre hattına küçük ısırgan otundan elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin uygulaması sonucunda apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1, BAX, BCL2, FAS, KASPAZ-3, KASPAZ-8, PARP ve TNF-alfa protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri için belirlenen etkin doz değerlerinin uygulanması ile APAF1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda sırasıyla %21, %42 ve %52 artış elde edilmiştir. Bu hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması ile BAX protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %122, %100 ve %105 artış elde edilmiştir. Buna karşılık, BCL2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonrasında sırasıyla %38, %54 ve %65 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde FAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %62, %59 ve %73 azalma gözlemlenmiştir. Kaspaz-3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %19, %41 ve %82 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-8 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %107, %91 ve %115 artış elde edilmiştir. PARP1 protein seviyesinde etil asetat uygulanması sonucunda meydana gelen %35 azalış anlamlı bulunmuştur. Tüm bunlara ek olarak da Caco-2 hücre hattında TNF-alfa protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan özütünde değişim gözlenmezken; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %24 ve %13 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.61).



Şekil 3. 61. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hattında apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A ve SiklinD2 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında hekzan ve kloroform uygulamasıyla SiklinD2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde değişim gözlenmezken; etil asetat uygulamasında %29 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulanan Caco-2 hücre hattında CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %29, %82 ve %75 azalma gözlemlenmiştir. CDKN1A protein seviyelerinde kloroform ve etil asetat özütlerinde %48 ve %59 azalma gözlemlenirken hekzan özütlede anlamlı bir değişim

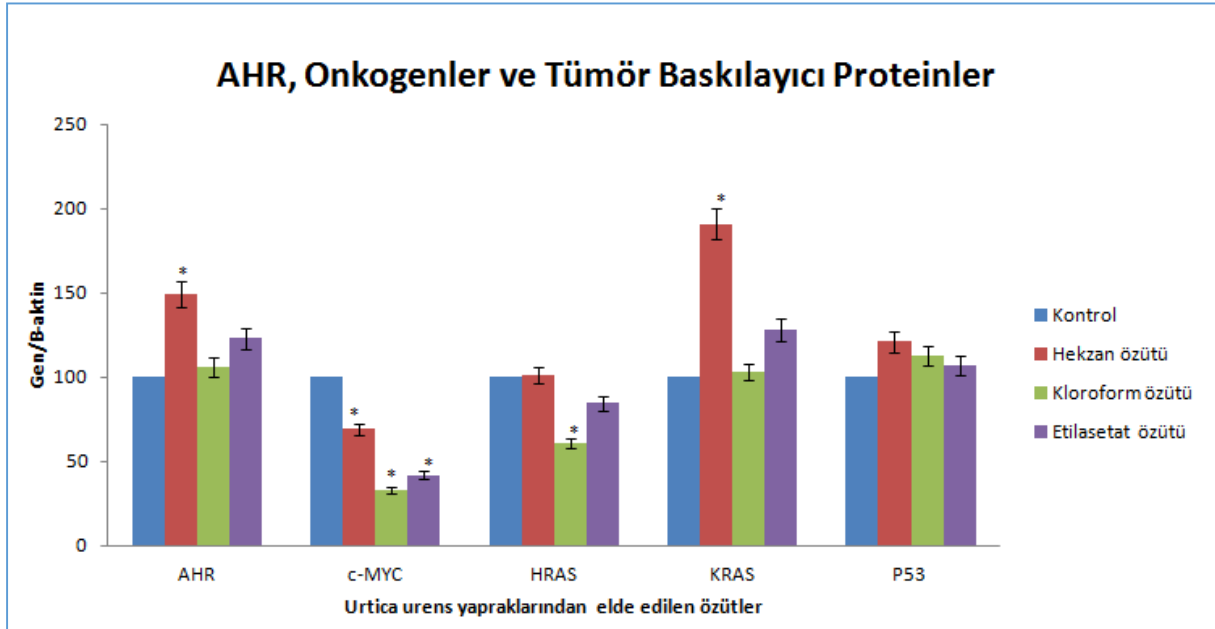
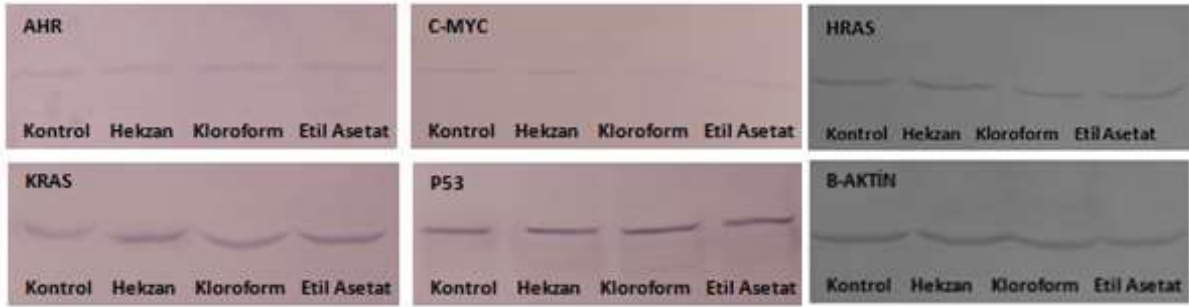
gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde CDK4 protein seviyesinde kloroform ve etil asetat özütleri uygulanması sonucunda meydana gelen sırasıyla %30 ve %36 oranındaki azalmalar anlamlı bulunmuş, hekzan özütü uygulaması sonucunda meydana gelen değişim ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm bunlara ek olarak da, CDKN1A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda sırasıyla %36, %134 ve %50 artış elde edilmiştir (Şekil 3.62).



Şekil 3. 62. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

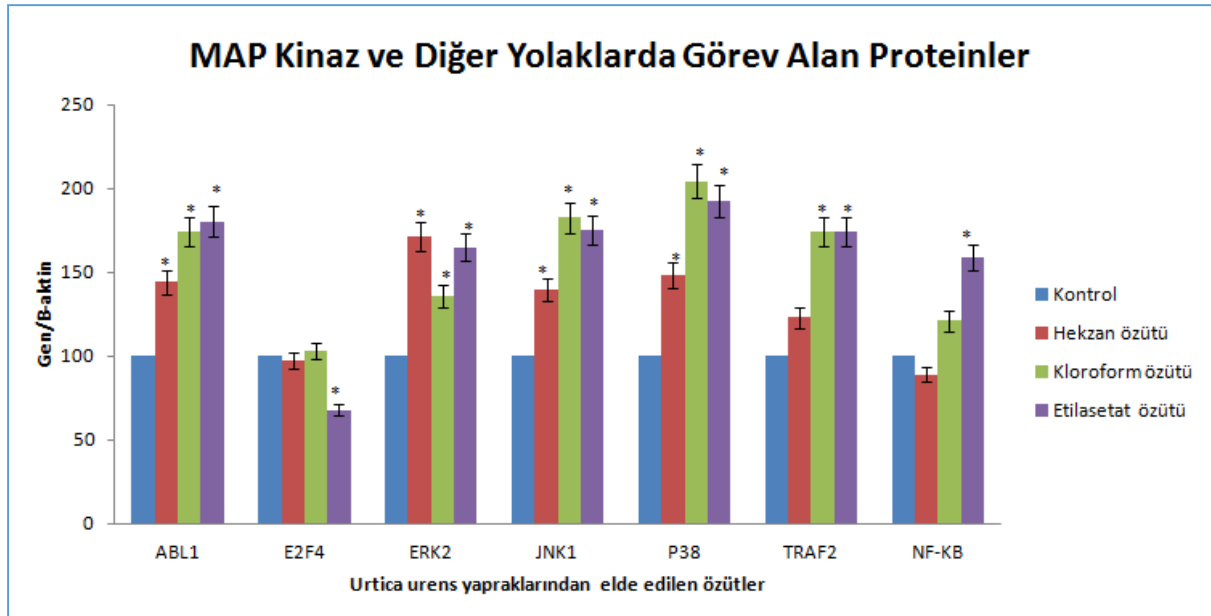
Caco-2 hücre hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerden c-MYC, HRAS, KRAS, P53 ve ayrıca ilaç metabolizmasında rol alan AHR protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. AHR protein seviyesinde hekzan özütü uygulamasında %49 artış elde edilirken, diğer özütlerdeki değişimler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Yapılan analizler

sonucunda bu hücre hattında c-MYC protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %31, %67 ve %58 azalma gözlenmiştir. HRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan özütünde değişim gözlenmezken; kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %40, %17 azalma tespit edilmiştir. KRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %91, %3 ve %28 artış gözlemlenmiştir fakat bunlardan sadece hekzan özütü uygulaması sonucunda meydana gelen artış anlamlı bulunmuştur. Tüm bunlara ek olarak, P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan, kloroform etil asetat özütleri uygulaması sonucunda anlamlı değişim elde edilmemiştir (Şekil 3.63).



Şekil 3. 63. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinler ve ilaç metabolizmasında görev alan AHR proteininin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

Tüm bu sonuçlara ek olarak Caco-2 hücre hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerden ABL1, E2F4, ERK2, JNK1, P38, TRAF2 ve NFkB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasıyla ABL1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde %44, %74 ve %80 artış gözlemlenmiştir. E2F4 protein seviyesinde de etil asetat özütünde %32 azalma gözlemlenmiştir. Caco-2 hücre hattında hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasıyla ERK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %71, %35 ve %64 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde JNK1 protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri için sırasıyla %40, %83 ve %75 artış gözlemlenmiştir. P38 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %48, %104 ve %92 artış gözlemlenmiştir. TRAF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat sırasıyla %23, %74 ve %74 artış elde edilmiştir. Son olarak Nf-KB protein seviyesinde etil asetat özütü uygulaması sonucunda %59 oranında bir artış bulunmuştur (Şekil 3.64).

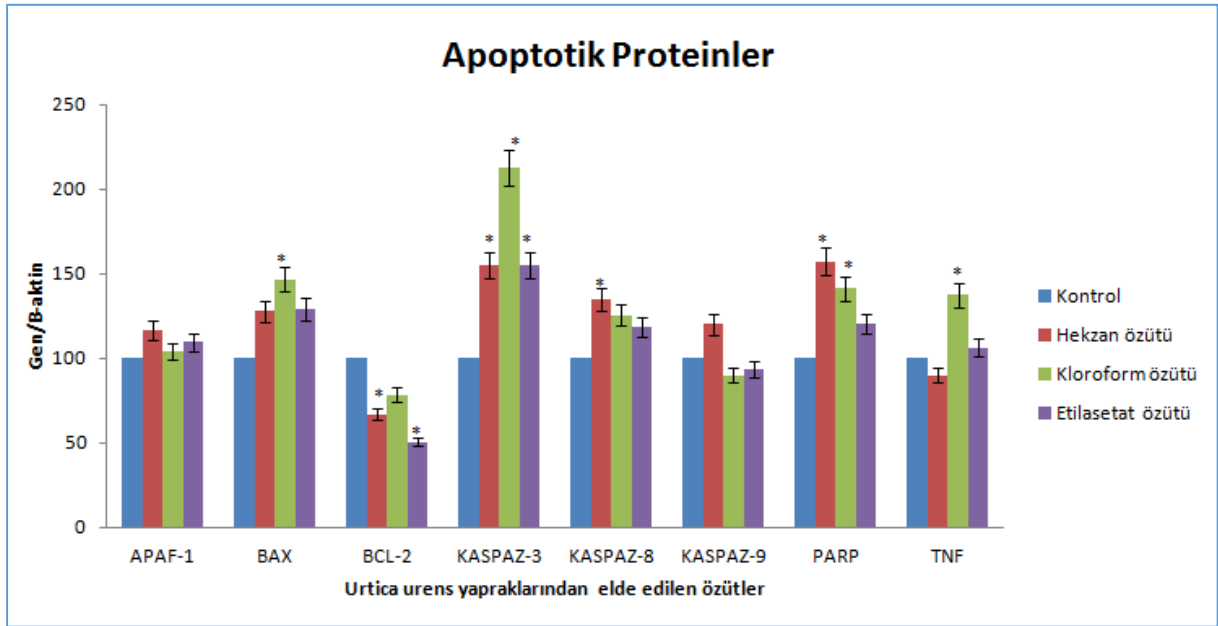
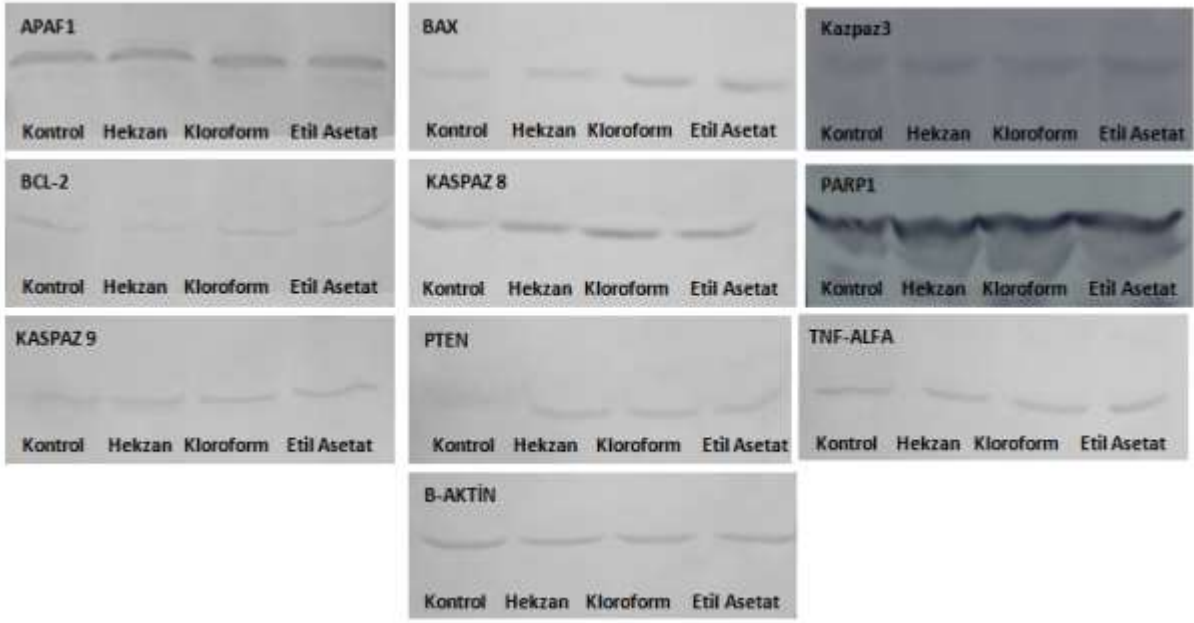




Şekil 3. 64. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) MAP Kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.1.5.3 LNCaP Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

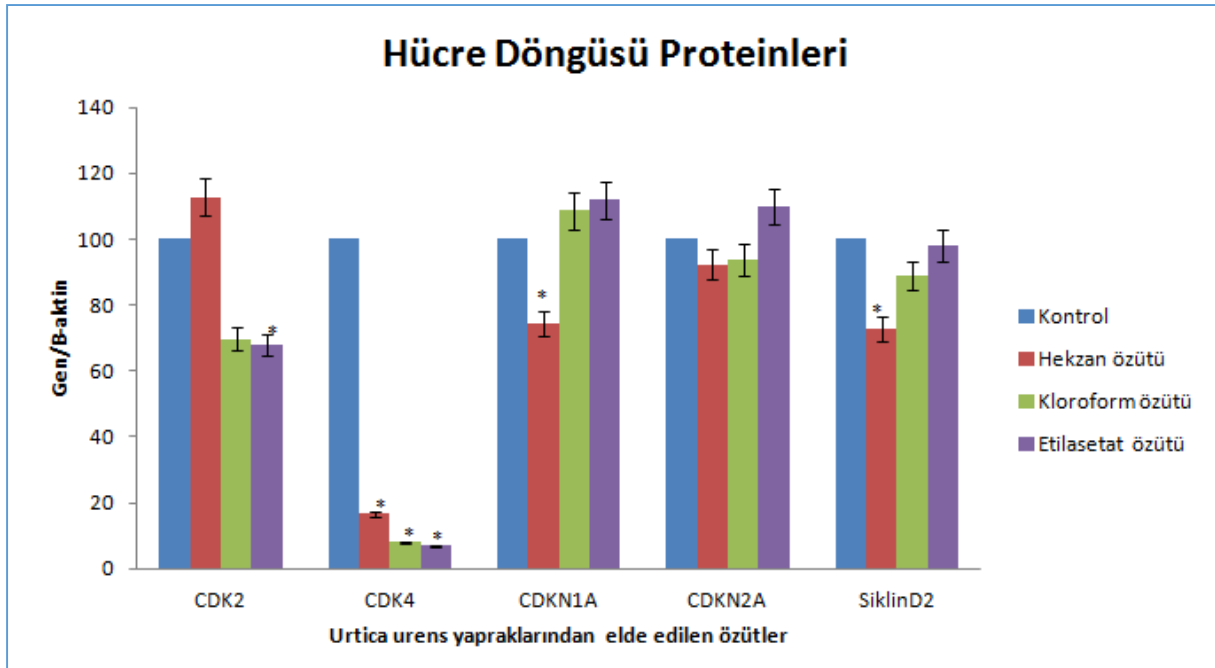
Proje kapsamında çalıştığımız diğer bir hücre hattı olan LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu özütlerinin uygulaması sonucunda apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1, BAX, BCL2, KASPAZ-3, KASPAZ-8, KASPAZ-9, PARP ve TNF-alfa protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması ile APAF1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda özütlerde sırasıyla %16, %4 ve %9 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde, BAX protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %72, %202 ve %256 artış tespit edilirken; BCL2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda sırasıyla %33, %22 ve %50 azalma gözlemlenmiştir. LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulaması ile Kaspaz-3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %55, %112 ve %54 artış elde edilmiştir. Kaspaz-8 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %65, %98 ve %62 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-9 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %35, %43 ve %44 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde, PARP1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %57, %41 ve %20 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da LNCaP hücre hattında TNF-alfa protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %27, %20 ve %11 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.65).



Şekil 3. 65. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

LNCaP hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A ve SiklinD2 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan, kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda SiklinD2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %37, %36 ve %35 azalma elde edilmiştir. CDKN1A protein seviyelerinde hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinde istatistiksel açıdan

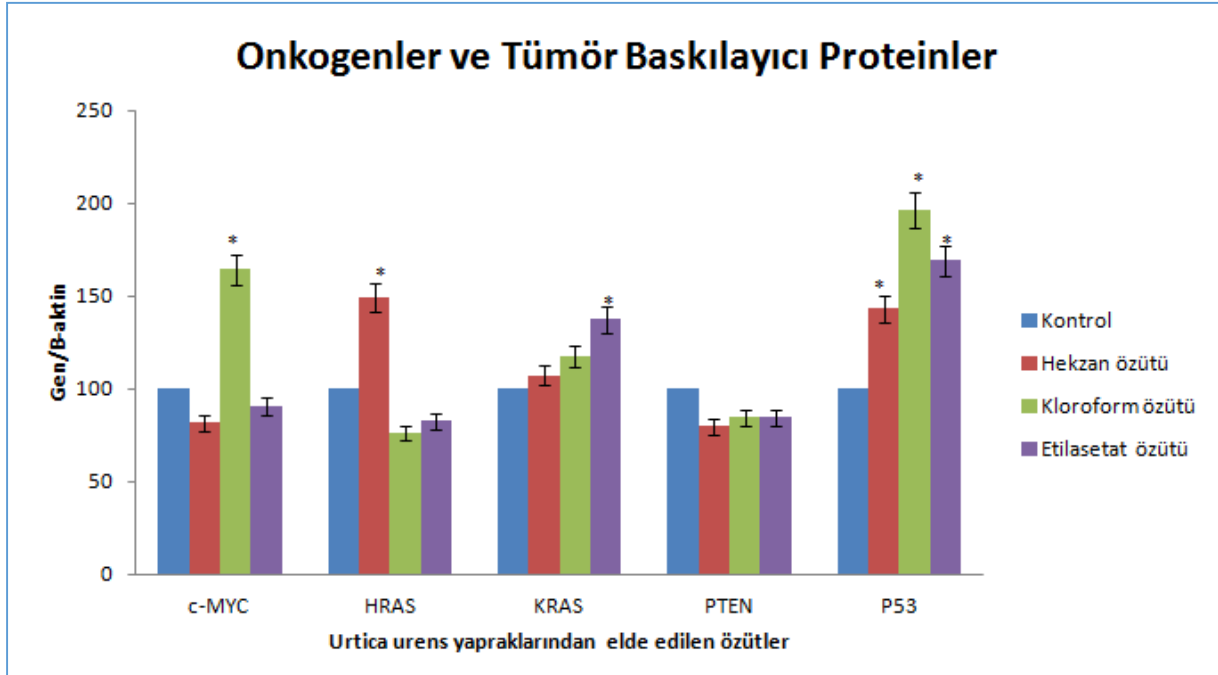
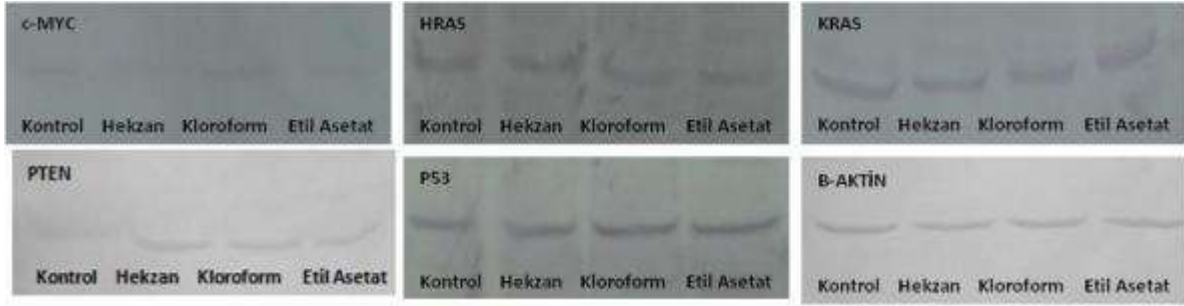
anlamli bir değişim gözlenmezken; CDK4 protein seviyesinde sırasıyla %84; %93 ve %93 azalma elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulanan LNCaP hücre hattında CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %31, %43 ve %52 azalma gözlemlenmiştir. Buna karşılık CDKN2A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulaması sonucunda sırasıyla %97, %64 ve %93 artış elde edilmiştir (Şekil 3.66).



Şekil 3. 66. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin insan prostat kansinoma hücre hattında (LNCaP) hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Çalışmaların devamında LNCaP hücre hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerden yolağındaki proteinlerden c-MYC, HRAS, KRAS, PTEN ve P53 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Yapılan analizler sonucunda LNCaP hücre hattında

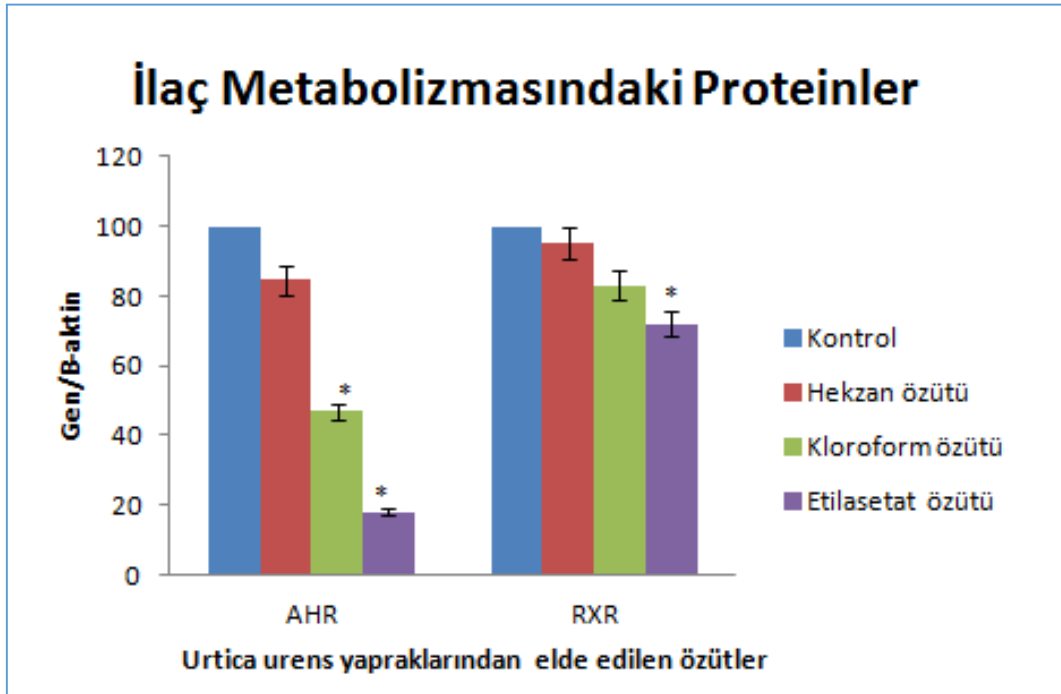
c-MYC protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %9 ve %10 azalma gözlenirken; kloroform uygulamasında %64 artış elde edilmiştir. KRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %7, %17 ve %37 artış gözlemlenmiştir. HRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan özütü uygulamasında %49 artış elde edilirken; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %24 ve %18 azalma elde edilmiştir. PTEN protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %147, %149 ve %109 artış tespit edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak, P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan, kloroform etil asetat özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %43, %96 ve %68 artış elde edilmiştir (Şekil 3.67).



Şekil 3. 67. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion

Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

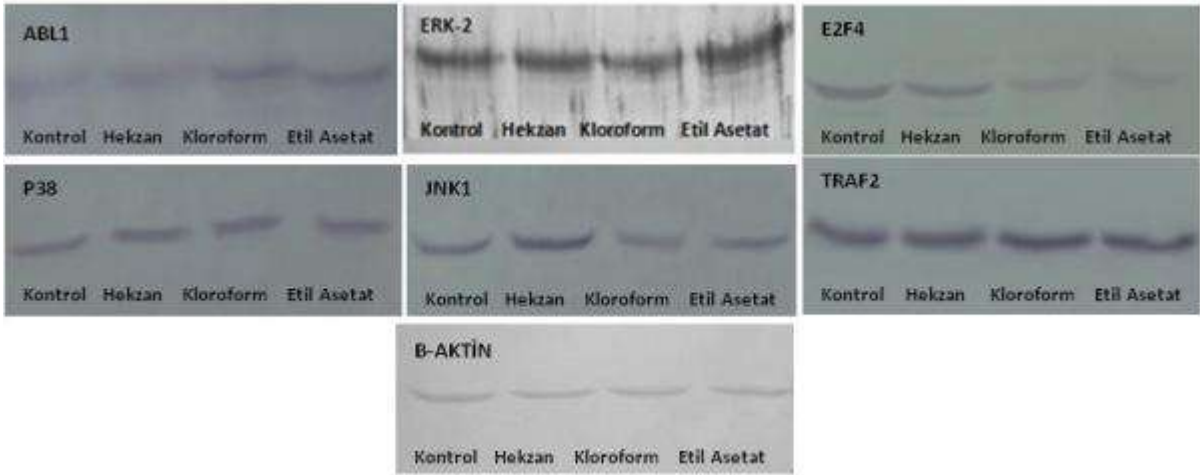
LNCaP hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR ve RXR protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. AHR protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri için sırasıyla %16, %54 ve %82 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde RXR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %22, %24 ve %39 azalma elde edilmiştir (Şekil 3.68).

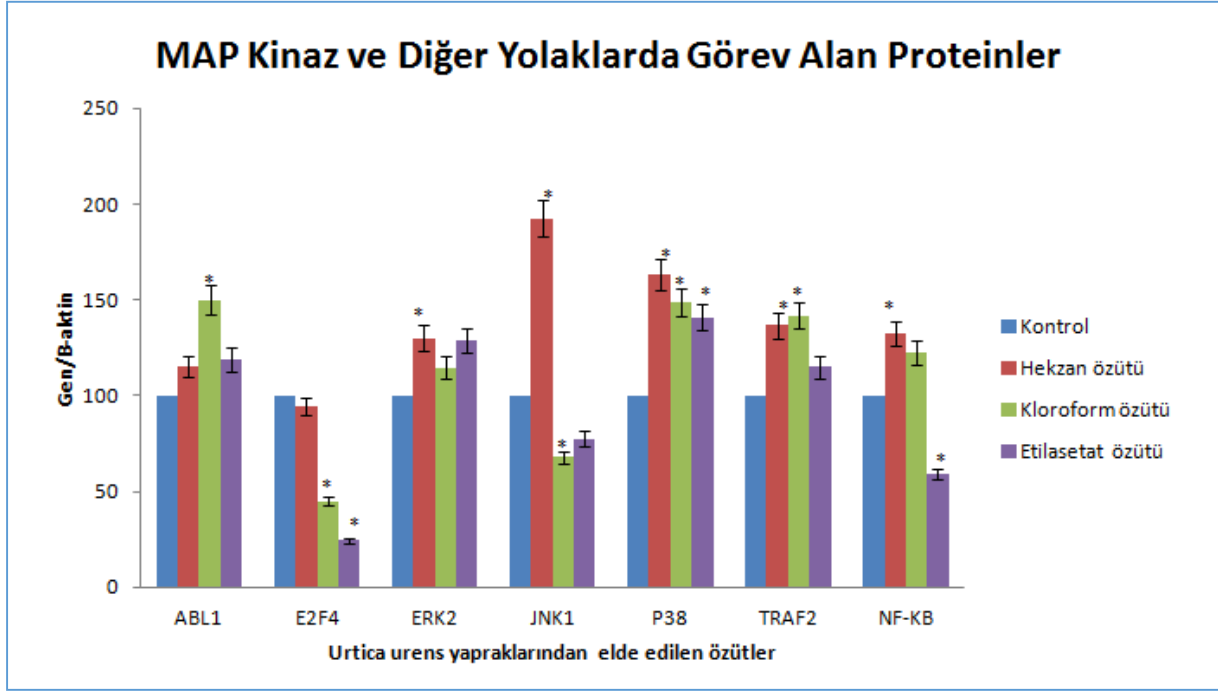


Şekil 3. 68. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Tüm bunlara ek olarak LNCaP hücre hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerden ABL1, E2F4, ERK2, JNK1, P38, TRAF2 ve NF-KB protein seviyelerindeki

değişimlere bakılmıştır. LNCaP hücre hattında hekzan; kloroform ve etil asetat uygulamasıyla ABL1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde %15, %50 ve %18 artış gözlemlenmiştir. E2F4 protein seviyesinde de hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri için sırasıyla %6, %56 ve %76 azalma gözlemlenmiştir. ERK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde %30, %15 ve %28 artış gözlemlenmiştir. JNK1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan özütü uygulamasında %92 artış elde edilirken; kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %33 ve %23 azalma elde edilmiştir. Nf-KB protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan ve kloroform özütü uygulamasında sırasıyla %32 ve 22 artış elde edilirken; etil asetat uygulamasında %41 azalma elde edilmiştir. TRAF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasında sırasıyla %37, %42 ve %15 artış gözlemlenmiştir. Son olarak da P38 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan, kloroform ve etil asetat özütleri uygulamasında sırasıyla %63, %48 ve %40 artış elde edilmiştir (Şekil 3.69).

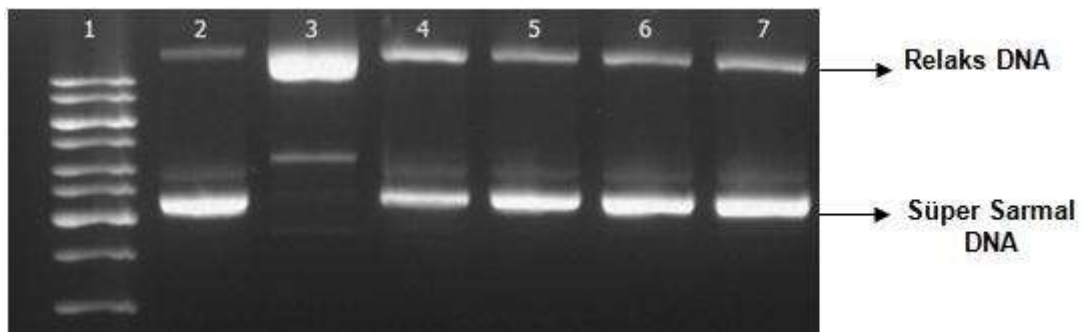




Şekil 3. 69. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

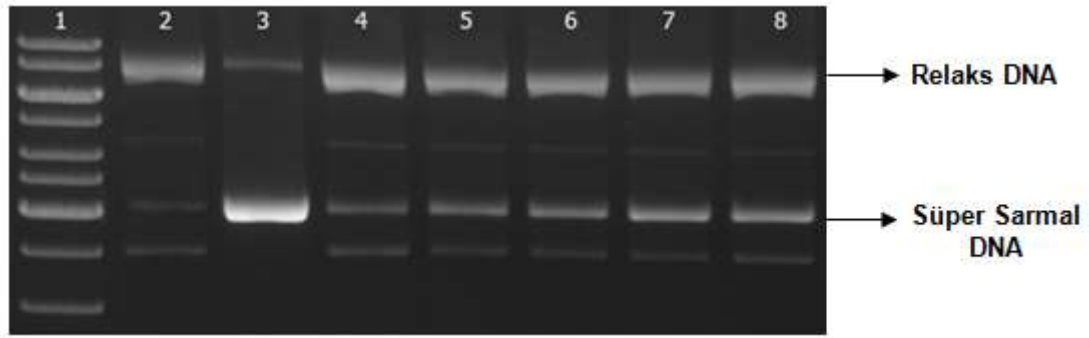
3.1.1.6 *Urtica urens* Yaprak Özütlerinde Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*)'dan elde edilen hekzan, kloroform ve etilasetat özütlerinin Topoizomeraz I ve II üzerine olan inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Şekil 3.70-3.72).

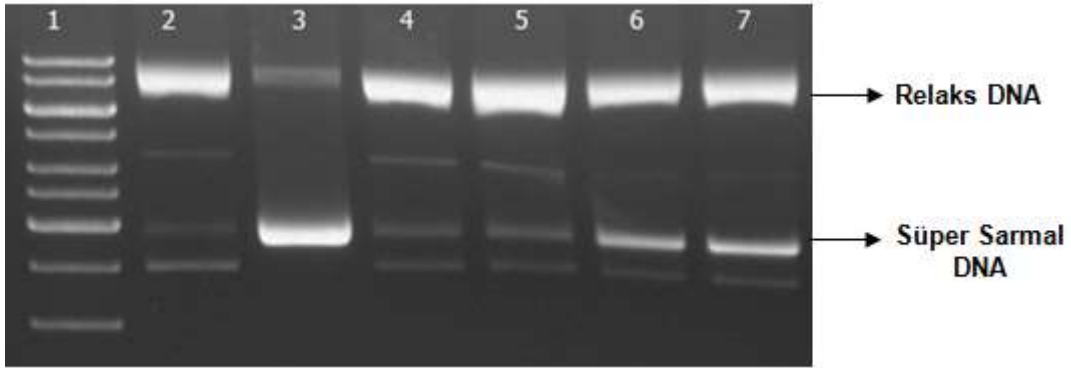


Şekil 3. 70. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,3 µg pBR 322 DNA + 0.1 %

DMSO; Kuyucuk 3: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz +0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-7: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 5, 12.5, 25, 50 µg/ml Hekzan özütü.

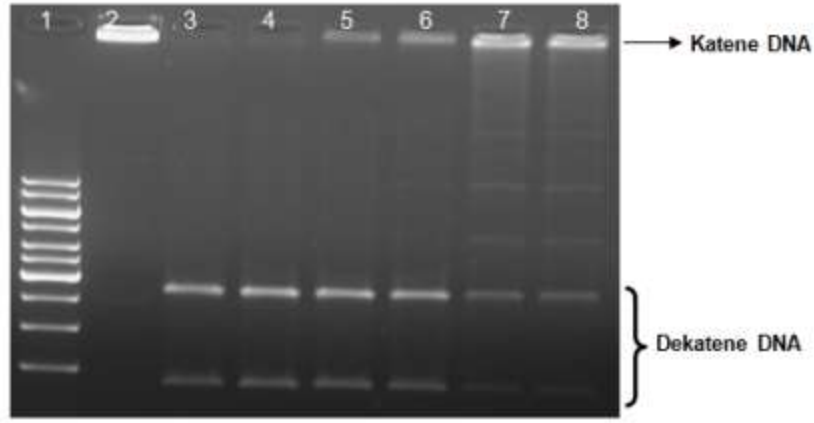


Şekil 3. 71. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,3 µg pBR 322 DNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 5, 12.5, 25, 50,100 µg/ml Kloroform özütü.

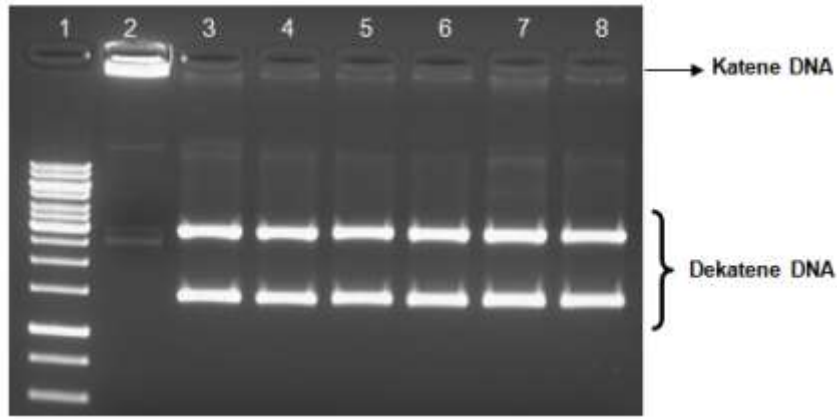


Şekil 3. 72. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,3 µg pBR 322 DNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-7: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 5, 12.5, 25, 50 µg/ml Etil asetat özütü

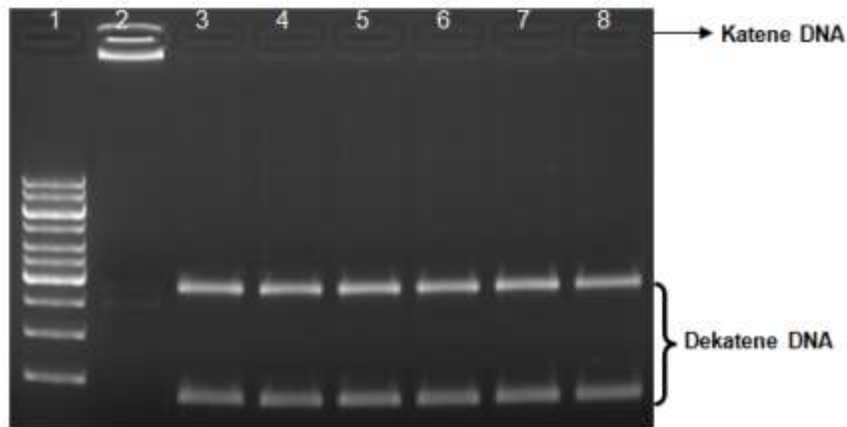
Ayrıca Tip II topoizomeraz enzimi ile yapılan topoizomeraz dekatasyon testleri ile ısırgan otundan elde edilen özütlerin herhangi bir inhibisyon etkisi olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.73-3.75).



Şekil 3. 73. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının hekzan özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,35 µg kDNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,35 µg kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 5, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml hekzan özütü.



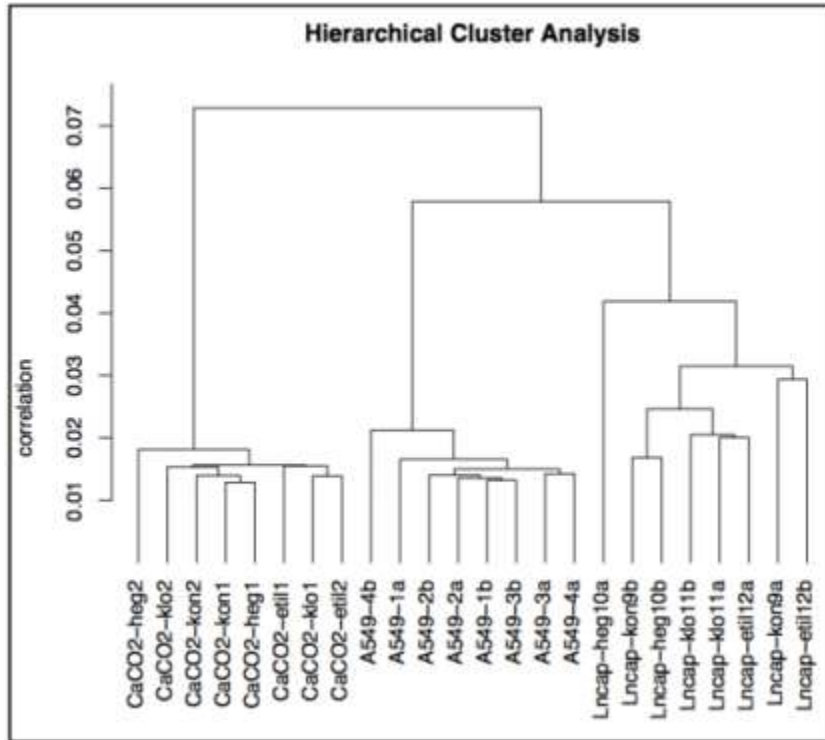
Şekil 3. 74. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının kloroform özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,35 µg kDNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,35 µg kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 5, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml kloroform özütü.



Şekil 3. 75. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu yapraklarının etil asetat özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,35 µg kDNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,35 µg kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 5, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml etil asetat özütü.

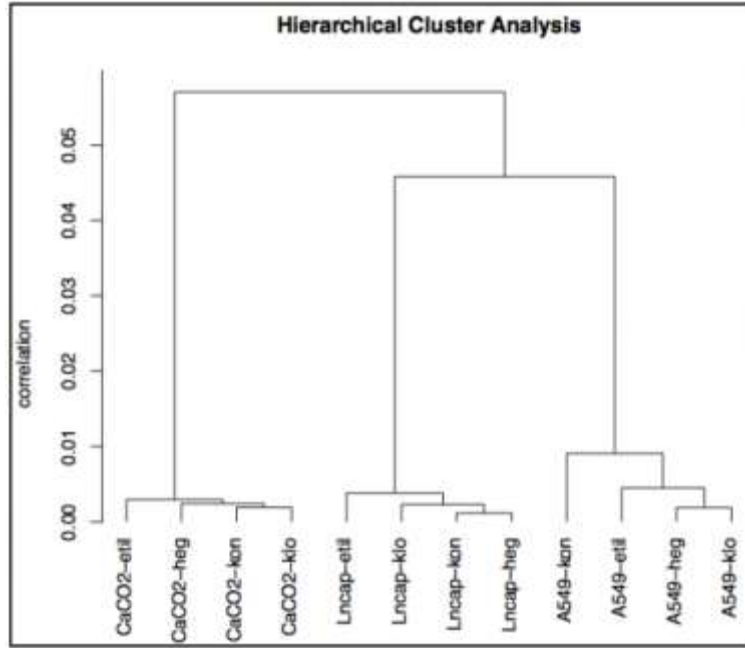
3.1.1.7 Tüm Genom Transkriptome Çalışmaları

Çalışma kapsamında A549, Caco-2 ve LNCaP hücrelerinde aktif özütlerin tüm gen ifade profilleri 47 binden fazla prob kullanılarak genom boyu transkriptlerin miktarını tespit eden Illumina Human HT-12V4 mikroçipi ile elde incelenmiştir. Ham mikrodizi verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arkaplan gürültüsü uzaklaştırılmış ve tüm örneklerin verisi yüzdeler (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra normalize edilen verilere analiz basamaklarında kullanılmak üzere Log transformasyonu uygulanmıştır. Tüm bunlara ek olarak normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik kümeleme analizleri 'Correlation-average' yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.76-3.77).



Şekil 3. 76. Özütlerden elde edilen alt fraksiyonların hiyerarşik kümeleme analizi.

Ayrıca teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob ışımalarının ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 3. 77. Özütlerin hiyerarsiş kümeleme analizi.

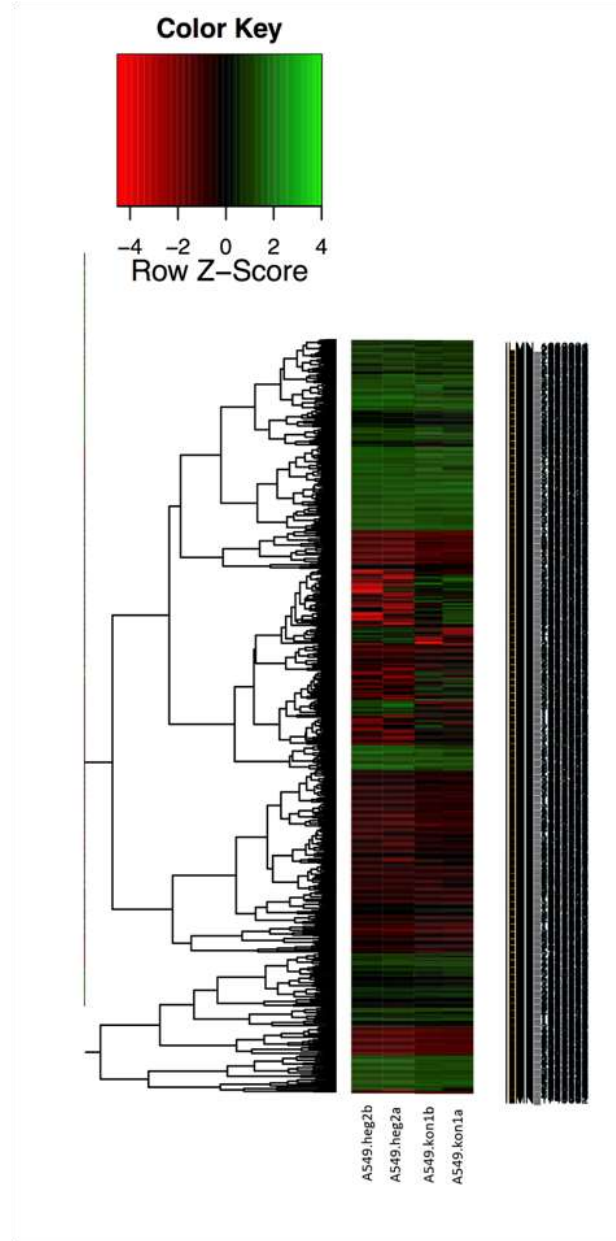
Ön analizin tamamlanmasından sonra elde edilen veriler kullanılarak oluşturulan örnekler gruplandırılarak diferansiyel ekspresyon analizi yapılmıştır. Farklı gen anlatımı gösteren problemlerin belirlenmesinde RankProduct metodu kullanılmıştır. Analizler yapılırken 3 ana grup kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Her grup içerisinde ise üç test örneği kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada örnek bazında sadece teknik replikalar altgrupları oluşturduğundan dolayı; problemlerin ekspresyon ölçümlerindeki 'kat değişim' (Fold Change) miktarları göz önünde bulundurulmuştur. Aşağıdaki tabloda örnekler ve bu örneklerin kontrol örneklerine göre kat değişim limitleri ve bu limitin üzerinde değişim gösteren problemlerin sayısı verilmiştir (Tablo 3.21).

Tablo 3. 21. Örneklede değişim gösteren prob sayısı.

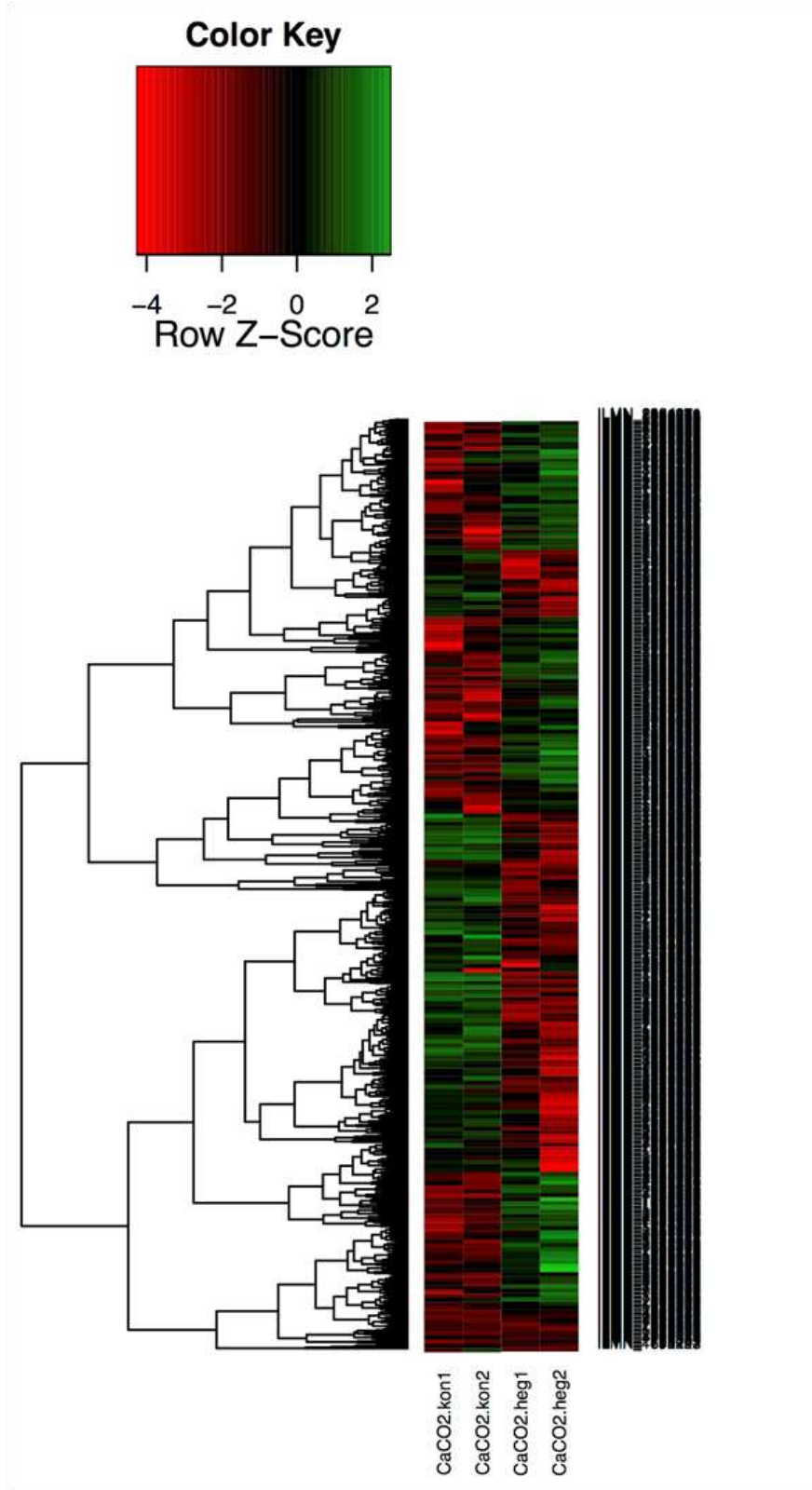
Test örneği	Kontrol örneği	Tespit edilen prob sayısı
A549-hekzan	A549-kontrol	613
A549-kloroform	A549-kontrol	1003
A549-etil asetat	A549-kontrol	1623
CaCO2-hekzan	CaCO2-kontrol	223
CaCO2-kloroform	CaCO2-kontrol	233
CaCO2-etil asetat	CaCO2-kontrol	275

LnCap-hekzan	LnCap-kontrol	1051
LnCap-kloroform	LnCap -kontrol	847
LnCap-etil asetat	LnCap -kontrol	1320

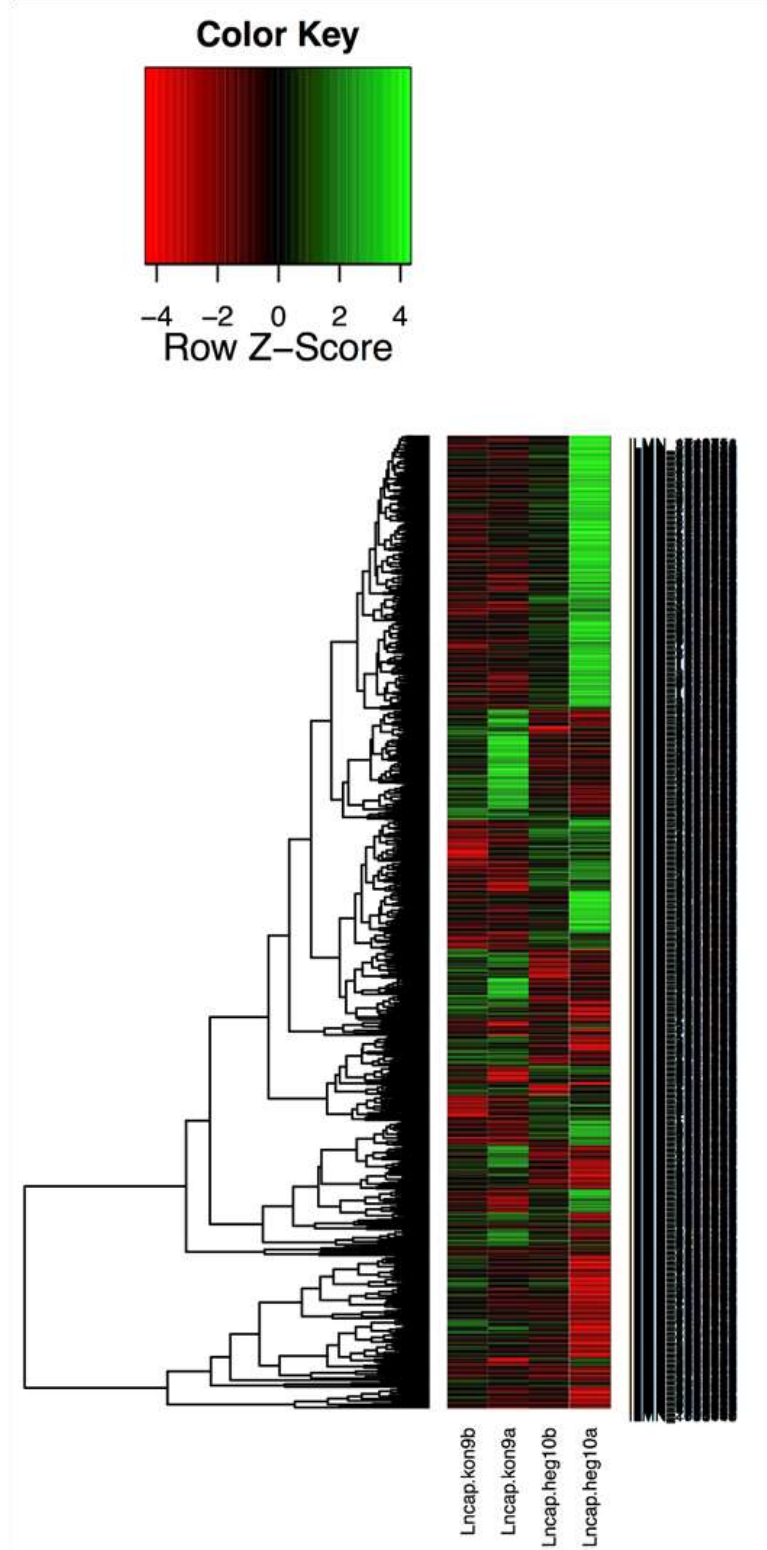
Her ikili karşılaştırmada anlamlı değişim tespit edilen yukarıdaki tabloda sayıları verilen problar ve ekspresyon seviyeleri kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme genlerin ve örneklerin ekspresyon paternlerine göre gruplandırılması yapılmıştır. Kümeleme sonucu ile ekspresyon skalaları kullanılarak 9 adet 'heatmap' olarak oluşturulmuştur. Bunlardan her hücre hattında 1 adet olmak üzere toplam üç tanesi raporumuzda verilmiştir (Şekil 3.78-3.80)



Şekil 3. 78. Tüm Genom transcriptome analizleri sonucunda A549 hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heat map analizi.



Şekil 3. 79. Tüm Genom transcriptome analizleri sonucunda Caco-2 hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heat map analizi.



Şekil 3. 80. Tüm Genom transcriptome analizleri sonucunda LnCap hücre hattında hekzan özütü uygulanması sonucu değişen genlerin (probların) ekspresyon değerleri yansıtan heat map analizi.

Değişen genlerin yolak ve zenginleştirme analizleri hedef mRNA setlerinin t-test yöntemi ile çıkartılması ve bu mRNA'ların hedef genlerine yönelik yolak, ortak protein bölgesi ve GO (GeneOntology) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Anlamlı olarak değişen mRNA'ların hedeflediği



gen listeleri internet tabanlı TheDatabase for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) kullanılarak birbirleriyle alakalı genlerin biyolojik anlamları kümelenecek bulunmaya çalışılmıştır. Bu analizlerin sonucunda; Caco-2 hücre hattında ısırgan otundan elde edilen hekzan, kloroform ve etil asetat özütlerinin değişimlere yol açtığı metabolik yolların analizleri gerçekleştirilmiştir. Hekzan uygulaması sonucunda anlamlı olarak değişen 223 genin yolak analizleri sonucunda insulin salınımı, protein kinaz yolları, apoptoz, gametogenesis, glutathione metabolizması, metal taşınımı ve metabolizması gibi 44 tane yolda bulunan genlerin anlamlı bir şekilde değiştiği saptanmıştır. Değişen tüm yollara ait sonuçlar <http://sevkiarslan.com/report> web adresinde verilmiştir. Bu özütün yanı sıra kloroform özütünün de metabolik yollara olan etkisi tüm genome transkriptom analizi ile bu dönemde belirlenmiş olup 233 adet anlamlı şekilde değişen genin yolak analizleri sonucunda 25 tane yolağın değiştiği belirlenmiştir. Bu yollar arasında, kalsiyum iyon metabolizması, hücre migrasyonu, protein kinaz yolları, protein katabolizması, apoptoz gibi yollar bulunmaktadır. Değişen tüm yollara ait sonuçlar [web adresinde](#) detaylı olarak verilmektedir. Diğer yandan etil asetat uygulaması sonucunda değişen 275 genin yolak analizleri sonucunda apoptoz dahil 38 adet yolak da değişiklikler oluşmuştur (WEB ADRESİ). Tüm sonuçlar daha önce verilen ve bu proje döneminde verilen real time PCR ve western blot analizleri ile örtüşmektedir.

A549 hücre hattında hekzan uygulaması sonucunda değişen anlamlı 613 adet gen ile yapılan yolak analizleri sonucunda 107 fonksiyonel küme bulunmuştur. Analizler sonucunda apoptoz, anjiyogenez, karbonhidrat, yağ, streol ve kolesterol, protein kinaz, vitamin A ve Karetonoid metabolizması gibi metabolik yollar hekzan uygulanması sonucunda değişmektedir. Değişen tüm yollar [web adresinden](#) verilmektedir. Tüm bu sonuçlar daha önce elde ettiğimiz Real Time PCR ve western blot sonuçları ile de örtüşmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlarla bu özütün A549 hücre hattında birçok değişik metabolik yolağında değiştirdiği ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Benzer şekilde A549 hücre hattında kloroform özütü uygulaması sonucunda 1003 adet değişen genin analizleri bu dönemde gerçekleştirilmiş ve 124 tane yolağın bu genlerle ilişkili olduğu yani 124 tane yolağın bu özüt uygulanması sonucunda değiştiği belirlenmiştir. benzer şekilde, apoptoz dahil bir çok metabolik yolak kloroform özütü sonucunda değişmekte ve bu değişimler daha önce yaptığımız mRNA ve protein çalışmaları ile paralellikler göstermektedir. Değişen tüm yollar [web adresinden](#) verilmektedir. Diğer yandan etil asetat uygulaması sonucunda değişen 1623 adet genin ileri analizi sonucunda apoptoz, hücre döngüsü, kan pıhtılaşması, enerji metabolizması, glikoz taşınması, nükleotid metabolizması, kemik minerilizasyonu gibi 161 değişik yolda değişimler saptanmıştır. Daha önce yaptığımız ve apoptoz yolağında görev



alan proteinlerin mRNA ve protein seviyelerini belirlediğimiz PCR ve Western blot çalışmaları ile elde edilen sonuçlar uyusmaktadır.

Caco-2 ve A549 hücre hatlarına ek olarak elde edilen özütlerin hangi metabolik yolları değiştirdiği LNCap hücre hattında da belirlenmiştir. Hekzan özütü uygulaması toplam 1051 genin mRNA seviyesinde değişimlere sebep olduğu saptanmıştır. İleri yolak analizleri sonucunda bu genlerin apoptoz, kan pıhtılaşması, cAMP üretim mekanizması, glikoz taşınımı gibi 125 değişik yolda bulunduğu saptanmıştır. Yollara ait değerler [web adresinde](#) verilmektedir. Benzer şekilde kloroform özüt uygulaması sonucunda değişen 847 adet genin yolak analizleri sonucunda 91 adet yolak değişmiştir. Bunların arasında apoptoz karbonhidrat, glikoz ve glikojen metabolizması, DNA hasar tamir yolağı gibi değişik yollar bulanmaktadır. Tüm bu yollar [web adresinde](#) verilmiştir. Etil asetat uygulanması sonucunda ise toplam 1320 mRNA da değişiklik saptanmıştır. Yolak analizleri yapıldığında ise toplam 126 adet yolağın değiştiği saptanmıştır. Tüm yollara ait veriler [web adresinde](#) verilmektedir.

Elde edilen sonuçlar, daha önceki rapor döneminde ve bu rapor döneminde verilen sonuçlarla paralellikler göstermektedir. Ayrıca yolak analizleri ile özütlerin değiştirebileceği muhtemel metabolik yollar bu çalışma ile ortaya konmuştur.

3.1.2 Tohum Özütlerinin Hazırlanması ve İlgili Çalışmalar

3.1.2.1 Özütlerin Hazırlanması

Yaklaşık 350 gram ısırgan otu tohumu değirmenden geçirilerek parçalandı ve bitki materyali 2 litrelik kavanozlara eşit şekilde konuldu ve üzerine hekzan çözücüsü eklenerek serin güneş almayan bir yerde sürekli karıştırılarak meserasyona bırakıldı (Şekil 3.81) 3 gün arayla hekzan ekstraları süzöldü ve üzerine tekrar hekzan çözücüsü eklendi. Bu işlem dört defa tekrarlandı. Daha sonra bitki materyalinin üzerine sırasıyla kloroform, etil asetat ve metanol çözücöleri eklenerek yine üçer gün ara ile dört defa her bir çözücü ile ekstraksiyona tabii tutuldu. Her ekstranın çözücüsü evapore edildi. Elde edilen ekstraların çözücöleri evapore edildi ve tartıldı (Tablo 3.81).

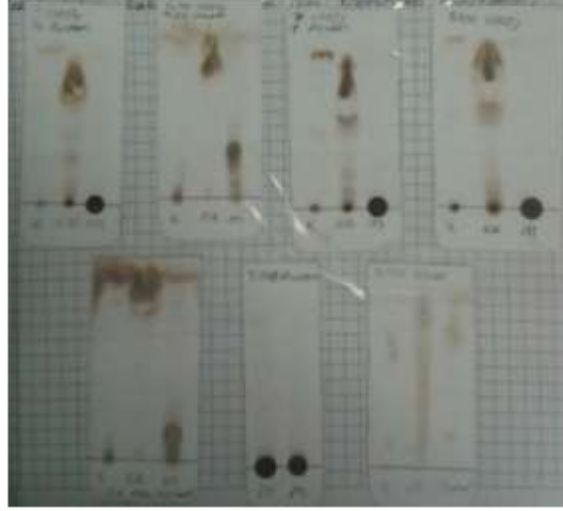


Şekil 3. 81 *Urtica urens* tohumunun çözücü ile ekstraksiyonu (meserasyon).

Tablo 3. 22. Isırgan otu'nun fraksiyonlandırması ve elde edilen ekstrakt miktarları

Çözücü	Harcanan çözücü (L)	Fraksiyon miktarı	Verim (%)
Hekzan (katı)	5	30.62 gr	11.43
Hekzan (yağ)	5	60 ml	15.42
Kloroform	5	18.98 gr	5.42
Etil asetat	4	3.25 gr	0.92
Metanol	5	8.38 gr	2.39

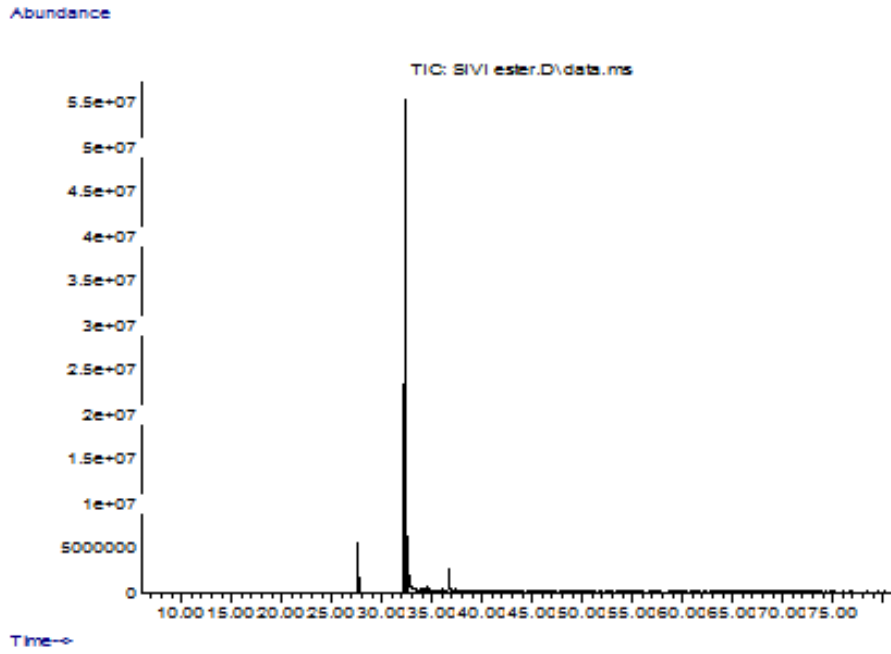
Balonlarda toplanan ekstraktlar silika jel kaplı hazır ince tabaka alüminyum plakalara (İTK silicagel 60 GF₂₅₄ Merck) tatbik edilerek uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Maddelere ait spotlar UV (254 nm) ışık altında incelendi. Spot renklerini daha iyi görebilmek için silika jel plakalarına seriksülfat belirteci püskürtülüp ısıtıcıda 100°C'de oluşan spot renkleri incelendi ya da içerisinde % 10'luk H₂SO₄ içeren etanol belirteci püskürtülüp 135 °C lik sıcaklıkta ısıtıldı ve oluşan renkler değerlendirildi. Bu işlemler sonucunda elde edilen sonuçlar bakıldığında kloroform, metanol ve etil asetat özütleri benzer profillere sahip olduğundan birleştirilerek fraksiyonlama ve madde izolasyonu işlemlerine başlandı ve hali hazırda bu işlemler devam etmektedir (Şekil 3.83). Ayrıca Elde edilen özütlerde çok fazla şekere rastlanmıştır. Bu özellikle madde izolasyonlarında problemlere yol açmıştır.



Şekil 3. 82. Kloroform, Etilasetat ve Metanol ekstralarının İTK görünüşleri.

3.1.2.2 GC-MS Analizi

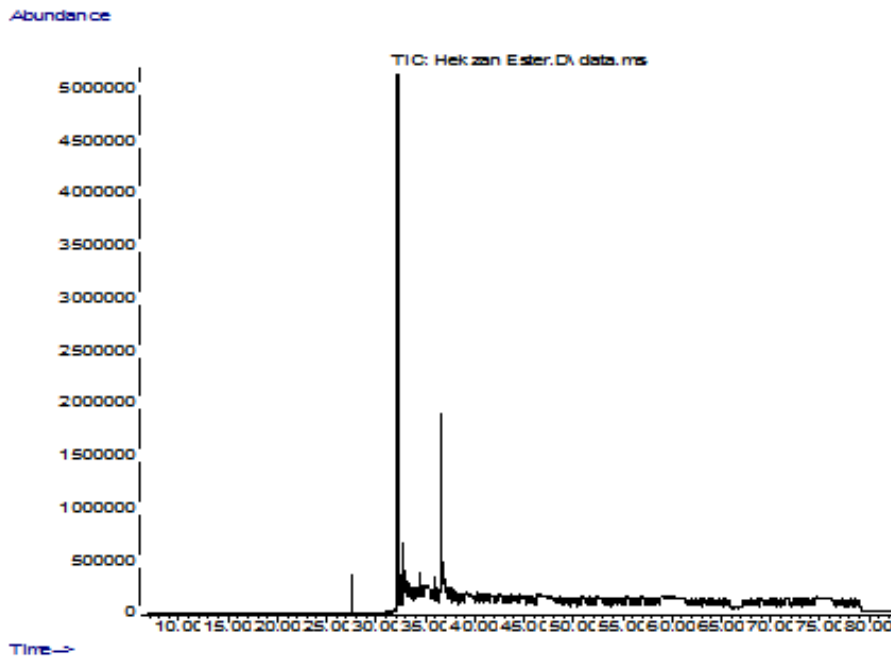
Apolar karaktere sahip özütlerin (hekzan katı ve yağ kısmı) GC/MS analizi 16'lık otosampler içeren Agilent Technologies 7890 A model GC system 5975 C inert MSD with triple-axis dedector marka kütle spektrometresinde HP5-MS kolonu (60 m x 320 m x 0.25 m) kullanılarak yapıldı. Bileşiklerin tanımlanması Famedb23, Famd, bwax ve NIST05a gibi ticari kütüphanelerinde taranması ile belirlendi. Hekzan katı ve yağ özütlerinin GC-MS sonucunda saptanan maddelere ait sonuçlar ve GC kromatogramları aşağıdaki şekillerde verilmektedir (Şekil 3.83-3.85). Buna göre, tespit edilen bileşenleri gösteren tablolar aşağıda verilmektedir (Tablo 3.23-3.25).



Şekil 3. 83. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin esterlenmesi sonucunda elde edilen GC kromotogramı.

Tablo 3. 23. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin içerik analizi.

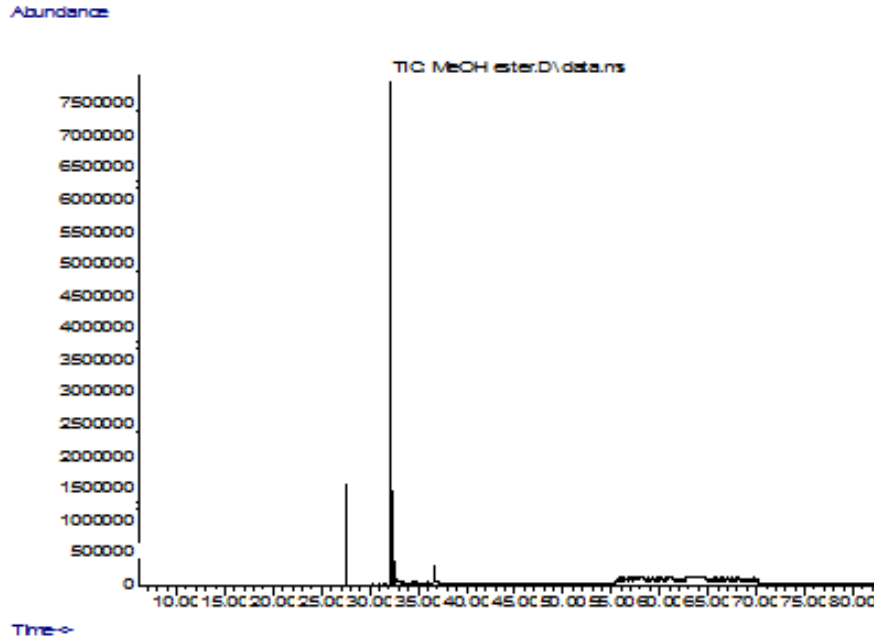
Alıkonma Zamanı	Birleşik adı	% Alan
27.636	Hexadecanoic acid, methyl ester	7.97
32.288	9,12-Octadecadienoic acid	86.17
32.585	Octadecanoic acid, methyl ester	5.83



Şekil 3. 84. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin esterlenmesi sonucunda elde edilen GC kromotogramı.

Tablo 3. 24. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin içerik analizi.

Alıkonma Zamanı	Birleşik adı	% Alan
27.573	Hexadecanoic acid, methyl ester	5.00
32.173	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	42.31
32.242	9-Octadecanoic acid, methyl ester	7.70
32.562	Stearic acid, methyl ester	1.91
32.700	Linoleic acid	21.99
36.631	Isopropyl linoleate	21.09



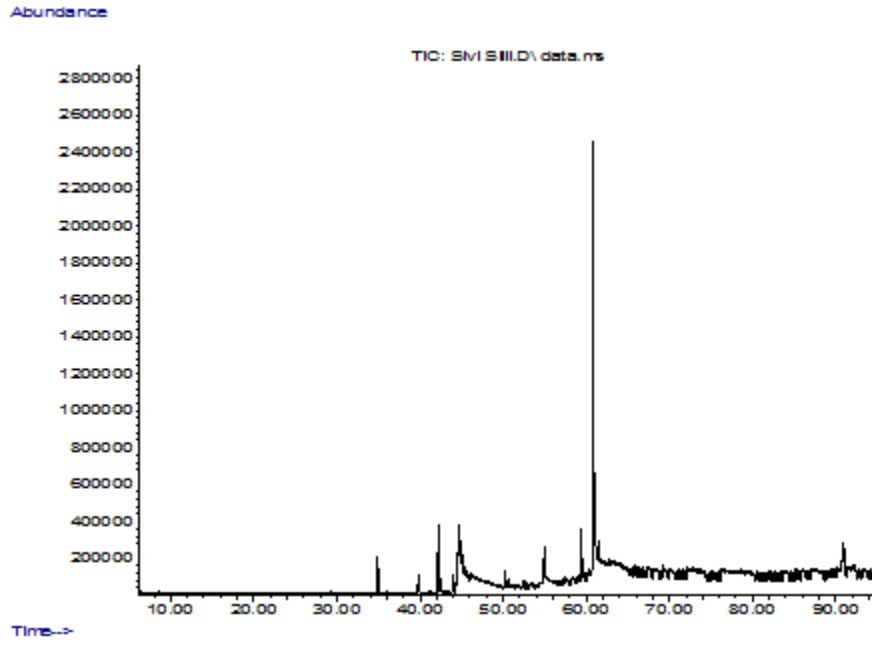
Şekil 3. 85. Katı Kısım Metanol kısmının esterlenmesi sonucunda elde edilen GC kromatogramı.

Tablo 3. 25. Katı Kısım Metanol Ekstresinin içerik analizi.

Alıkonma Zamanı	Birleşik adı	% Alan
27.584	Hexadecanoic acid, methyl ester	20.79
32.208	Linoleic acid, methyl ester	63.37
32.259	Oleic acid, methyl ester	8.97
32.562	Oleic acid, methyl ester	2.15

Belirlenen maddelerin azlığından dolayı **Sililleme prosedürü** kullanılarak aynı özütlerin GC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde, bileşiklerin tanımlanması Famedb23, Famed, bwax ve NIST05a gibi ticari kütüphanelerinde taranması ile belirlendi. Silillenme reaksiyonları sonucunda elde edilen özütlere ait GC-MS sonuçları ve GC kromatogramları aşağıdaki şekillerde verilmektedir (Şekil 3.86-3.88). Buna göre, Yağ kısmın Hekzan ekstresinde silillenme sonucunda 6 adet daha majör bileşen tespit edilmiştir (Tablo 3.26). Katı Kısım

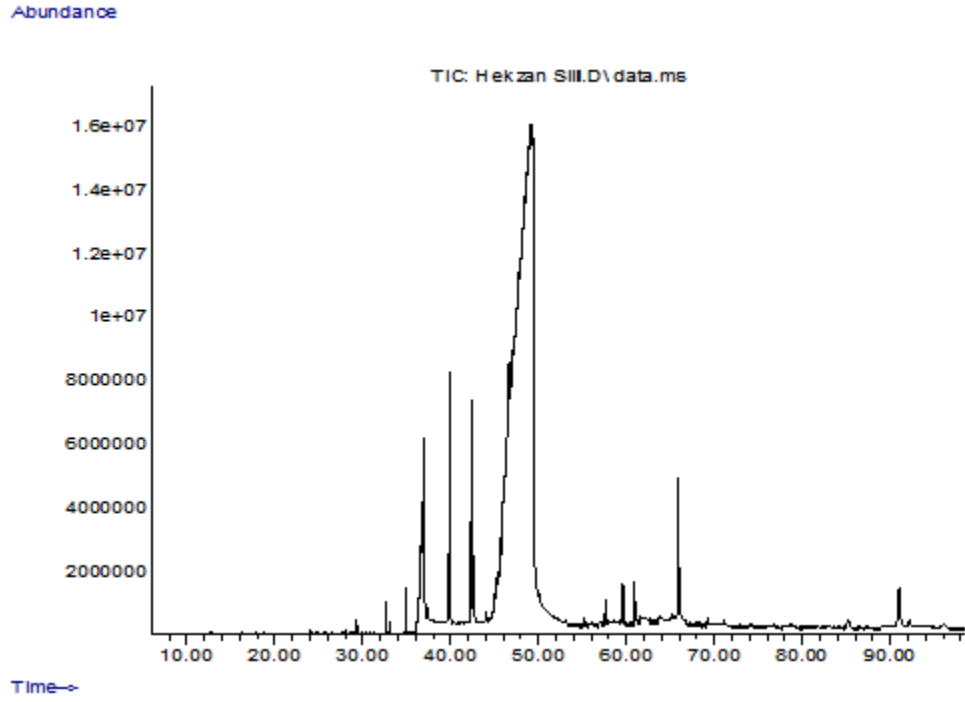
Hekzan Ekstresinde ise 12 adet bileşen tespit edilmiştir (Tablo 3.27). Bunlara ek olarak Katı Kısım Metanol Ekstresinde 19 adet bileşen tespit edilmiştir (Tablo 3.28).



Şekil 3. 86. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda elde edilen GC kromotogramı.

Tablo 3. 26. Yağ Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda içerik analizi.

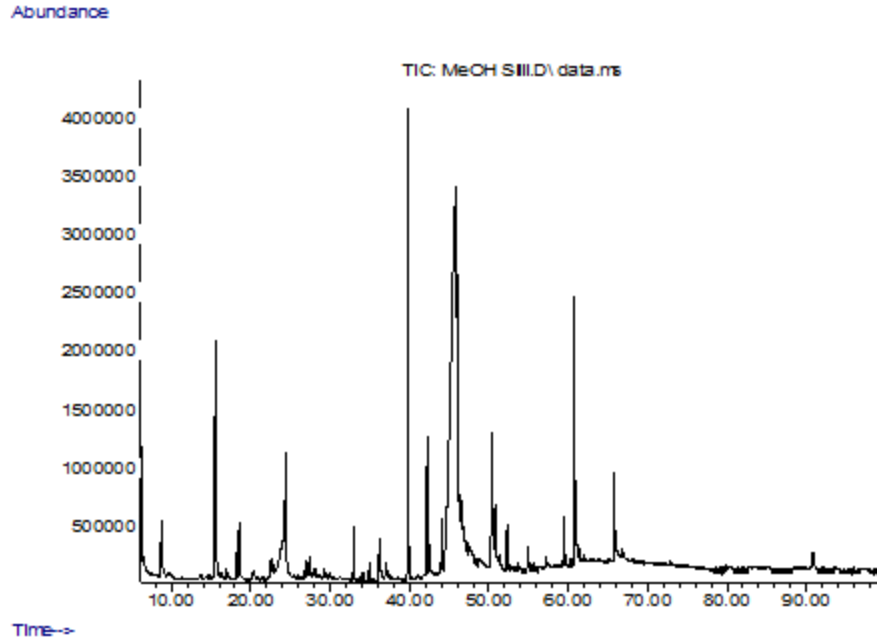
Alıkonma Zamanı	Birleşik adı	% Alan
34.920	Hexadecanoic acid	4.03
42.210	9,12-Octadecadienoic acid, TMS	6.20
44.029	Octadecanoic acid	1.84
44.670	Linoleic acid	24.28
50.289	9,12-Octadecadienoic acid	1.91
54.947	Dipalmitin	3.07
59.450	Linolenic acid	4.99
60.795	Butyl 9,12-octadecadienoate, TMS	45.70
90.904	beta-Sitosterol	6.04



Şekil 3. 87. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda elde edilen GC kromotogramı.

Tablo 3. 27. Katı Kısım Hekzan Ekstresinin silillenmesi sonucunda içerik analizi.

Alıkönma Zamanı	Birleşik adı	% Alan
29.324	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid, TMS	0.14
32.677	Tetradecanoic acid, TMS	0.17
36.997	Hexadecanoic acid methyl ester	4.59
37.449	Octadecanoic acid	0.19
39.944	Hexadecanoic acid, TMS	2.34
42.456	Linoleic acid, methyl ester	3.30
46.661	Linoleic acid	85.13
55.187	13-Docosenoic acid	0.17
57.699	Oleamide	0.19
59.599	β -Monoolein TMS	0.42
65.910	1-Monolinolein, TMS	1.86
91.035	beta-Sitosterol	0.75



Şekil 3. 88. Katı Kısım Metanol Ekstresinin silillenmesi sonucunda elde edilen GC kromotogramı.

Tablo 3. 28. Katı Kısım Metanol Ekstresinin silillenmesi sonucunda içerik analizi.

Alıkonma Zamanı	Birleşik adı	% Alan
8.730	Propanoic acid, 3-(trimethylsilyl)-, ethyl ester	1.36
15.540	5-Hydroxymethylfurfural	5.85
18.126	9-Oxabicyclo[3.3.1]nona-2-ene, 6-acethylthio	0.34
18.378	Epoxyoleic acid	0.63
18.658	Phloroglucinol, TMS	0.69
24.437	2,2-Dimethyl-5-[2-(2-trimethylsilylethoxymethoxy)-propyl]-[1,3]dioxolane-4-carboxaldehyde	7.17
32.969	Lyxopyranose, TMS	0.55
34.914	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.17
37.077	Arabinopyranose, TMS	0.38
39.841	Hexadecanoic acid, TMS	8.24
42.227	9,12-Octadecadienoic acid	3.88
42.536	9-Octadecenoic acid, methyl ester	0.73
44.064	Myo-Inositol, TMS	1.00
45.780	Linoleic acid, TMS	51.45
50.415	9,12-Octadecadienoic acid ,TMS	5.20
52.315	Octadecanoic acid, TMS	1.09
54.975	Dipalmitin	0.31
60.795	Butyl 9,12-octadecadienoate	4.45
90.846	beta-Sitosterol	0.97



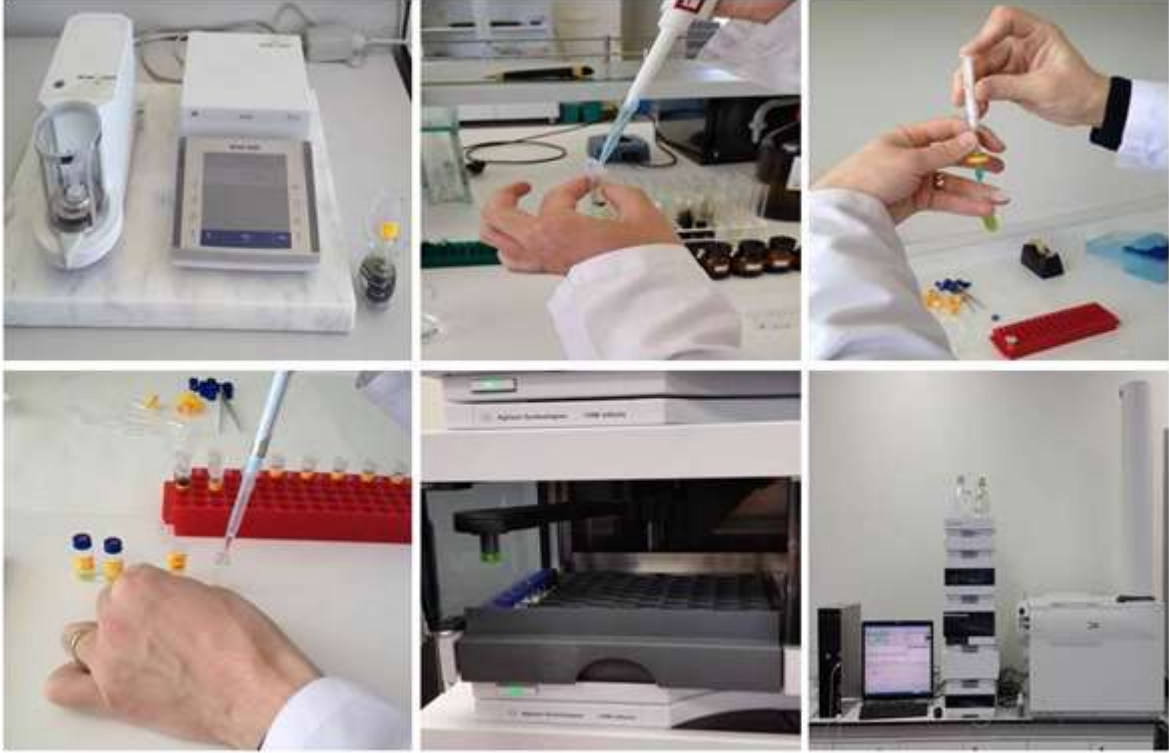
3.1.2.3 Tohum Kloroform, Etil Asetat ve Metanol Özütlerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC- TOF)

Küçük ısırgan otundan elde edilen kloroform, metanol ve etil asetat özütlerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC- TOF) analiz çalışmaları yapılmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography), analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanıma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. Sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, Agilent technologies 1260 infinity LC, Agilent technologies 6210 TOF-MS cihazından yararlanılarak, örneklerinin fenolik bileşen içeriğinin analizi gerçekleştirilmiştir. Cihazın enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 35 °C ve kullanılan kolon modeli de ZORBAX SB-C18 4,6x100mm, 3.5µm'dir. HPLC mobil faz programı aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3.29).

Tablo 3. 29. HPLC mobil faz programı.

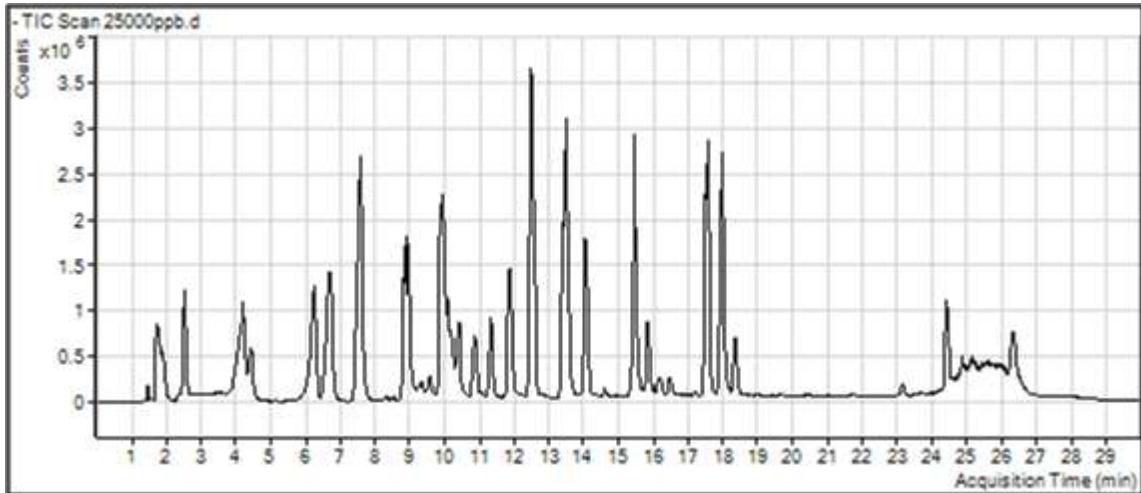
	Zaman (dk)	%0,1 Formik asitli su	Asetonitril
1	0	90%	10%
2	1	90%	10%
3	20	50%	50%
4	23	20%	80%
5	25	90%	10%
6	30	90%	10%

Her bir ekstreden 2 mg olacak şekilde hassas terazi (Mettler-Toledo)'de tartılarak 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine alınmıştır. Ekstrelelere önce 2 ml HPLC grade metanol eklenmiş ve ultrasonik su banyosu cihazında (Sellecta Ultrasons-H) çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi sonucunda 1000 ppm değerinde ve stok olarak kullanılmak üzere çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltilerden, 250 ppm konsantrasyonuna sahip, toplam hacmi 1 ml olan yeni çözeltiler hazırlandı ve HPLC-TOF/MS viallerine aktarılarak analize hazır hale getirildi (Şekil 3.89).



Şekil 3. 89. Ekstraktların HPLC-TOF/MS analizi için hazırlanma aşamaları.

Bileşenler kolonda alıkonma sürelerine ve kütle spektrallarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada salisilik asit, kersetin, kaftarik asit, gentisik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, 4-hidroksibenzaldehid, şikorik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glukozit, rosmarinik asit, protokateşuik asit ethyl ester, sinamik asit, naringenin, kamperol, gallik asit, klorojenik asit, kateşol, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, rutin, hesperidin gibi fenolik maddeler standart olarak kullanılmış ve kantitatif analzi için 25000 ppm de hazırlanan bu standartlar HPLC-TOF'a verilerek programın uygunluğu Şekil 3.90'daki gibi teyit edilmiştir. Ayrıca standartların alıkonma sürelerine ve son konsantrasyonları Tablo 3.30'de verilmektedir.



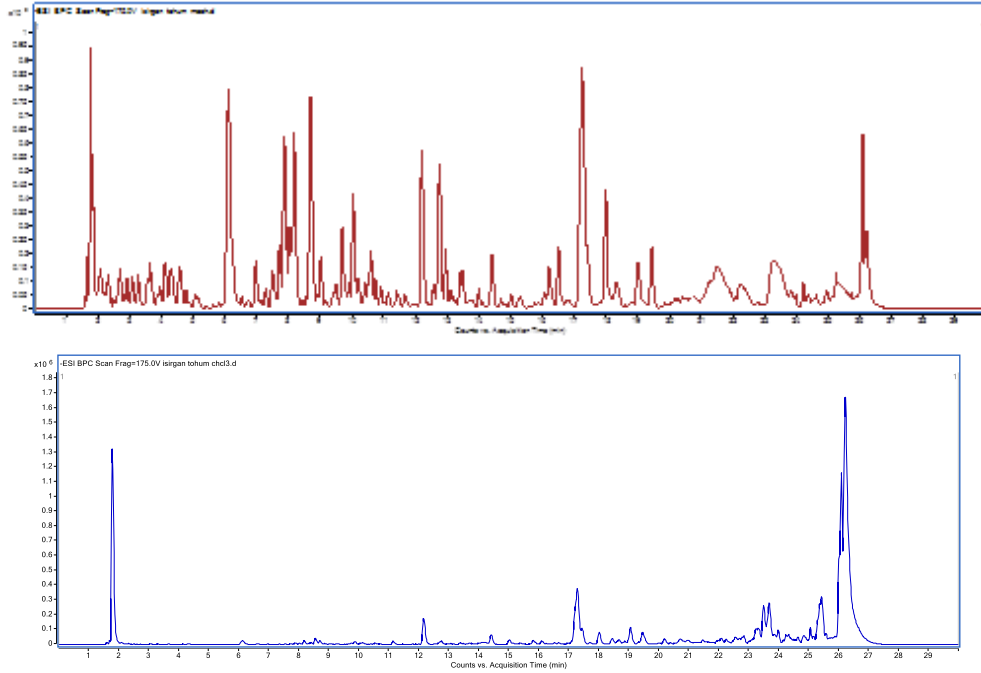


Şekil 3. 90. 25000 ppb' de Fenolik bileşik standartlarına ait HPLC-TOF kromatogramları.

Tablo 3. 30. Fenolik standartlarına ait gelme zamanı (RT) ve konsantrasyon [ppb (ng/ml)]

RT	Birleşik Adı	Son Konsantrasyon
2.52	Gallik asit	24942.84
4.20	Gentisik asit	22302.85
4.43	Kaftarik asit	24990.40
6.20	Klorojenik asit	19211.81
6.26	Kateşin	16697.06
6.56	4-hidroksibenzoik asit	14708.70
6.70	Protokateşuik asit	25009.19
7.68	Vanilik asit	12811.39
7.56	Kafeik asit	17235.66
9.01	4-hidroksibenzaldehit	3820.30
9.87	Rutin	12348.08
9.95	p-kumarik asit	13874.38
10.08	Sisorik asit	25003.42
10.87	Ferulik asit	18246.01
11.82	Hesperidin	10303.88
11.85	Apigenin-7-glukozit	7052.16
12.50	Rosmarinik asit	11287.34
13.49	Protokateşuik asit etil esteri	2514.38
13.51	Salisilik asit	24991.45
14.03	Resveratrol	14544.75
15.47	Kersetin	11799.24
16.48	Sinnamik asit	25048.12
17.48	Naringenin	6806.18
18.01	Kamferol	11085.91

Standard eğri grafikleri küçük ısırgan otunun tohumundan elde edilen özütlerin içinde bulunan aynı fenolik madde miktarlarının tayini için kullanılmıştır. Bu ham özütlere ait kromatogramlar ve edilen sonuçlar aşağıdaki şekil ve tabloda verilmiştir (Şekil 3.91 ve Tablo 3.31).



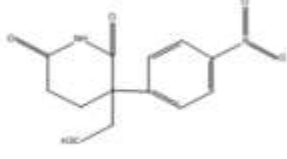
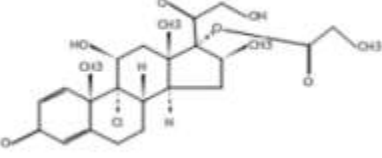
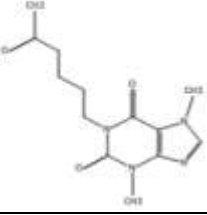
Şekil 3. 91. Isırgan Tohum-Kloroform, Etilasetat ve Metanol Ekstreleri HPLC-TOF Kromatogramları.

Tablo 3. 31. Isırgan Tohum-CHCl₃, EtOAc ve MeOH Ekstreleri HPLC-TOF/MS Sonuçları.

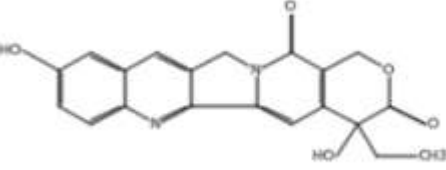
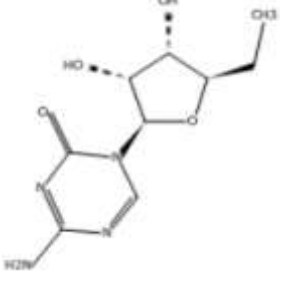
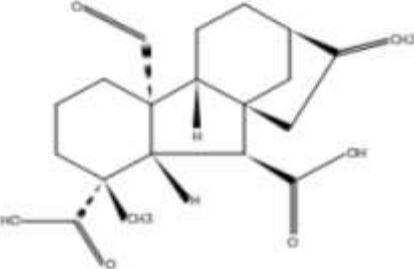
RT	Birleşik Adı	Konsantrasyon [ppb (ng/ml)]		
		CHCl ₃	EtOAc	MeOH
4.40	Gentisik asit	-	-	408.47
6.12	Klorojenik asit	1642.42	524.95	96026.98
6.34	Kateşin	-	-	178.80
6.60	4-Hidroksibenzoik asit	1.80	-	434.39
6.76	Protokateşuik asit	46.94	45.75	56.63
7.69	Kafeik asit	-	-	98.21
7.80	Vanilik asit	46.24	-	562.47
9.18	4-Hidroksibenzaldehit	-	-	34.39
9.98	p-Kumarik asit	-	-	204.86
10.07	Sisorik asit	-	9.16	52.14
10.39	Rutin	7.89	-	446.51
10.73	Ferulik asit	23.36	11.88	455.20
11.37	Hesperidin	-	-	1751.11
12.30	Apigenin-7-glukozit	-	-	596.84
13.19	Rosmarinik asit	-	-	10.58
13.96	Resveratrol	725.18	709.52	918.72
15.92	Sinamik asit	209.55	-	230.14

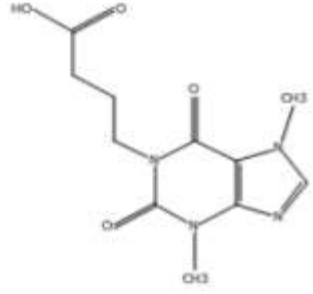
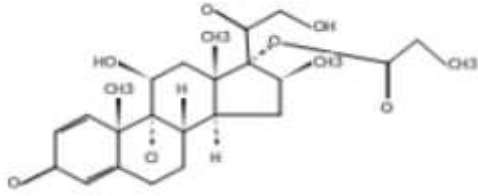
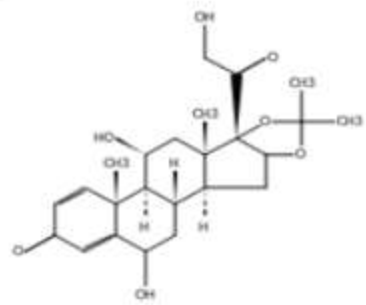
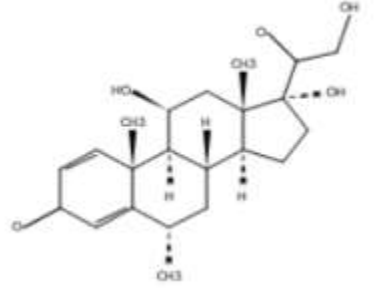
Ayrıca bu çalışmalara ek olarak LC-MS kütüphane taramaları gerçekleştirilmiş fakat yapraklara göre daha az madde bu çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Elde edilen veriler Tablo 3.32-3.34'te verilmektedir.

Tablo 3. 32. Etil asetat özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

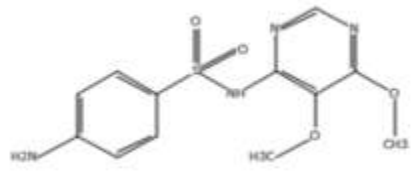
Adı	Formül	MASS	Şekil
p-Nitroglutethimide	$C_{13} H_{14} N_2 O_4$	262.0943	
17-Beclomethasone monopropionate(17-BMP)	$C_{25} H_{33} Cl O_6$	464.1988	
Pentoxifylline	$C_{13} H_{18} N_4 O_3$	278.1391	

Tablo 3. 33. Kloroform özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.

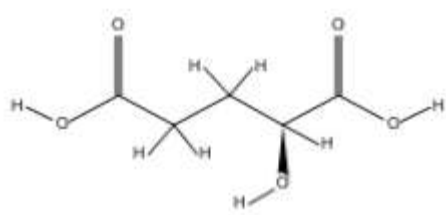
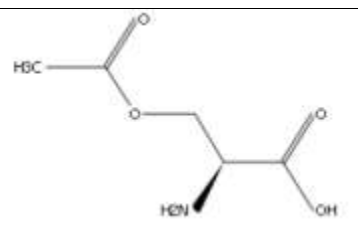
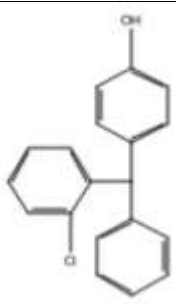
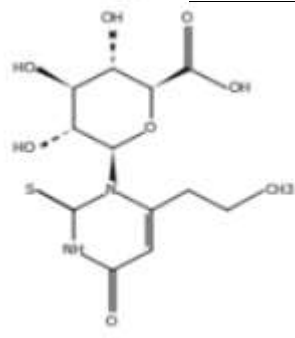
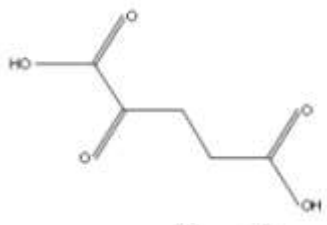
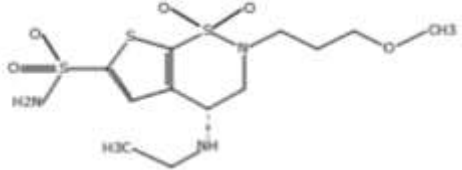
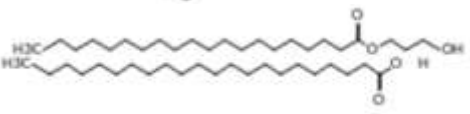
Adı	Formül	MASS	Şekil
10-hydroxycatothecin	$C_{20} H_{16} N_2 O_5$	364.1075	
Azacitidine	$C_8 H_{12} N_4 O_5$	244.0806	
Gibberellin A24	$C_{20} H_{26} O_5$	346.1772	


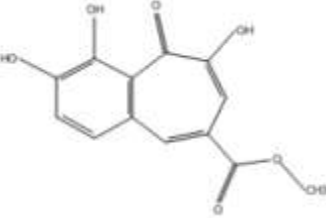
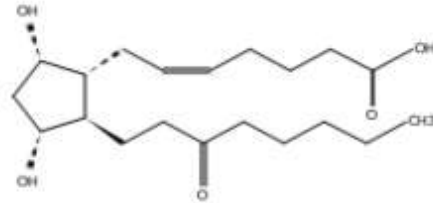
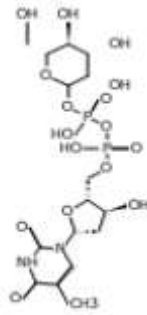

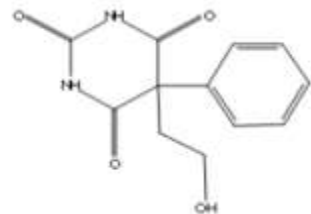
1-(3-Carboxypropyl)- 3,7- dimethylxanthine	$C_{11} H_{14} N_4 O_4$	266.1028	
17-Beclomethasone monopropionate(17- BMP)	$C_{25} H_{33} Cl O_6$	464.1977	
6b,11b,16a,17a,21- Pentahydroxypregna -1,4- diene-3,20-dione 16,17- acetonide	$C_{24} H_{32} O_7$	432.2133	
Methylprednisolone	$C_{22} H_{30} O_5$	374.2096	

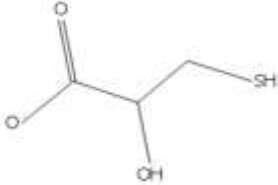
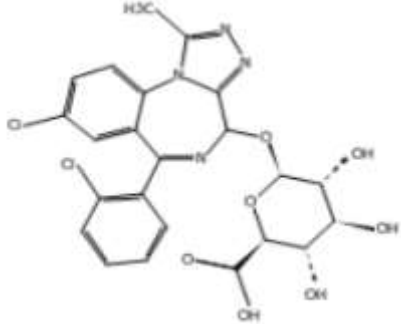
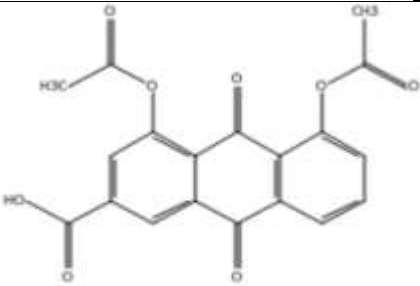
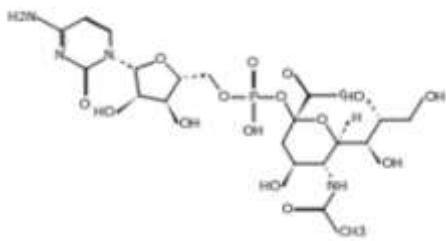
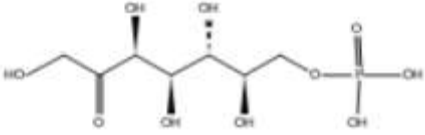
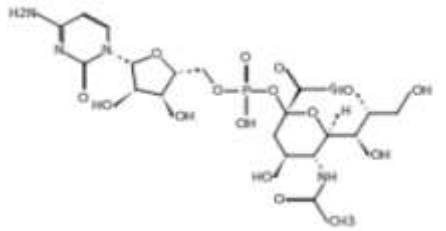
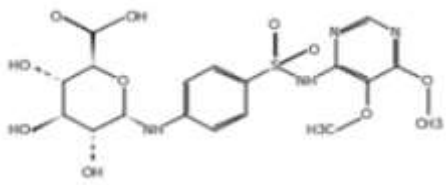
Tablo 3. 34. Metanol özütünün LC-MS kütüphane taraması sonucunda elde edilen içerik analizi.


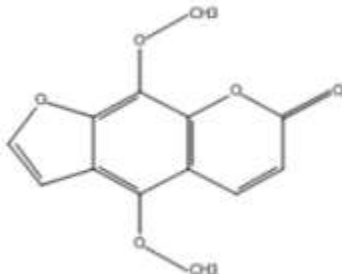
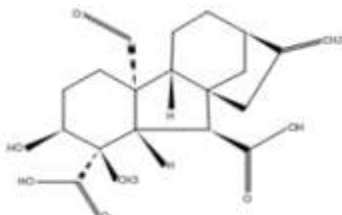
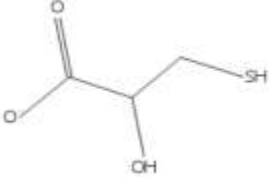
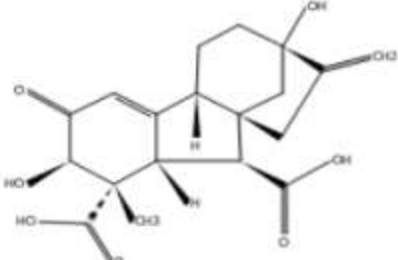
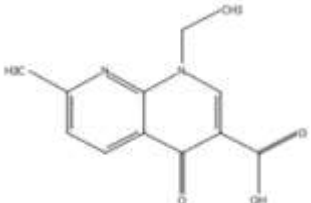
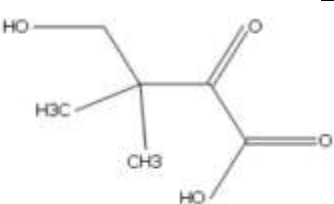
Adı	Formül	MASS	Şekil
Sulfadoxine	$C_{12} H_{14} N_4 O_4 S$	310.0742	

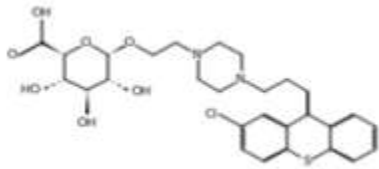
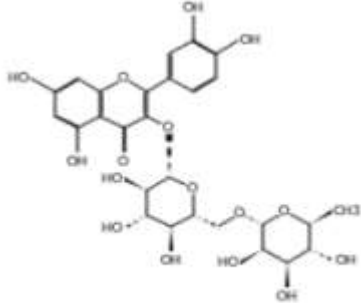
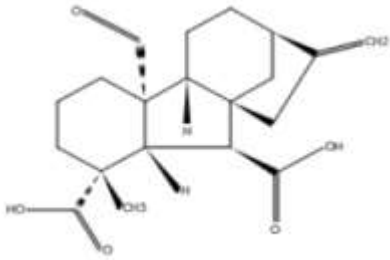
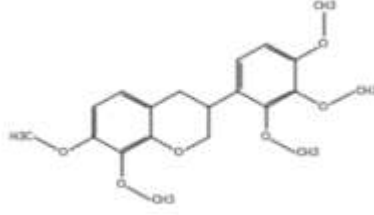
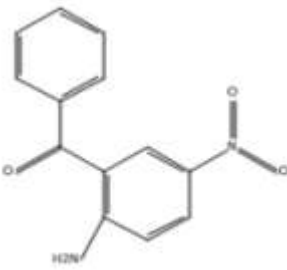
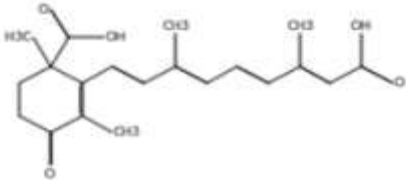


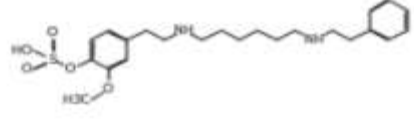
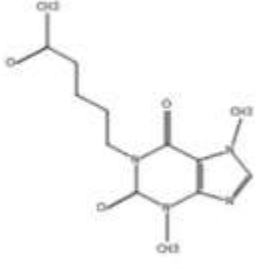
(S)-2-Hydroxyglutarate	$C_5 H_8 O_5$	148.0375	
O-Acetylserine	$C_5 H_9 N O_4$	147.0537	
(2-Chlorophenyl)(4-hydroxyphenyl)phenylmethane	$C_{19} H_{15} Cl O$	294.0803	
Propylthiouracil glucuronide	$C_{13} H_{18} N_2 O_7 S$	346.0822	
2-Ketoglutaric Acid	$C_5 H_6 O_5$	146.0222	
brinzolamide	$C_{12} H_{21} N_3 O_5 S_3$	383.0635	
1-eicosanoyl-2-docosanoyl-snglycerol	$C_{45} H_{88} O_5$	708.6614	

(2-Chlorophenyl)(4-hydroxyphenyl)phenylmethane	$C_{19} H_{15} Cl O$	294.0804	
Methyl 7-DESHYDROXYPYROGALLIN-4-CARBOXYLATE	$C_{13} H_{10} O_6$	262.0475	
13,14-dihydro-15-ketoPGF2alpha	$C_{20} H_{34} O_5$	354.2411	
dTDP -D-glucose	$C_{16} H_{26} N_2$ $O_{16} P_2$	564.0775	
1-Propene, 1,3,3,3-tetrafluoro-2-(fluoromethoxy)-1-methoxy-, (Z)- (Compound C)	$C_5 H_5 F_5 O_2$	192.0219	
2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-(2-hydroxyethyl)-5-phenyl	$C_{12} H_{12} N_2 O_4$	248.0787	

b-Mercaptolactic acid	$C_3 H_6 O_3 S$	122.0037	
4-Hydroxytriazolam glucuronide	$C_{23} H_{20} Cl_2 N_4 O_7$	534.0683	
Diacerin	$C_{19} H_{12} O_8$	368.0525	
CMP-N-acetylneuraminic acid	$C_{20} H_{31} N_4 O_{16} P$	614.1467	
Sedoheptulose phosphate	7- $C_7 H_{15} O_{10} P$	290.0393	
CMP-N-acetylneuraminic acid	$C_{20} H_{31} N_4 O_{16} P$	614.146	
Sulfadoxine glucuronide	$C_{18} H_{22} N_4 O_{10} S$	486.1074	

Sulfolane	$C_4 H_8 O_2 S$	120.0248	
Isopimpinellin	$C_{13} H_{10} O_5$	246.0537	
Gibberellin A36	$C_{20} H_{26} O_6$	362.1725	
b-Mercaptolactic acid	$C_3 H_6 O_3 S$	122.0038	
Gibberellin A8-catabolite	$C_{19} H_{22} O_7$	362.137	
Nalidixic acid	$C_{12} H_{12} N_2 O_3$	232.0854	
alpha-Ketopantoic acid	$C_6 H_{10} O_4$	146.0583	

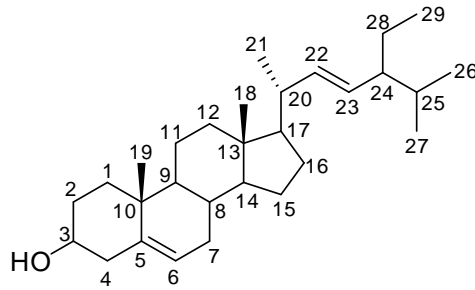
Zuclopenthixol glucuronide	$C_{28} H_{33} Cl N_2 O_7 S$	576.1698	
Rutin	$C_{27} H_{30} O_{16}$	610.1505	
Gibberellin A24	$C_{20} H_{26} O_5$	346.1789	
Duartin dimethyl ether	$C_{20} H_{24} O_6$	360.157	
2-Amino-5-nitrobenzophenone	$C_{13} H_{10} N_2 O_3$	242.0685	
16-Hydroxy-4-carboxyretinoic acid	$C_{20} H_{24} O_5$	344.1631	

Methyldopexamine sulfate	C ₂₃ H ₃₄ N ₂ O ₅ S	450.2181	
Pentoxifylline	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₃	278.1377	

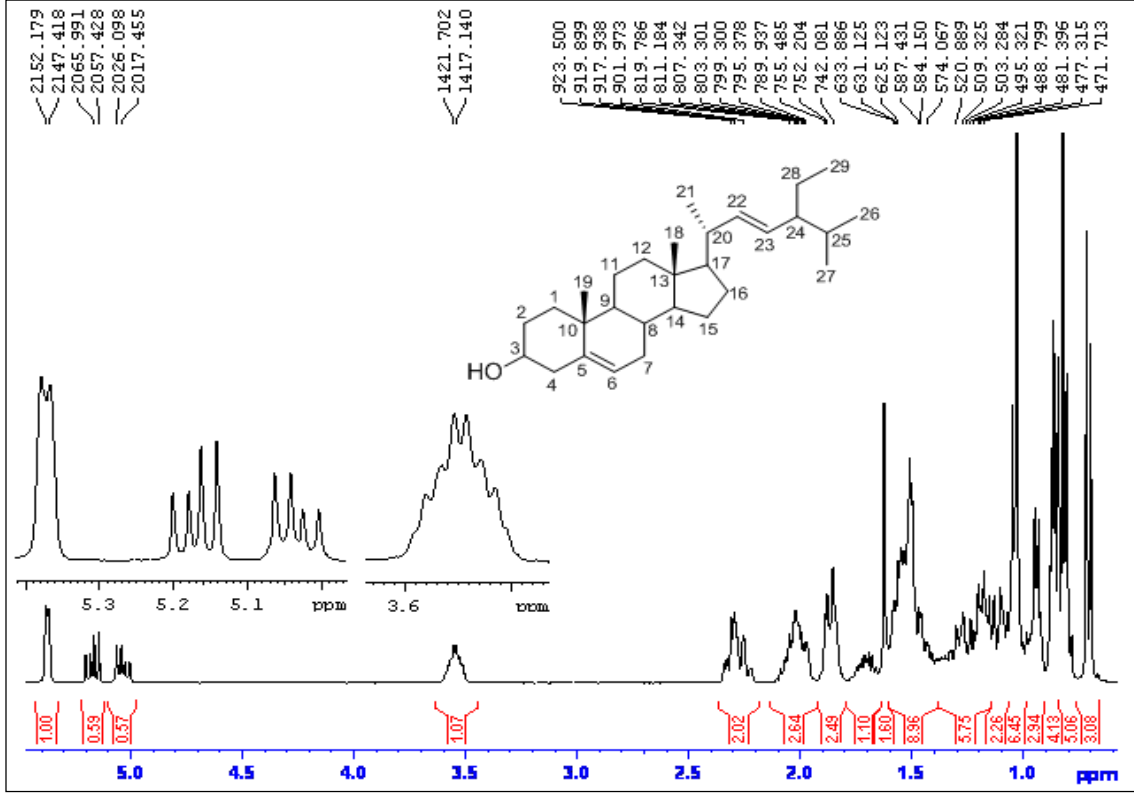
3.1.2.4 *Urtica urens* Tohumundan Elde Edilen Bileşikler

3.1.2.4.1 *Stigmasterol*'ün İzolasyonu ve Yapı Tayini

Isırgan otu tohum kısmının önce Sephadex LH-20 daha sonrada flash kromatografisi ile kromatografik olarak izolasyonu sonucu bazı fraksiyonlarda kristaller elde edilmiştir. Beyaz renkli iğne kristaller NMR analizi için dötero CDCl₃ çözücüsünde çözüldü. ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT ve APT spektrumları, HETCOR, HSQC, HMBC ve COSY spektrumları kaydedildi. Saf olarak elde edilen molekülün erime noktası 166-167 °C olarak belirlendi (Jain., 2010. 165 °C), (Şekil 3.92-3.93).

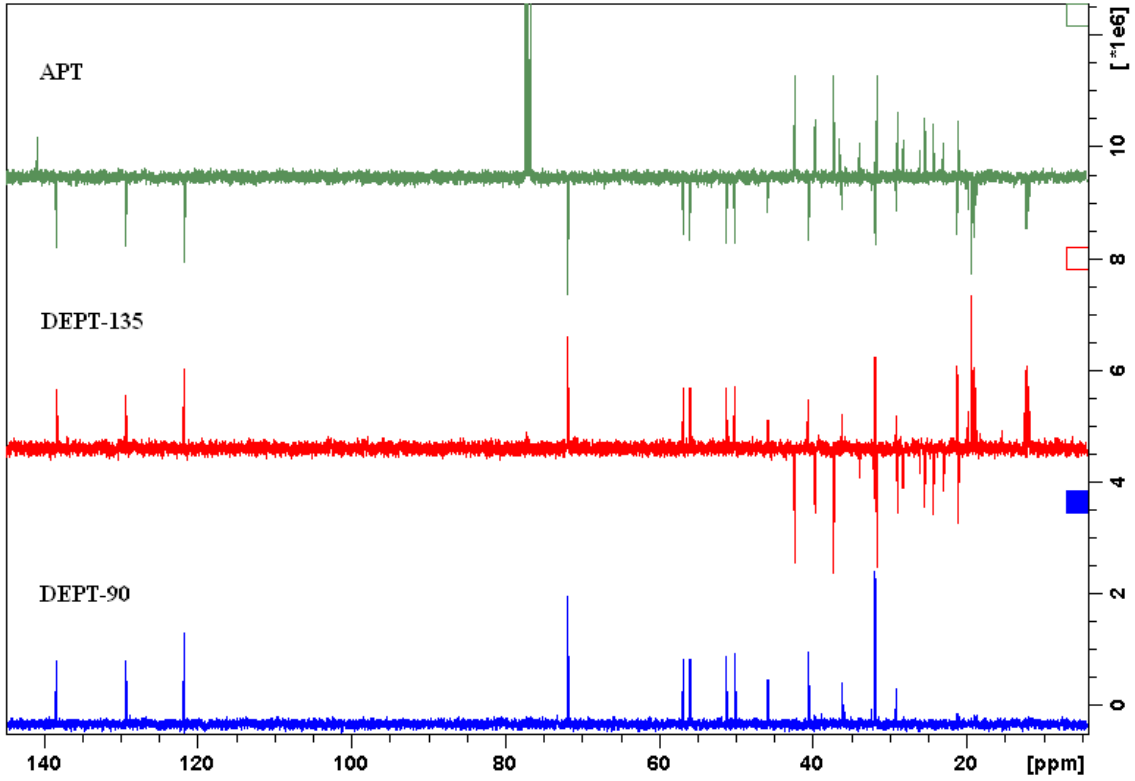


Şekil 3. 92. Stigmasterol molekülü.



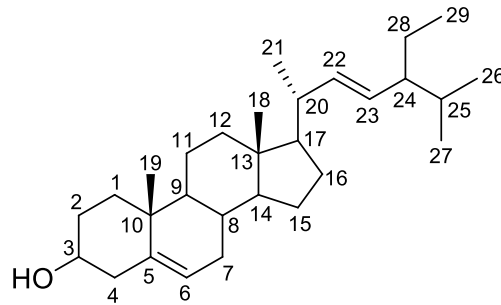
Şekil 3. 93. Stigmasterol'ün ¹H-NMR spektrumu.

Stigmasterol molekülünün ¹H NMR spektrumu incelendiğinde, yapıda aromatik halkanın olmadığı gözlemlendi. C3 konumuna bağlı olan protonun (H3) $\delta_H = 3.52$ ppm'de pentede rezonans olduğu belirlendi. $\delta_H = 0.5-1$ ppm arasında rezonans olan singlet pikleri moleküldeki metil gruplarının varlığını belirtmektedir. C6 karbon atomuna bağlı proton (H6) $\delta_H = 5.35$ ppm'de triplete rezonans olduğu gözlemlendi. Ayrıca C22 karbon atomuna bağlı olan protonun (H22) $\delta_H = 5.15$ ppm'de (H20 protonu ile $J = 8.61$ Hz'lik cis etkileşim ve H23 protonu ile $J = 15.15$ Hz'lik trans etkileşim) dubletin dubleti şeklinde rezonans olduğu ve C23 karbon atomuna bağlı olan protonun (H23) $\delta_H = 5.04$ ppm'de (H22 protonu ile $J = 15.19$ Hz'lik trans etkileşim ve H24 protonu ile $J = 8.69$ Hz'lik cis etkileşim) dubletin dubleti şeklinde rezonans olduğu belirlendi (Şekil 3.94).



Şekil 3. 94. Stigmasterol'ün DEPT ve APT spektrumları.

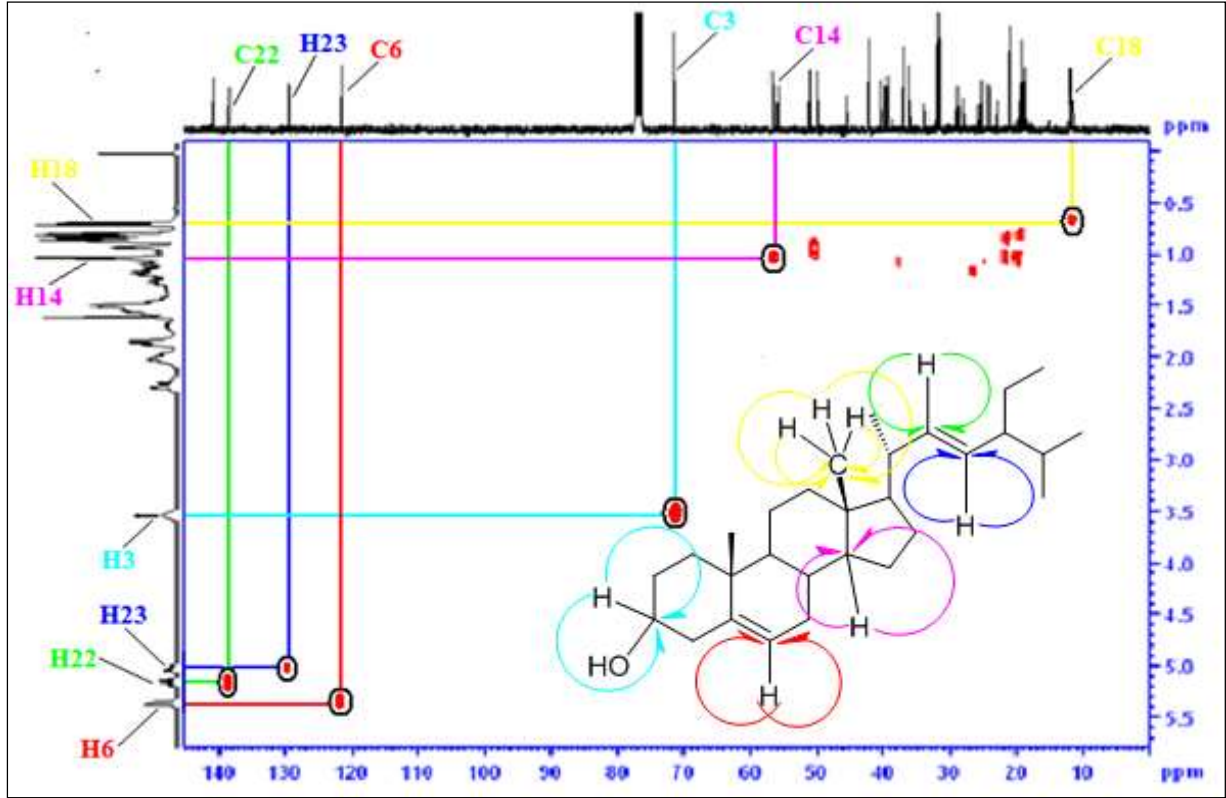
Moleküle ait APT, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları incelendiğinde, molekülde 3 adet kuarterner karbon –C atomu (APT spektrumunda pozitif sinyal, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumlarında sinyal yok), 6 adet -CH₃ karbonu (APT spektrumunda negatif sinyal, DEPT-135'de pozitif sinyal ve DEPT-90'da sinyal yok), 9 adet –CH₂ karbon (APT spektrumunda pozitif, DEPT-135 spektrumunda negatif sinyal ve DEPT-90' da sinyal yok) ve 11 adet –CH karbonunun (APT spektrumunda negatif sinyal, DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal ve DEPT-90' da pozitif sinyal) varlığı tespit edildi. $\delta_c = 140.76$ ppm'deki C5 kuarterner karbon atomu ve $\delta_c = 121.73$ ppm'deki C6 karbon atomu yapıda çift bağı varlığını göstermiştir. Ayrıca $\delta_c = 138.32$ ppm'deki C22 karbon atomu ve $\delta_c = 129.28$ ppm'deki C23 karbon atomu yapıda bir tane daha çift bağı olduğunu göstermiştir.



Karbon No	DEPT, APT	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)
1	CH ₂	37.25	1.08-1.85
2	CH ₂	31.68	1.51-1.83
3	CH	71.81	3.52 m

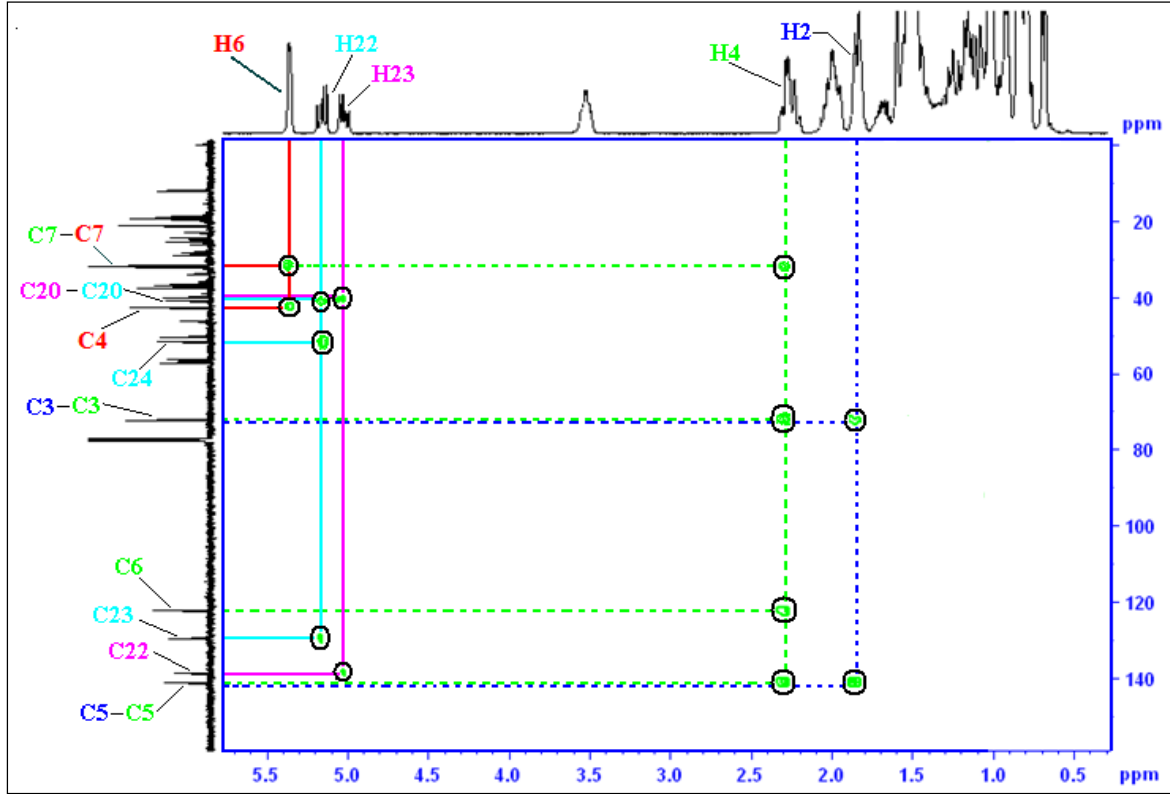
4	CH ₂	42.31	2.28 d
5	C	140.76	-
6	CH	121.73	5.35 brs
7	CH ₂	31.92	1.59-1.97 (J= 4.92 Hz)
8	CH	45.82	0.92
9	CH	50.16	0.92
10	C	36.51	-
11	CH ₂	21.09	0.82-1.53
12	CH ₂	39.78	1.17-2.00
13	C	42.22	-
14	CH	56.86	1.03
15	CH ₂	24.38	1.60
16	CH ₂	26.05	1.16
17	CH	55.95	1.11
18	CH ₃	12.05	0.69 s
19	CH ₃	19.42	1.01 s
20	CH	40.53	2.05 m
21	CH ₃	21.23	1.01 d (J=6.3 Hz)
22	CH	138.32	5.15 dd (J=15.15, 8.61 Hz)
23	CH	129.28	5.04 dd (J=15.15, 8.69 Hz)
24	CH	51.24	1.52
25	CH	31.89	1.48
26	CH ₃	19.84	0.85 d (J=7.4 Hz)
27	CH ₃	18.99	0.80 d (J=7.4 Hz)
28	CH ₂	25.44	1.19
29	CH ₃	11.87	0.67 t

Şekil 3. 95. Stigmasterol'ün karbon ve proton kimyasal kayma değerleri.



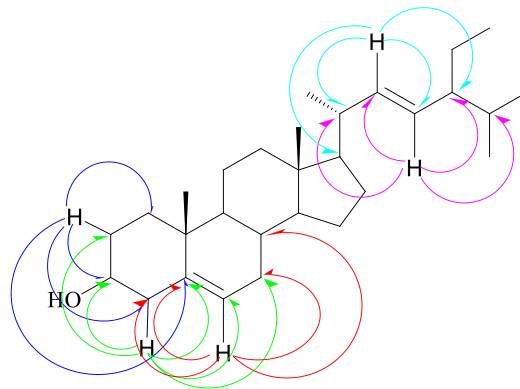
Şekil 3. 96. Stigmasterol HETCOR spektrumu.

Stigmasterol bileşiğinin HETCOR spektrumundan, bileşikteki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Spektrum incelendiğinde, moleküle bağlı olan C18 karbonunun ($\delta_{C18}=12.05$ ppm) 0.69 ppm' deki metil protonlar ile korele olduğu görülmektedir. Molekülde yer alan vinilik C22 ve C23 karbonları ($\delta_{C22}=138.32$ ve $\delta_{C23}=129.28$ ppm) sırasıyla 5.15 ve 5.04 ppm' deki H22 ve H23 protonları ile etkileşimi tespit edilmektedir. Ayrıca spektrumdan C6 karbon atomunun ($\delta_{C6}= 121.73$ ppm) 5.35 ppm' deki H6 protonuyla korelasyonu belirtilmektedir.



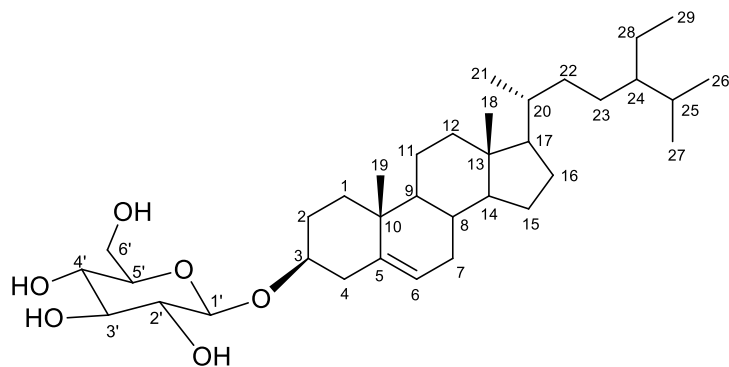
Şekil 3. 97. Stigmasterol HMBC Spektrumu.

Stigmasterol HMBC spektrumdan, iki bağ üzerinden dört bağa kadar moleküldeki proton karbon eşleşmeleri tespit edilmektedir. Spektrum incelendiğinde 1.83 ppm'deki H2 protonu C3 ve C5 karbonlarıyla ($\delta_{C3}=71.81$ ve $\delta_{C5}=140.76$ ppm), 2.28 ppm'deki H4 protonu sırasıyla C7 C3 C6 ve C5 karbonlarıyla ($\delta_{C7}=31.92$, $\delta_{C3}=71.81$, $\delta_{C6}=121.73$ ve $\delta_{C5}=140.76$ ppm), 5.15 ppm'deki H22 protonunun sırasıyla vinilik C23, C20 ve C24 karbonları ile ($\delta_{C23}=129.28$, $\delta_{C20}=40.53$ ve $\delta_{C24}=51.24$ ppm) ve 5.04 ppm'deki H23 protonu C20 ve C22 karbonları ($\delta_{C20}=40.53$ ve $\delta_{C22}=138.32$ ppm) ile korele oldukları belirlenmiştir.



Şekil 3. 98. Stigmasterol HMBC korelasyonu.

3.1.2.4.2 *Daucosterin'in İzolasyonu ve Yapı Tayini*



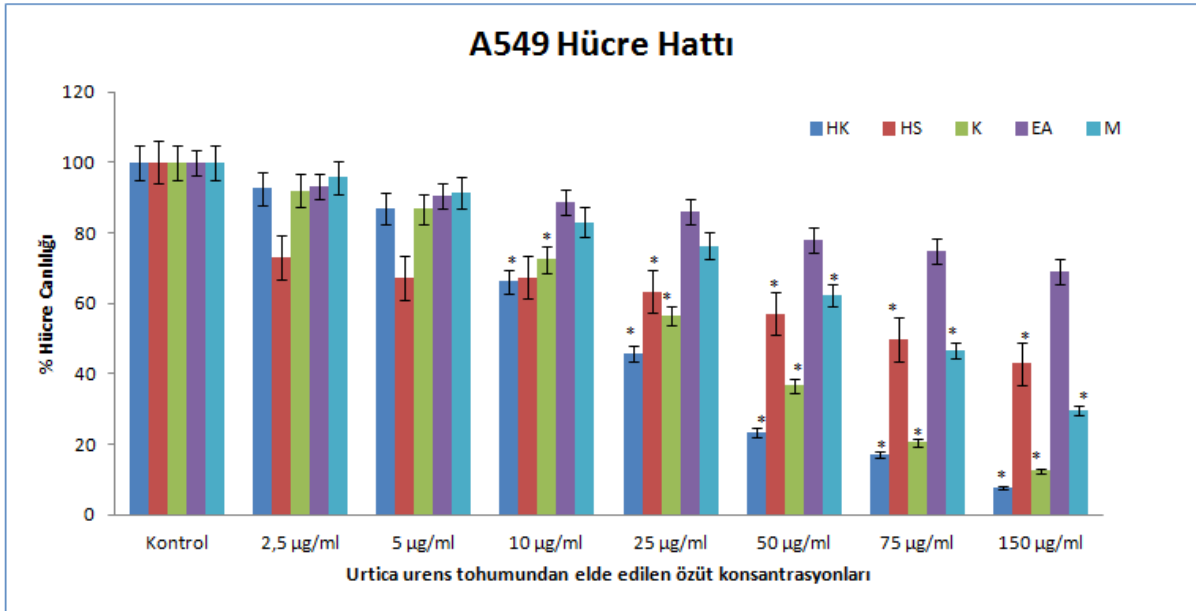
Daucosterin

Position	NMR data in d6-DMSO			NMR data in Literature		
	C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	CH ₂	37.29	1.51	CH ₂	38.81	1.76
2	CH ₂	31.83	1.85	CH ₂	33.58	1.90
3	CH	77.23	4.92	CH	79.84	3.87
4	CH ₂	40.52	1.97	CH ₂	41.30	
5	C	140.91	-	C	142.38	-
6	CH	121.64	5.37	CH	123.25	5.31
7	CH ₂	29.72	1.68	CH ₂	31.67	1.87
8	CH	31.88	1.55	CH	33.49	1.55
9	CH	50.06	1.29	CH	51.72	0.81
10	C	36.67	-	C	38.26	-
11	CH ₂	21.05	0.70	CH ₂	22.73	0.73
12	CH ₂	38.77		CH ₂	40.70	1.64
13	C	42.31	-	C	43.81	-
14	CH	56.63	1.51	CH	58.06	0.98
15	CH ₂	24.32	1.29	CH ₂	25.87	1.22
16	CH ₂	28.24	1.59	CH ₂	29.92	1.22
17	CH	55.89	1.51	CH	57.75	1.08
18	CH ₃	12.24	0.69	CH ₃	13.56	0.65
19	CH ₃	19.55	0.95	CH ₃	20.79	0.81
20	CH	35.93	1.95	CH	37.70	1.27
21	CH ₃	19.07	1.03	CH ₃	20.33	0.73
22	CH ₂	33.80	2.54	CH ₂	35.51	2.33
23	CH ₂	25.91	1.72	CH ₂	27.76	1.14
24	CH	45.60	1.70	CH	47.48	0.92
25	CH	29.17	1.57	CH	30.75	1.60
26	CH ₃	20.16	0.82	CH ₃	21.36	0.95
27	CH ₃	19.39	0.71	CH ₃	20.52	0.92
28	CH ₂	23.07	1.19	CH ₂	24.79	1.52
29	CH ₃	12.13	0.81	CH ₃	13.37	0.80
1'	CH	101.25	4.29 (d, J=8.01 Hz)	CH	103.90	5.02 (d, J=8.01 Hz)

2'	CH	73.92	3.45	CH	76.71	2.93
3'	CH	77.38	3.39	CH	79.96	3.46 (m)
4'	CH	70.56	3.49	CH	73.02	3.03
5'	CH	77.20	3.37	CH	79.43	3.12
6'	CH ₂	61.55	4.18	CH ₂	64.13	3.63

3.1.2.5 *Urtica urens* Bitkisinde Tohum Özütlerinin Sitotoksisite Çalışmaları

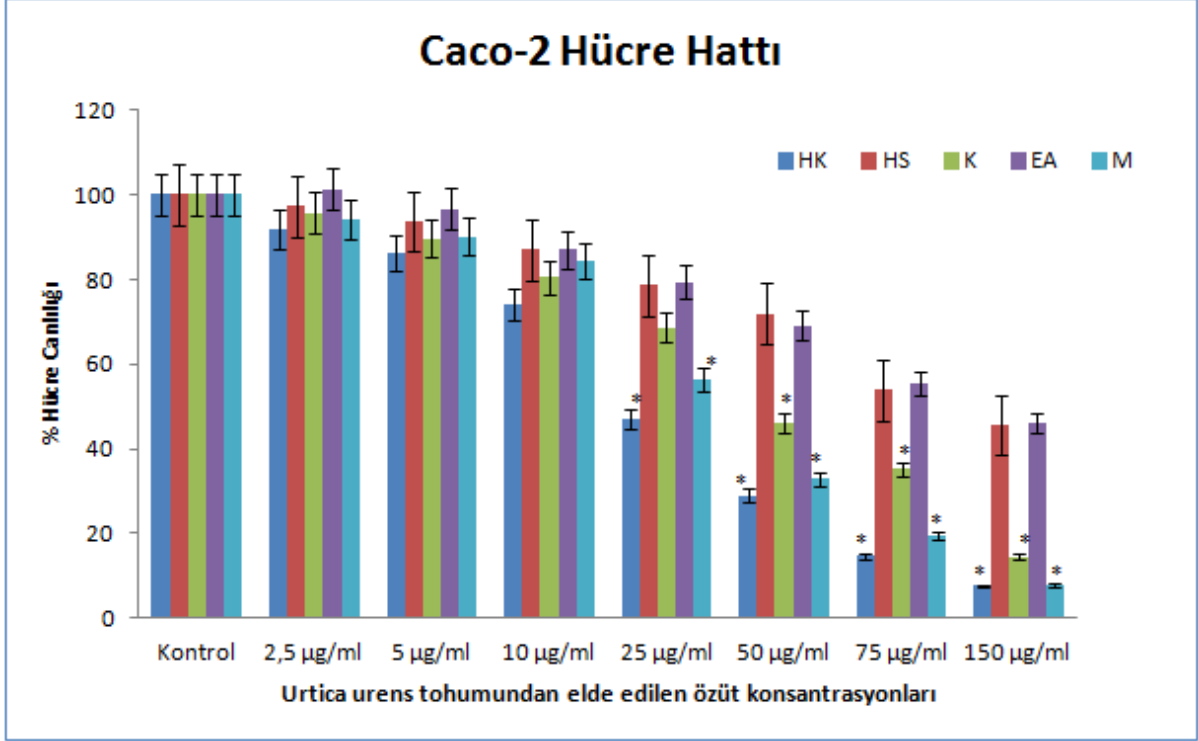
A549 akciğer adenocarcinoma hücre hattında ısırgan otu tohumlarında hekzan katı, hekzan yağ, kloroform, etil asetat ve alkol özütlerinin sitotoksik etkileri aşağıdaki şekillerde verilmektedir (Şekil 3.99). Sitotoksisite sonuçlarından elde edilen değerlere göre LD50 değerleri sırasıyla, hekzan katı kısmı için 28,45 µg/ml, hekzan yağ kısmı için 100,1 µg/ml, kloroform özütü için 38,5 µg/ml, etil asetat özütü için 306,02 µg/ml ve metanol özütü için 78,9 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 99. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumlarının hekzan katı (HK), hekzan yağ (HY), kloroform (K), etil asetat (EA) ve metanol (M) özütlerinin A549 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve elde edilen özüt sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

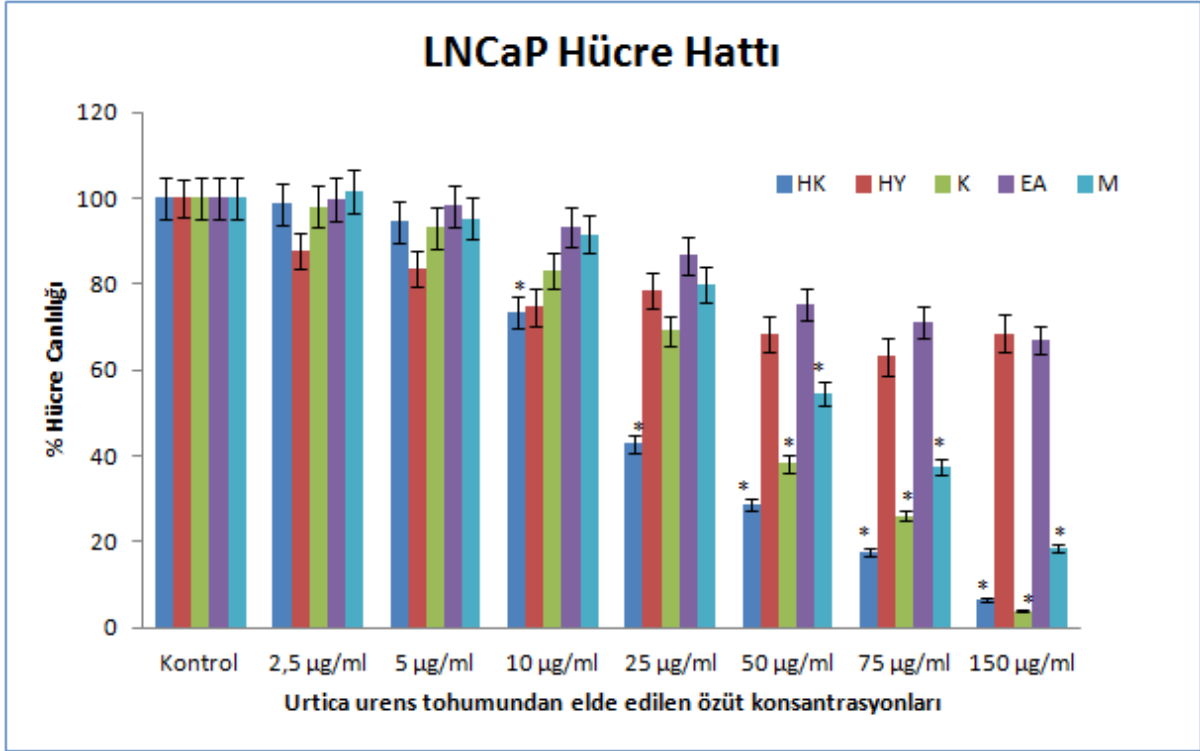
A549 akciğer adenocarcinoma hücre hattında olduğu gibi küçük ısırgan otu tohumlarından değişik çözücülerle hazırlanmış özütlerinin sitotoksik etkileri Caco-2 Kolon kanser hücre hattında da belirlenmiştir (Şekil 3.100). Sitotoksisite sonuçlarından elde edilen

değerlere göre LD50 değerleri sırasıyla, hekzan katı özütü için 28.9 µg/ml, hekzan yağ kısmı için 126.15 µg/ml, kloroform özütü için 48.9µg/ml, etil asetat özütü için 128.35 µg/ml, ve alkol özütü için 33.96 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, hekzan katı, metanol ve kloroform özütlerinin etil asetata ve hekzan yağ özütüne göre yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 100. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumlarının hekzan katı, (HK), hekzan yağ (HY), kloroform (K), etil asetat (EA) ve metanol (M) özütlerinin Caco-2 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve elde edilen özüt sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

Son olarak ısırgan otu tohumlarının değişik çözücülerle hazırlanmış özütlerinin LNCaP prostat kanser hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri bu dönem zarfında belirlenmiş olup elde edilen sonuçlara göre LD50 değerleri sırasıyla, hekzan katı özütü için 31.3 µg/ml, hekzan yağ kısmı için 258.4 kloroform özütü için 36. 3µg/ml, etil asetat özütü için 216.7 µg/ml, ve metanol özütü için 58.6 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.101). Bu sonuçlar, diğer hücre hatlarında olduğu gibi, hekzan katı, metanol ve kloroform özütlerinin diğer özütlere göre yüksek anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir.



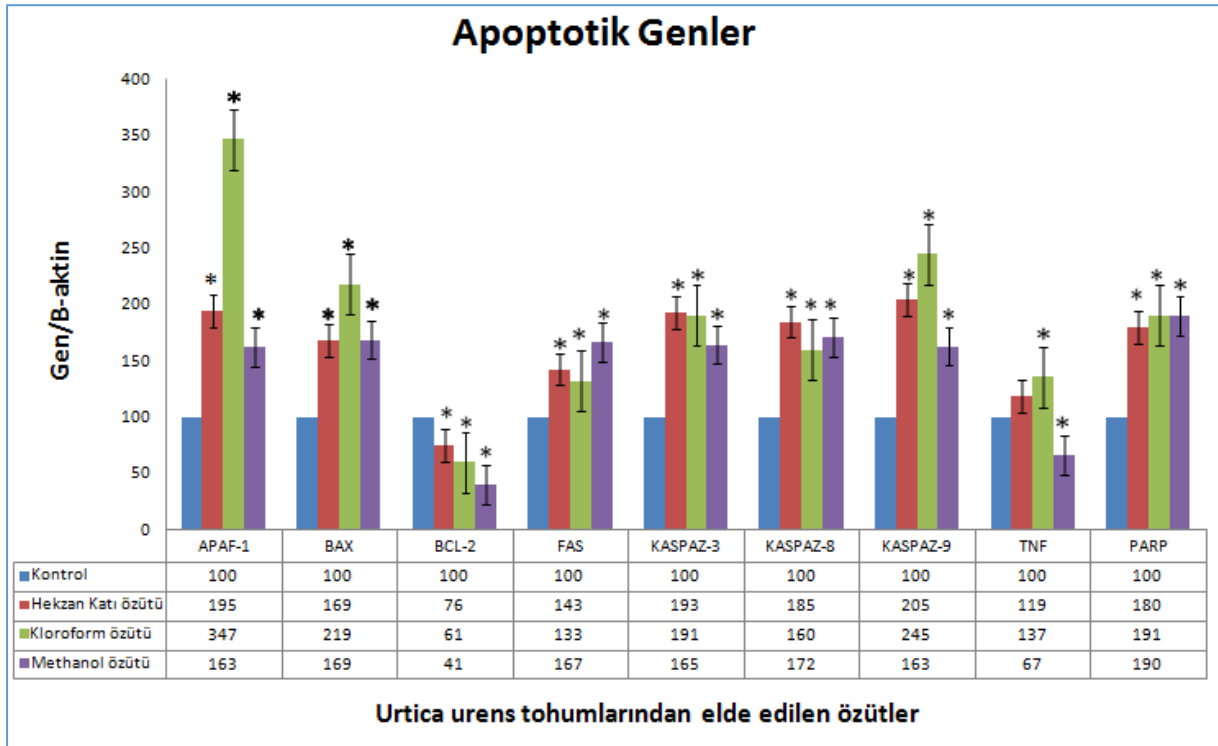
Şekil 3. 101. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumlarının hekzan katı, (HK), hekzan yağ (HY), kloroform (K), etil asetat (EA) ve metanol (M) özütlerinin LNCaP hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve elde edilen özüt sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

3.1.2.6 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR

3.1.2.6.1 A549 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

A549 hücre hattında apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; Kaspaz3; Kaspaz8; Kaspaz9; TNF; PARP ve genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı, kloroform ve metanol uygulaması sonucunda APAF1 mRNA seviyesinde sırasıyla %95; %247 ve %63 artış gözlemlenmiştir. BAX geni içinse mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulanması sonucunda sırasıyla %69, %119 ve %69 artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık BCL2 geninde ise hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri mRNA seviyesinde sırasıyla %24; %39 ve %59 azalma gözlemlenmiştir. FAS mRNA seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol

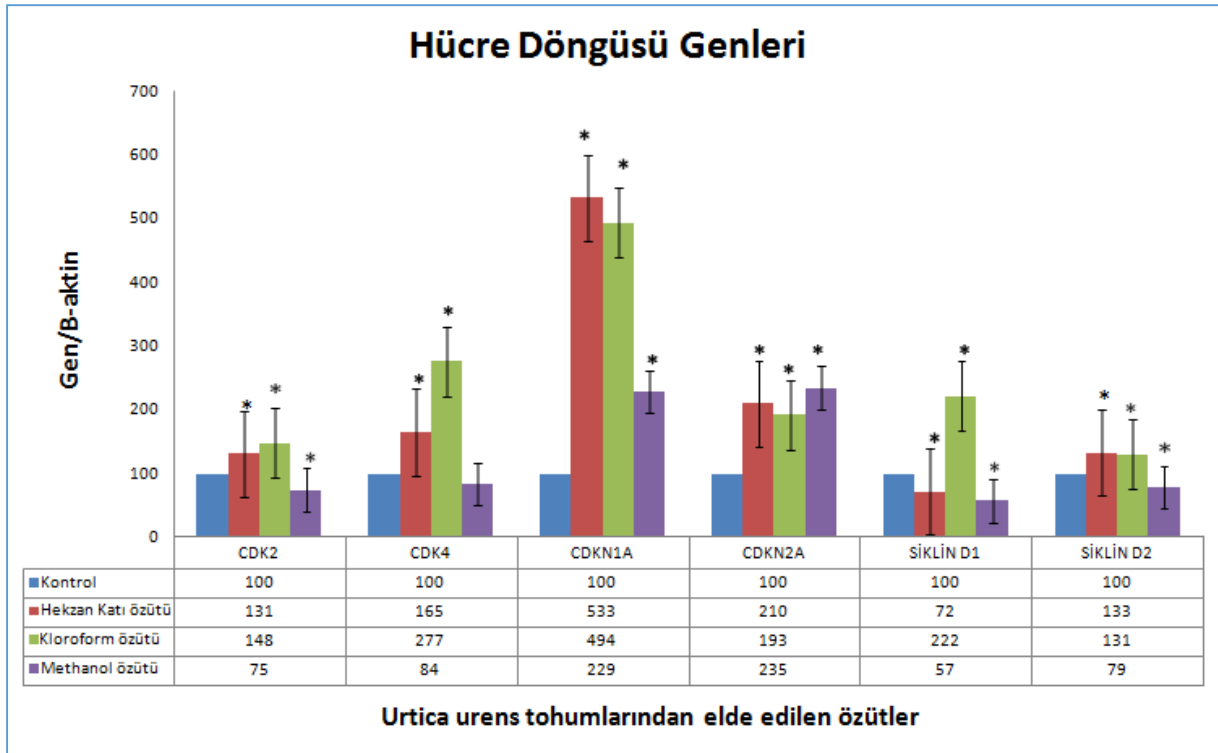
uygulamasında sırasıyla %43, %33 ve %67 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz3 mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %93; %91 ve %65 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz8 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %85; %60 ve %72 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz9 mRNA seviyesinde de hekzan; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %105; %145 ve %63 artış gözlemlenmiştir. TNF mRNA seviyesinde hekzan katı ve kloroform uygulamasında sırasıyla %19 ve %37 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %33 azalış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da PARP mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %80; %91 ve %90 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.102). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin apoptoz mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 102. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Bunlara ek olarak, A549 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A; Siklin D1 ve Siklin D2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı ve kloroform uygulaması sonucunda CDK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %31 ve %48 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %25 azalış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı ve kloroform özütleri CDK4 mRNA

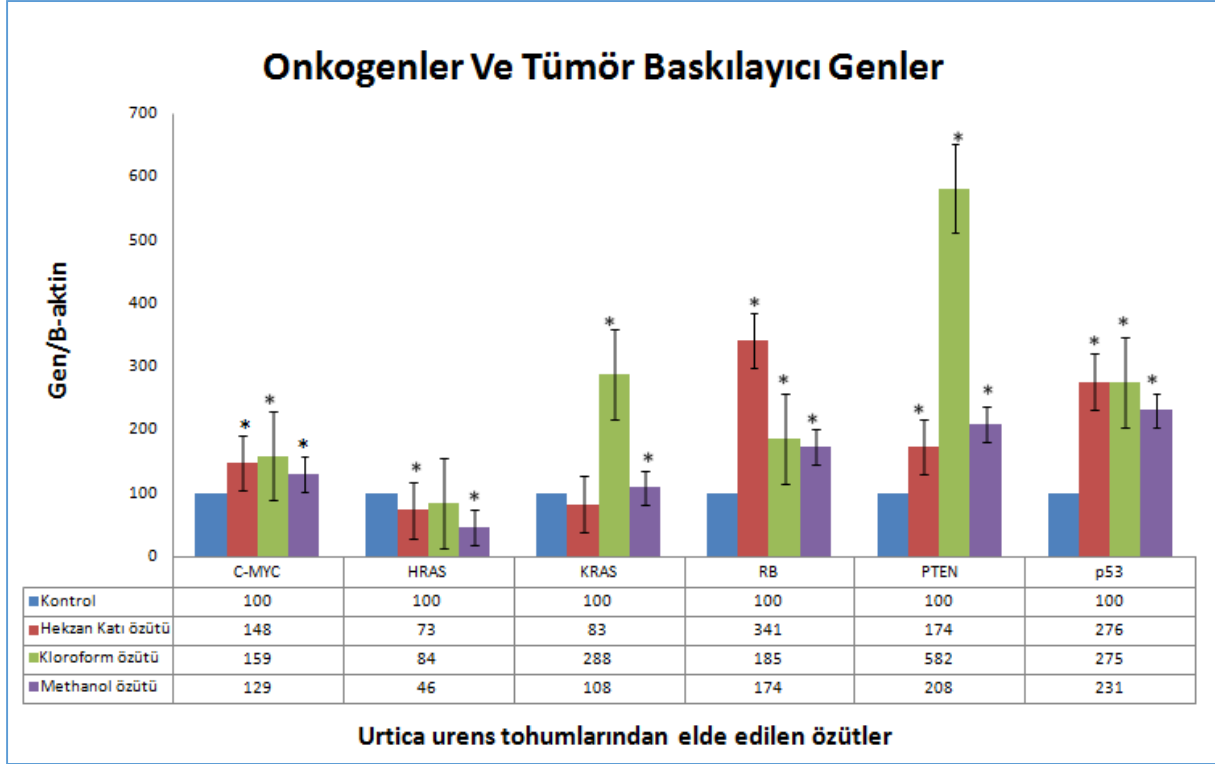
seviyesinde sırasıyla %64 ve %177 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında %16 azalma gözlemlenmiştir. CDKN1A mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %433; %394 ve %129 artış elde edilmiştir. CDKN2A mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sırasıyla %110; %93 ve %135 artış gözlemlenmiştir. Siklin D1 mRNA seviyesinde de hekzan katı ve metanol uygulamasında sırasıyla %28 ve %43 azalış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %122 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da Siklin D2 mRNA seviyesinde hekzan katı ve kloroform uygulamasında sırasıyla %33 ve %31 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında %21 azalış gözlemlenmiştir (Şekil 3.103). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) hücrelerin bölünmesinin engelleyebileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 103. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında hücre döngüsü genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak görev alan c-MYC; HRAS; KRAS; RB; PTEN ve P53 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda c-MYC mRNA seviyesinde sırasıyla %48; %59 ve %29 artış gözlemlenmiştir. HRAS mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %27; %16 ve %54 azalış

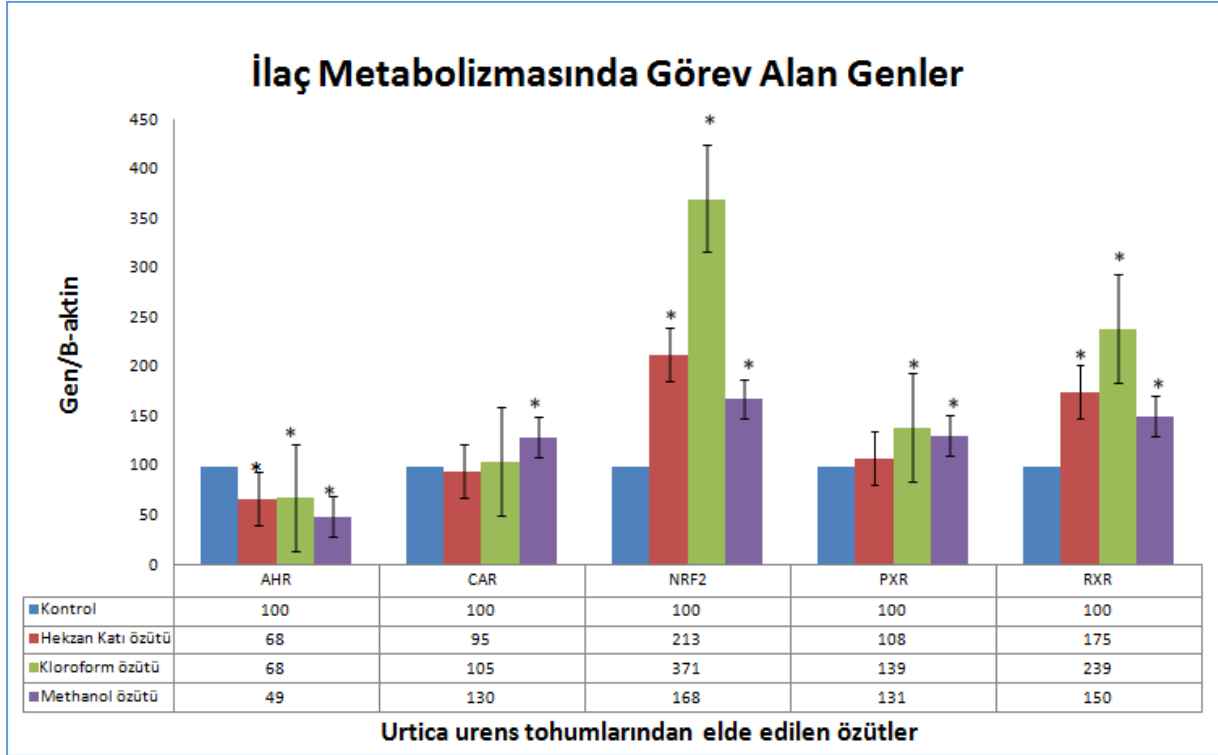
gözlemlenmiştir. Benzer şekilde kloroform ve metanol özütleri KRAS mRNA seviyesinde sırasıyla %188 ve %8 artış gözlemlenirken; hekzan katı uygulamasında %17 azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri RB mRNA seviyesinde sırasıyla %241; %85 ve %74 artış gözlemlenmiştir. Hekzan katı, kloroform ve metanol uygulanması PTEN mRNA seviyesinde ise sırasıyla %74, %482 ve %108 artışa sebep olmuştur. Tüm bunlara ek olarak da P53 mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %176; %175 ve %131 artış elde edilmiştir (Şekil 3.104).



Şekil 3. 104. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

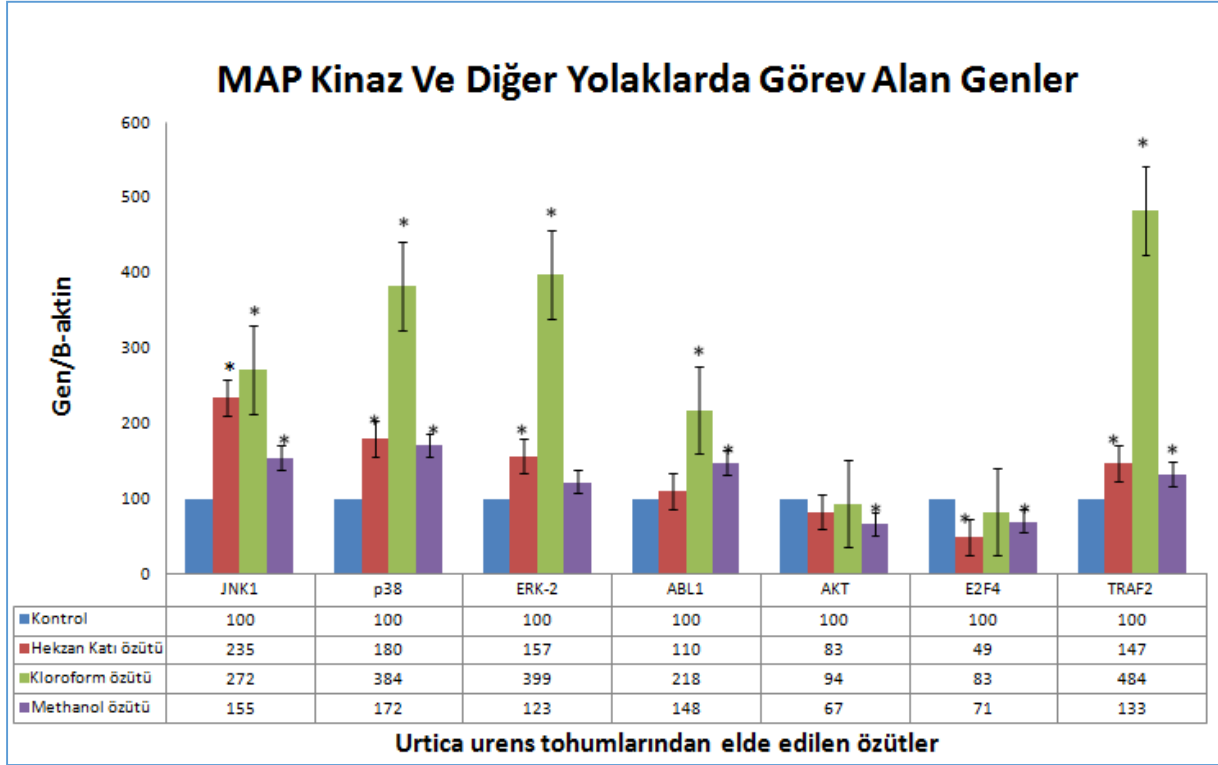
A549 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; NRF2; PXR ve RXR genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda AHR mRNA seviyesinde sırasıyla %32; %32 ve %51 azalış gözlemlenmiştir. CAR mRNA seviyesinde de metanol uygulamasında %30 artış gözlemlenirken; hekzan katı ve kloroform uygulaması sonucunda anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri NRF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %113; %271 ve %68 artış gözlemlenmiştir. PXR mRNA seviyesinde de kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %39 ve %31 artış gözlemlenirken; hekzan katı özütünde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Tüm bunlara ek olarak

da RXR mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %75; %139 ve %50 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.105).



Şekil 3. 105. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında MAP kinaz yolağı ve diğer yollarda görev alan JNK1; P38; ERK-2; ABL1; AKT; E2F4 ve TRAF2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda JNK1 mRNA seviyesinde sırasıyla %135; %172 ve %55 artış gözlemlenmiştir. P38 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %80; %284 ve %72 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri ERK-2 mRNA seviyesinde sırasıyla %57; %299 ve %23 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri ABL1 mRNA seviyesinde sırasıyla %10; %118 ve %48 artış elde edilmiştir. A549 hücre hattında hekzan katı ve metanol uygulaması sonucunda AKT mRNA seviyesinde sırasıyla %17 ve %33 azalış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında değişim gözlenmemiştir. E2F4 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %51; %17 ve %29 azalış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri TRAF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %47; %384 ve %33 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.106).

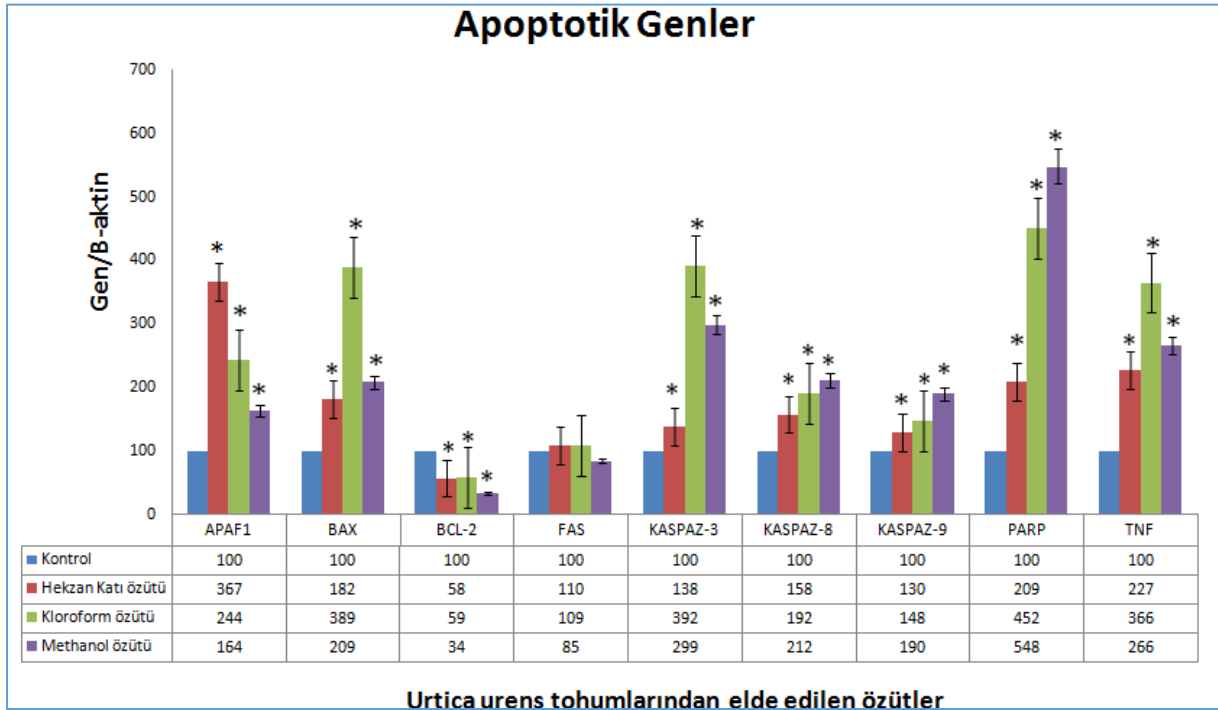


Şekil 3. 106. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre (A549) hattında MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.2.6.2 Caco2 Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

İnsan Kolon Kanseri hücre hattında (Caco-2) apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; Kaspaz3; Kaspaz8; Kaspaz9; PARP ve TNF genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlerine bakılmıştır. Caco2 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda APAF1 mRNA seviyesinde sırasıyla %267; %144 ve %64 artış gözlemlenmiştir. BAX mRNA seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulanması sonucunda sırasıyla %82, %289 ve %109, artış gözlemlenmiştir. Hekzan katı; kloroform ve metanol özütlerinde BCL2 mRNA seviyesinde ise sırasıyla %42; %41 ve %66 azalma gözlemlenmiştir. FAS mRNA seviyesinde de hekzan katı ve kloroform uygulamasında sırasıyla %10 ve %9 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %15 azalış gözlemlenmiştir. Kaspaz3 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %38; %292 ve %199 artış saptanmıştır. Kaspaz8 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %58; %92 ve

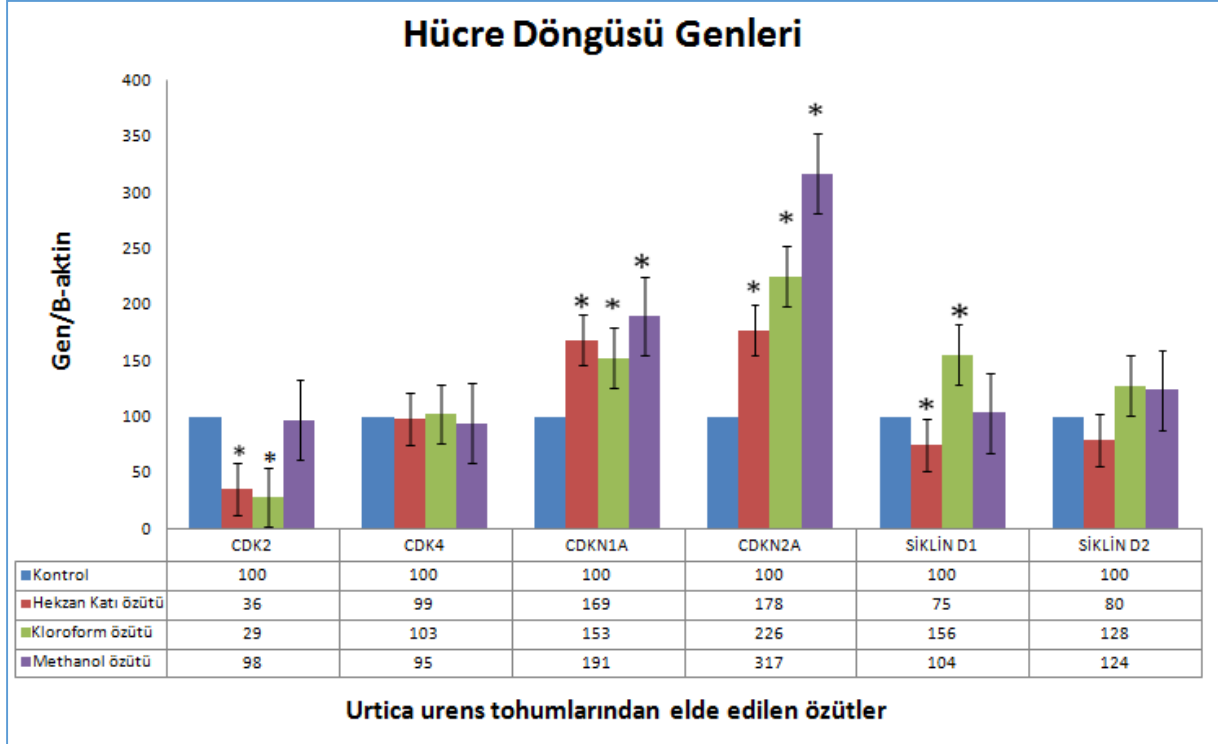
%112 artış elde edilmiştir. Kaspaz9 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %30; %48 ve %90 artış gözlemlenmiştir. PARP mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %109; %352 ve %448 artış gözlemlenmiştir Tüm bunlara ek olarak da TNF mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %127; %266 ve %166 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.107). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin apoptoz mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek İnsan Kolon Kanseri hücre hattında (Caco-2) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 107. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

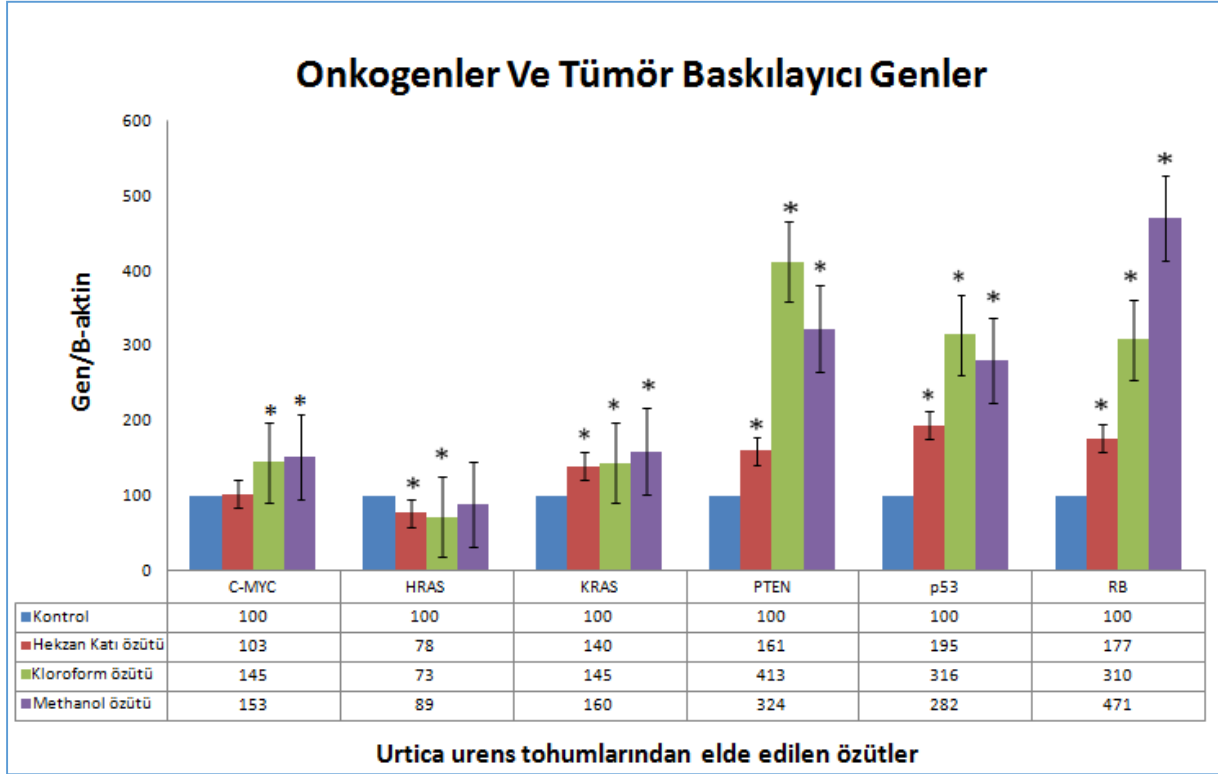
Caco2 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A; SiklinD1 ve SiklinD2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco2 hücre hattında hekzan katı ve kloroform uygulaması sonucunda CDK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %64 ve %71 azalış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenememiştir. CDK4 mRNA seviyesinde anlamlı hiçbir değişim elde edilmemiştir. CDKN1A mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %69; %53 ve %91 artış gözlemlenmiştir. CDKN2A mRNA seviyesinde ise hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri ile muamele sonucunda %78, %126 ve %217 artış gözlemlenmiştir. SiklinD1 mRNA seviyesinde de kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %56 ve %4 artış gözlemlenirken; hekzan katı uygulamasında %25

azalış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da SiklinD2 mRNA seviyesinde hekzan katı uygulamasında %20 azalış; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %28 ve %24 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.108). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek insan kolon kanseri hücre hattında (Caco-2) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



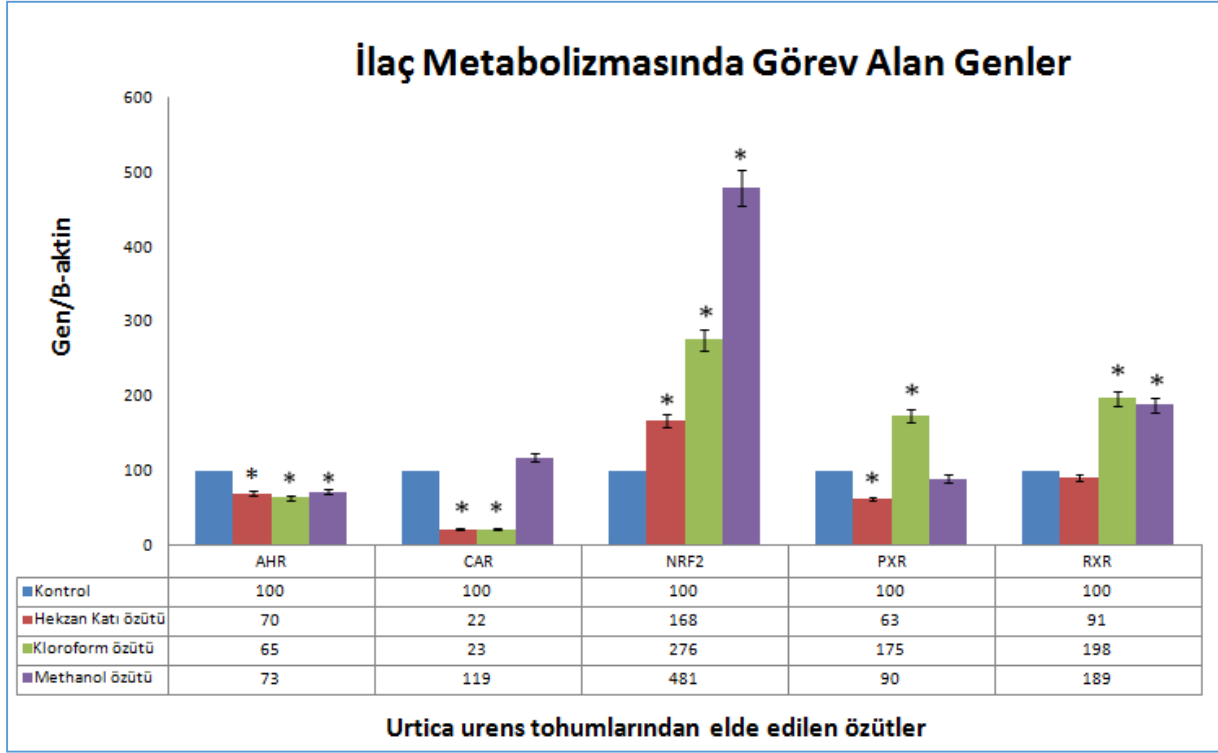
Şekil 3. 108. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında hücre döngüsü genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco2 hücre hattında onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak görev alan c-MYC; HRAS; KRAS; PTEN; P53 ve RB genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco2 hücre hattında kloroform ve metanol uygulaması sonucunda c-MYC mRNA seviyesinde sırasıyla %45 ve %53 artış gözlemlenirken; hekzan katı özütünde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. HRAS mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %22; %27 ve %11 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri KRAS mRNA seviyesinde sırasıyla %40; %45 ve %60 artış gözlemlendi. Ayrıca PTEN mRNA seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinde sırasıyla %61, %313 ve %224 artışa sebep olmuştur. Benzer şekilde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulanması sonucunda P53 mRNA seviyesinde sırasıyla %95, %216 ve %182 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RB mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %77; %210 ve %317 artış gözlemlendi (Şekil 3.109).



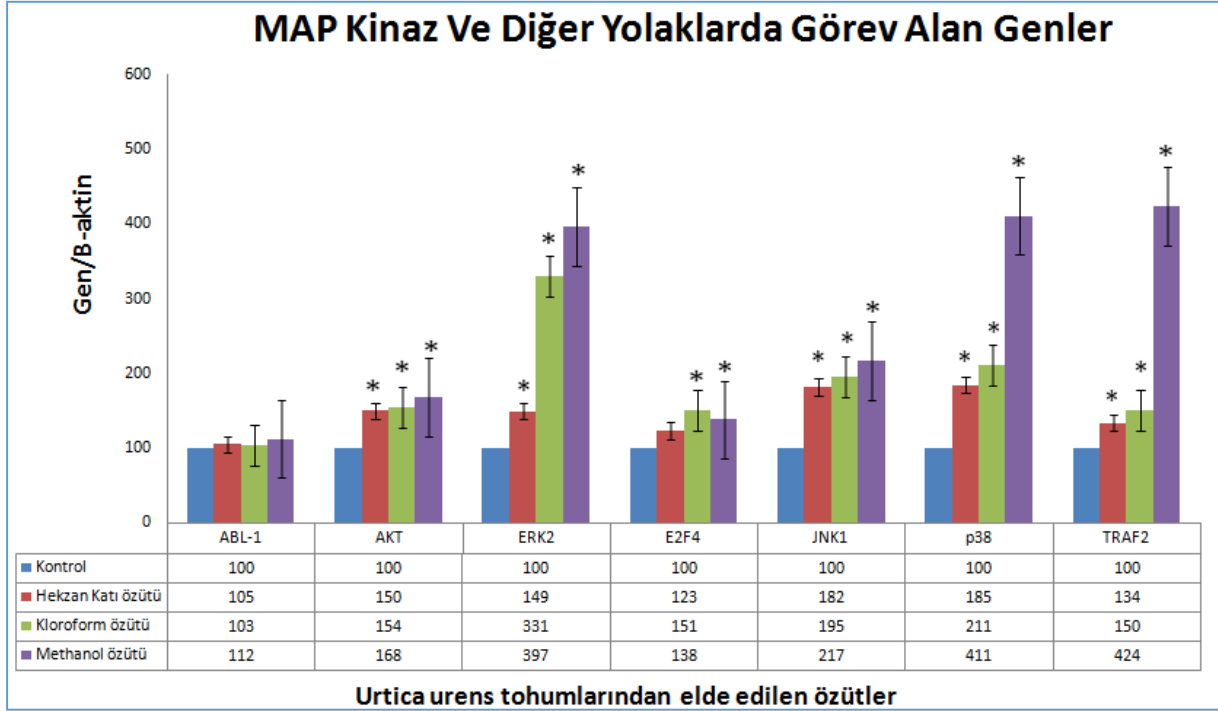
Şekil 3. 109. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco2 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; NRF2; PXR ve RXR genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco2 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda AHR mRNA seviyesinde sırasıyla %30; %35 ve %27 azalma gözlemlenmiştir. CAR mRNA seviyesinde de hekzan katı ve kloroform uygulamasında sırasıyla %78 ve %77 azalış gözlemlenirken; metanol uygulamasında %19 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri NRF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %68; %176 ve %381 artış elde edilmiştir. PXR mRNA seviyesinde de hekzan katı ve metanol uygulamasında sırasıyla %37 ve %10 azalma gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %75 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RXR mRNA seviyesinde kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %98 ve %89 artış gözlemlenirken; hekzan katı uygulaması %9 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.110).



Şekil 3. 110. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında ilaç metabolizmasında görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

Caco2 hücre hattında MAP kinaz yolağı ve diğer yollarda görev alan ABL1; AKT; ERK2; E2F4; JNK1; P38 ve TRAF2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında metanol uygulaması sonucunda ABL1 mRNA seviyesinde %12 artış gözlemlenirken; hekzan katı ve kloroform özütlerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. AKT mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %50; %54 ve %68 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri ERK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %49; %231 ve %297 artış gözlemlenmiştir. Caco2 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda E2F4 mRNA seviyesinde sırasıyla %23; %51 ve %38 artış gözlemlenmiştir. JNK1 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %82; %95 ve %117 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri P38 mRNA seviyesinde sırasıyla %85; %111 ve %311 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da TRAF2 mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %34; %50 ve %324 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.111).

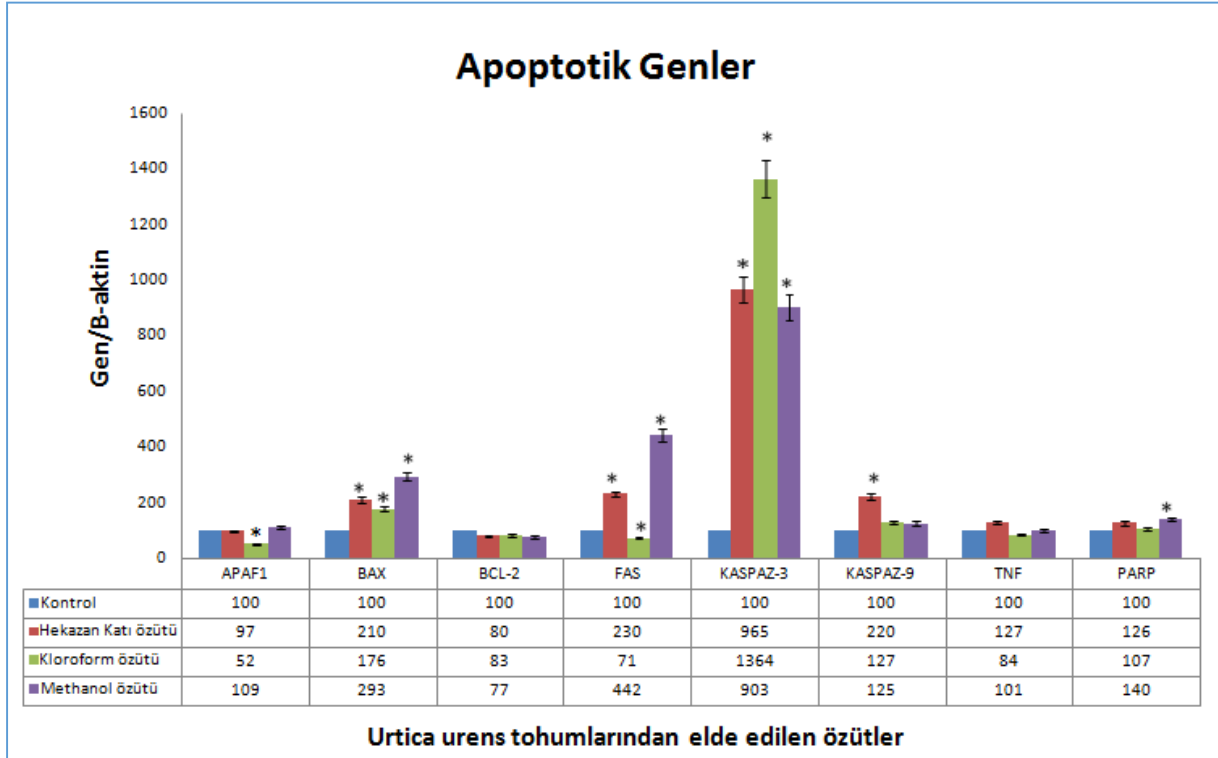


Şekil 3. 111. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol insan kolon kanseri hücre (Caco-2) hattında MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.2.6.3 LNCaP Hücre Hattında mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

İnsan prostat kansinoma hücre hattında (LNCap) apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; Kaspaz3; Kaspaz9; TNF ve PARP genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlerine bakılmıştır. LNCap hücre hattında APAF1 mRNA seviyesinde kloroform uygulaması sonucunda %48 azalış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %9 artış gözlemlenirken; hekzan katı özütünde ise istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Bax mRNA seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulanması sonucunda sırasıyla %110, %76 ve %193 artış gözlemlenmiştir. Ayrıca hekzan katı; kloroform ve metanol özütlerinde BCL2 mRNA seviyesinde sırasıyla %20; %17 ve %23 azalma gözlemlenmiştir. FAS mRNA seviyesinde de hekzan katı ve metanol uygulamasında sırasıyla %130; %342 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında ise %29 azalma elde edilmiştir. Kaspaz3 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %865; %1264 ve %803 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz9 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında %120; %27 ve %25 artış gözlemlenmiştir.

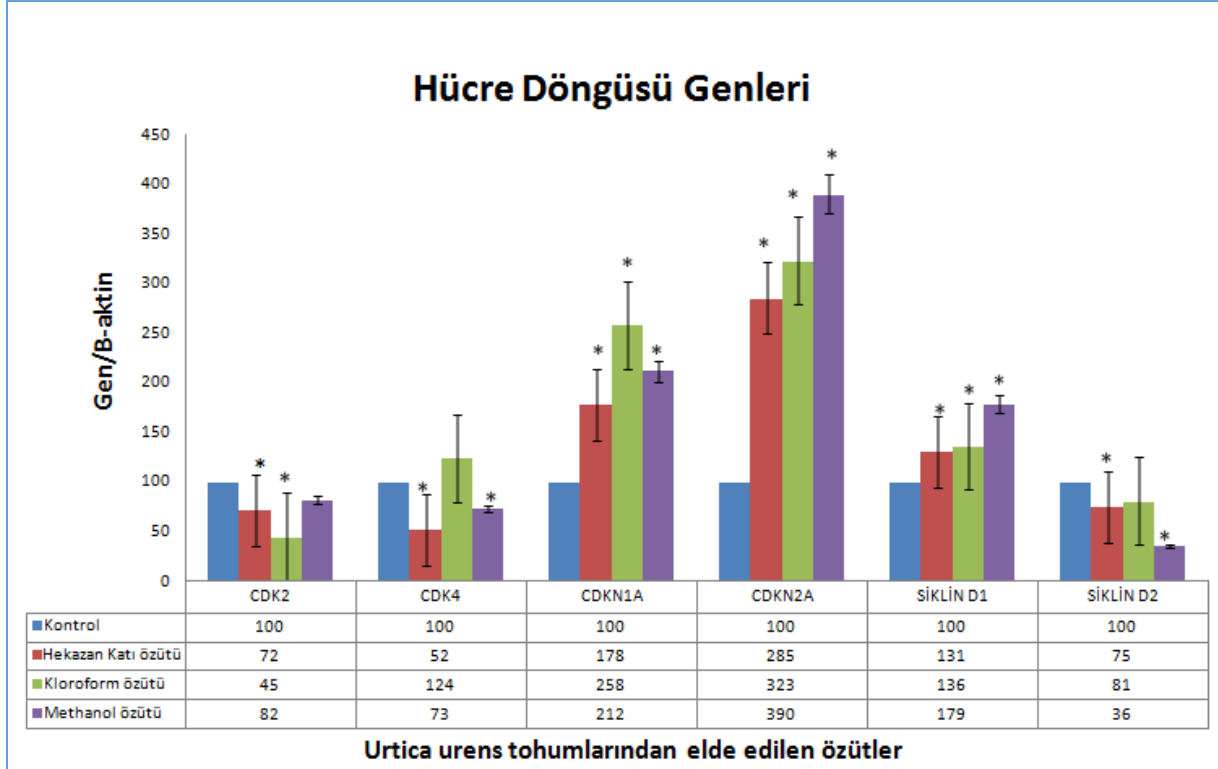
TNF mRNA seviyesinde hekzan katı uygulamasında %27 artış varken; kloroform uygulamasında ise %16 azalma gözlemlenirken; metanol uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Tüm bunlara ek olarak da PARP mRNA seviyesinde de hekzan katı ve metanol uygulamasında sırasıyla %26 ve %40 artış gözlemlenirken; kloroformda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır (Şekil 3.112). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin apoptoz mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek İnsan prostat kansinoma hücre hattında (LNCap) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 112. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCap) hattında apoptotik genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

LNCap hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDK4; CDKN1A; CDKN2A; SiklinD1 ve SiklinD2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCap hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda CDK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %28; %55 ve %18 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı ve metanol uygulamasında CDK4 mRNA seviyesinde sırasıyla %48 ve %27 azalma gözlemlenirken; kloroform uygulamasında ise %24 artış gözlemlenmiştir. CDKN1A mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %78; %158 ve %112 artış elde edilmiştir. CDKN2A mRNA seviyesi ise hekzan katı; kloroform ve metanol özütlerinde

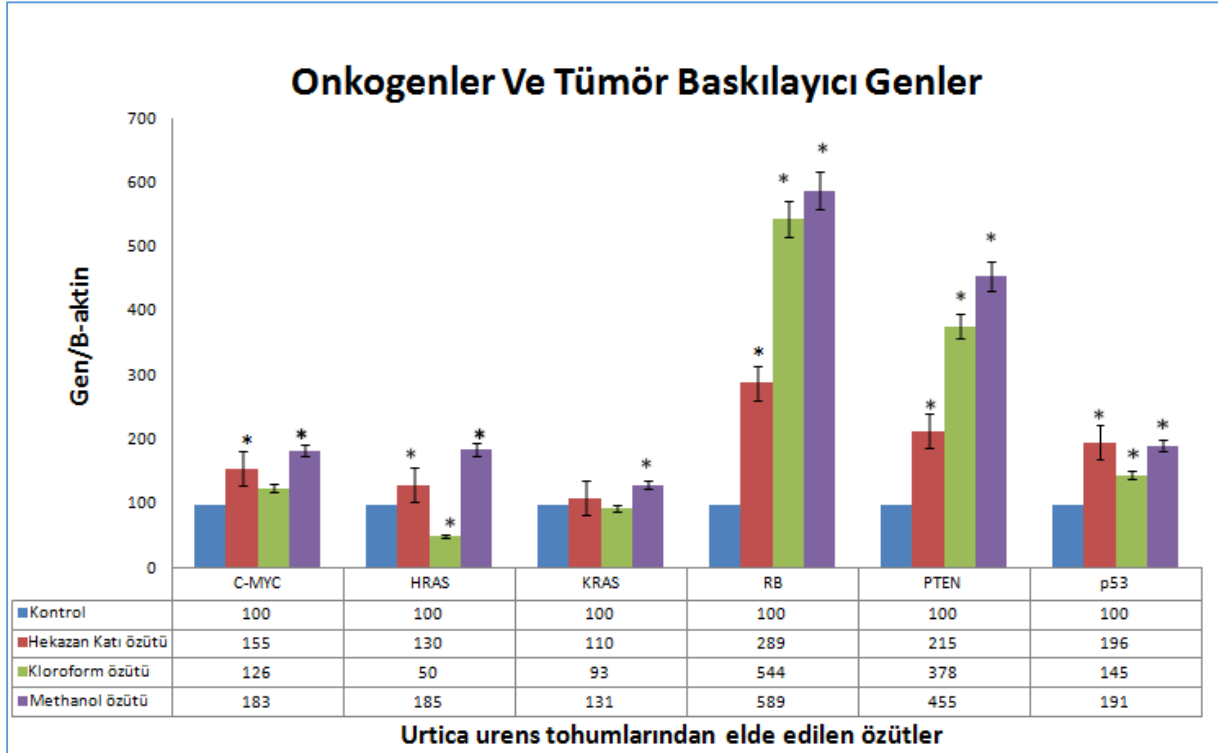
sırasıyla %185, %223 ve %290 artış elde edilmiştir. SiklinD1 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %31; %36 ve %79 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da SiklinD2 mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında %25; %19 ve %64 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.113). Elde edilen veriler sonucunda *Urtica urens* özütlerinin hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek İnsan prostat karsinoma hücre hattında (LNCap) hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. 113. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında hücre döngüsü genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

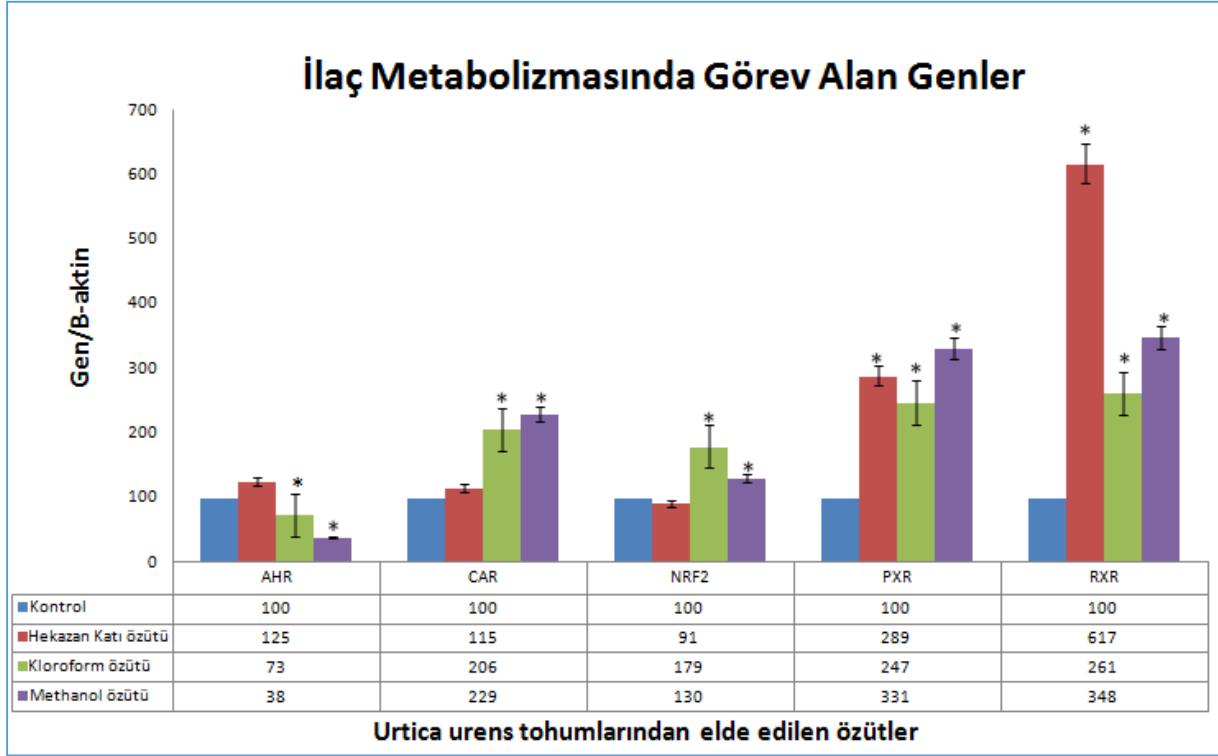
LNCaP hücre hattında onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak görev alan c-MYC; HRAS; KRAS; PTEN; RB ve P53 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCap hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda c-MYC mRNA seviyesinde sırasıyla %55; %26 ve %83 artış gözlemlenmiştir. HRAS mRNA seviyesinde de hekzan katı ve metanol uygulamasında sırasıyla %30 ve %85 artış gözlemlenirken; kloroform uygulamasında %50 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı ve metanol özütleri KRAS mRNA seviyesinde sırasıyla %10 ve %31 artış gözlemlenirken; kloroform özütünde ise %7 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri PTEN mRNA seviyesinde sırasıyla %115, %278 ve %355 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara

ek olarak, 24 saat boyunca hekzan katı, kloroform ve metanol uygulanması RB mRNA seviyesinde sırasıyla %189, %444 ve %489 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da P53 mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %96; %45 ve %91 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.114).



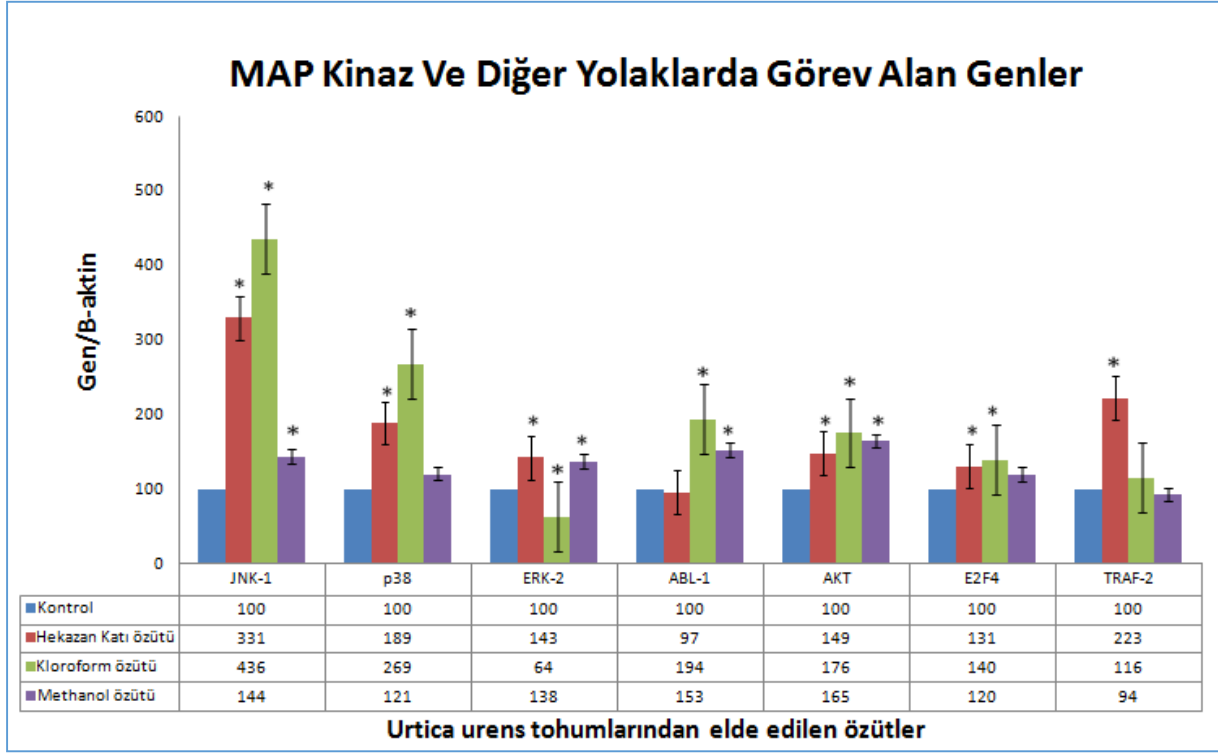
Şekil 3. 114. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

LNCap hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; NRF2; PXR ve RXR genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCap hücre hattında AHR mRNA seviyesinde hekzan katı uygulaması sonucunda %25 artış varken; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %27 ve %62 azalma gözlemlenmiştir. CAR mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %15; %106 ve %129 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde kloroform ve metanol özütleri NRF2 mRNA seviyesinde sırasıyla %79 ve %30 artış gözlemlenirken; hekzan katı uygulamasında ise %8 azalma gözlemlenmiştir. PXR mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %189; %147 ve %231 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da RXR mRNA seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %517; %161 ve %248 artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.115).



Şekil 3. 115. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında ilaç metabolizmasında görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

LNCaP hücre hattında MAP Kinaz yolağı ve diğer yollarda görev alan JNK1; P38; ERK2; ABL1; AKT; E2F4 ve TRAF2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCaP hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda JNK1 mRNA seviyesinde sırasıyla %231; %336 ve %44 artış gözlemlenmiştir. P38 mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %89; %169 ve %21 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı ve metanol özütleri ERK2 mRNA seviyesinde sırasıyla %43 ve %38 artış gözlemlenirken; kloroform uygulaması sonucunda %36 azalma elde edilmiştir. LNCaP hücre hattında kloroform ve metanol uygulaması sonucunda ABL1 mRNA seviyesinde sırasıyla %94 ve %53 artış gözlemlenirken; hekzan katı uygulamasında ise %3 azalma gözlemlenmiştir. AKT mRNA seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %49; %76 ve %65 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri E2F4 mRNA seviyesinde sırasıyla %31; %40 ve %20 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da TRAF2 mRNA seviyesinde hekzan katı ve kloroform uygulamasında sırasıyla %123 ve %16 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %6 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.116).



Şekil 3. 116. Küçük ısırgan otu yapraklarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kanseri hücre (LNCaP) hattında MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.2.7 Protein Seviyesinde Ekspresyon Düzeylerinin Tayin Edilmesi: Western Blot

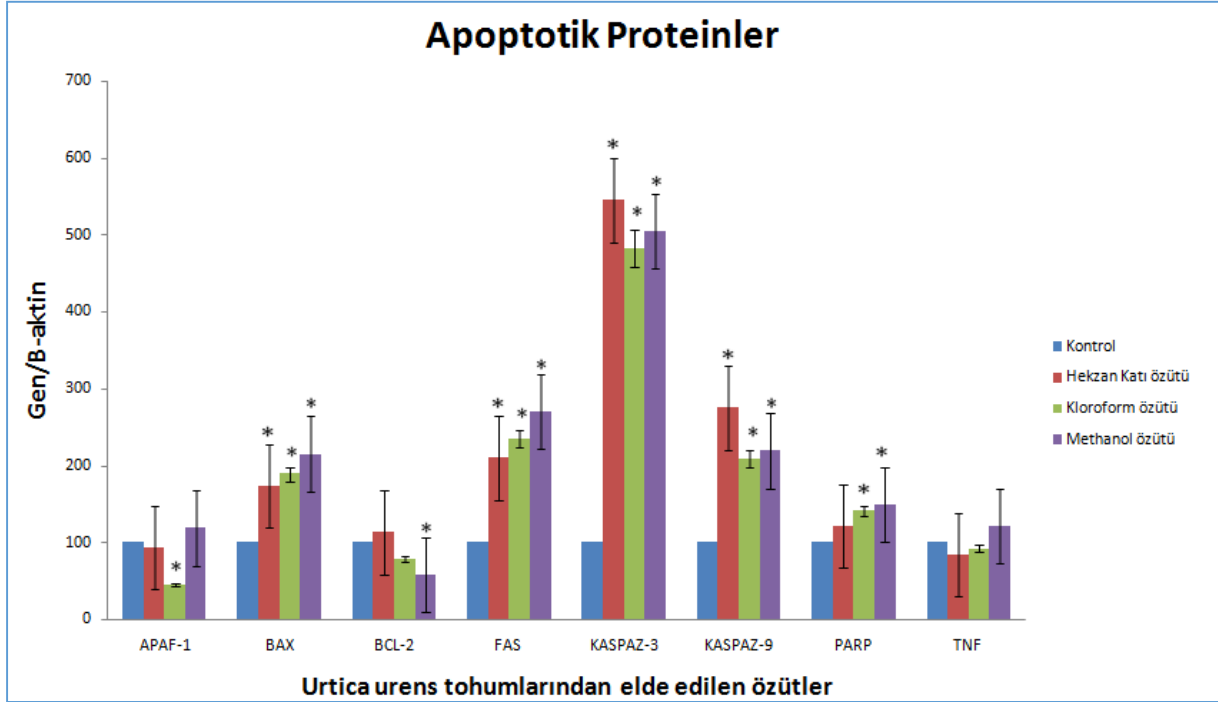
Proje kapsamında verilen genlerin protein seviyelerinde küçük ısırgan otu tohumundan elde edilen özütlerin uygulanması sonucunda meydana gelen değişimler yapılan Western Blot çalışmaları ile A549, Caco2 ve LNCaP hücre hatlarında belirlenmeye çalışılmıştır.

3.1.2.7.1 A549 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

A549 hücre hattında apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1; BAX; BCL2; FAS; KASPAZ-3; KASPAZ-8; KASPAZ-9; PARP ve TNF-alfa protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasıyla APAF1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinin sırasıyla %115; %295 ve %180 arttığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri

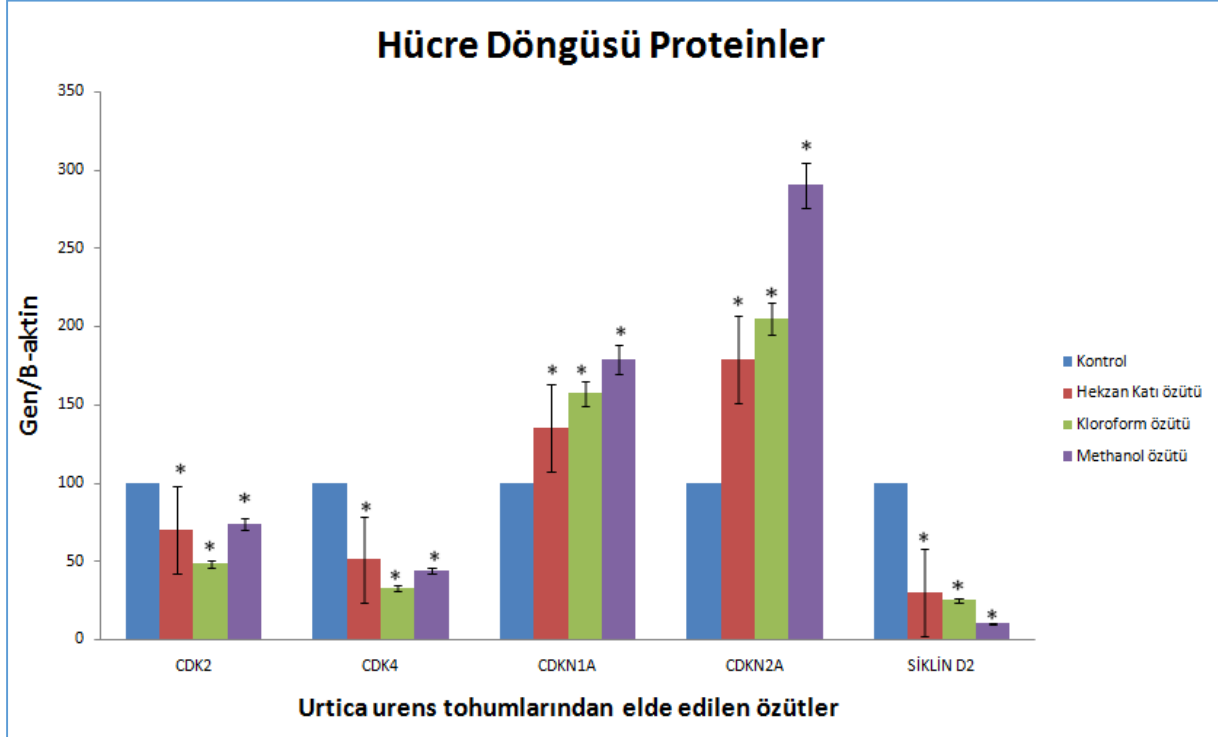
uygulanan A549 hücre hattında BAX protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %53; %73 ve %110 artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık BCL2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %18; %60 ve %65 azalma gözlemlenmiştir. FAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %35; %23 ve %50 oranında bir artış elde edilmiştir. Kaspaz-3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %65; %60 ve %45 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Kaspaz-8 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %60; %40 ve %53 artış gözlemlenmiştir. Kaspaz-9 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %95; %132 ve %149 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde PARP protein seviyesinde bu özütlerin uygulanması sonucunda %115, %135 ve %110 oranında artış saptanmıştır. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında TNF protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %5; %10 ve %58 azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.117).





Şekil 3. 117. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

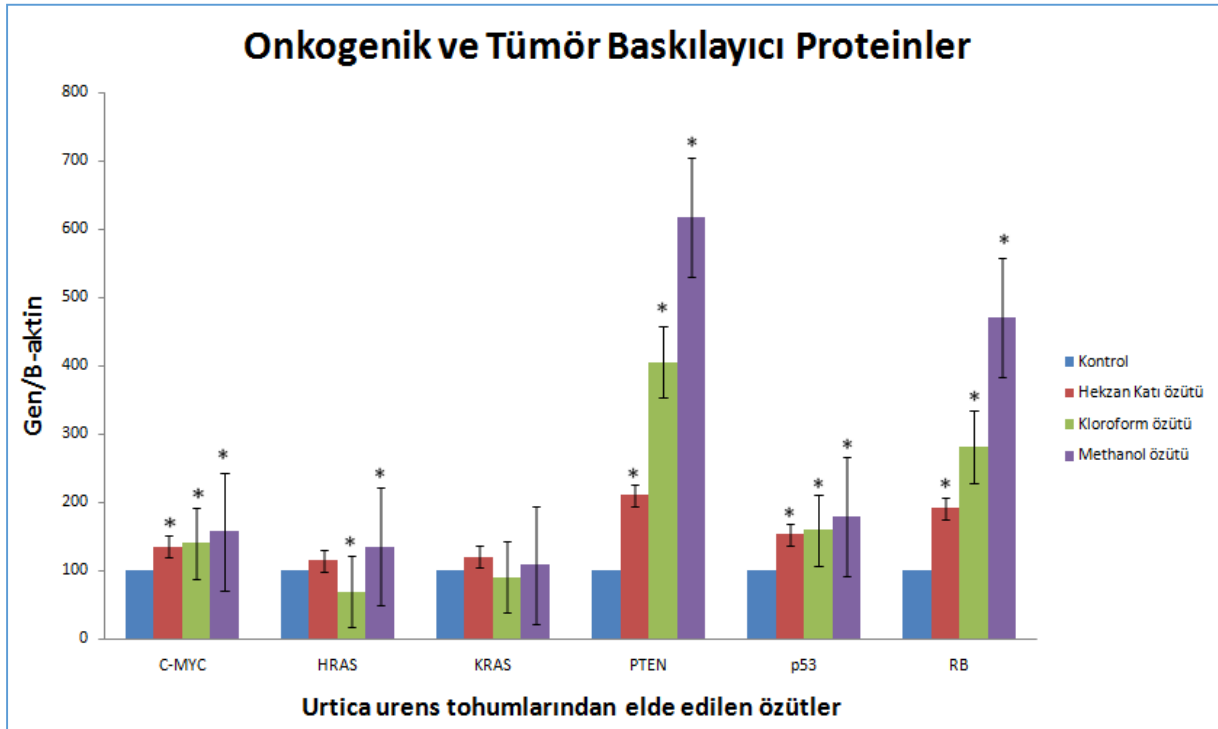
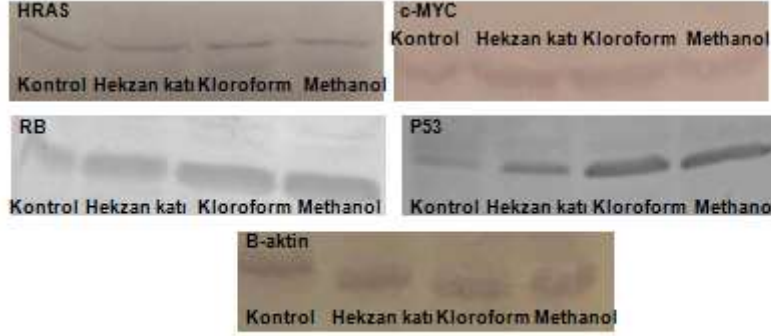
A549 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2; CDKN1A; CDKN2A ve SiklinD2 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı ve kloroform uygulamasıyla CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinin sırasıyla %5 ve %21 attığı gözlenirken; metanol uygulamasında ise %17 azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde hekzan katı ve kloroform uygulanan A549 hücre hattında SiklinD2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesi sırasıyla %5 ve %30 artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında %8 azalma gözlemlenmiştir. CDKN1A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %111; %139 ve %141 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında CDKN2A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %78; %62 ve %51 artış saptanmıştır (Şekil 3.118).



Şekil 3. 118. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında hücre döngüsü proteinlerinin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinlerden c-MYC; HRAS; P53 ve RB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. A549 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasıyla HRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyeleri sırasıyla %29; %11 ve %38 artış gözlemlenmiştir. Buna karşın hekzan katı; kloroform ve metanol özütleri uygulanan A549 hücre hattında P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %156; %325 ve %415 artış elde edilmiştir. c-MYC protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı; kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %39; %43 ve %15 artış gözlemlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak da A549 hücre hattında RB

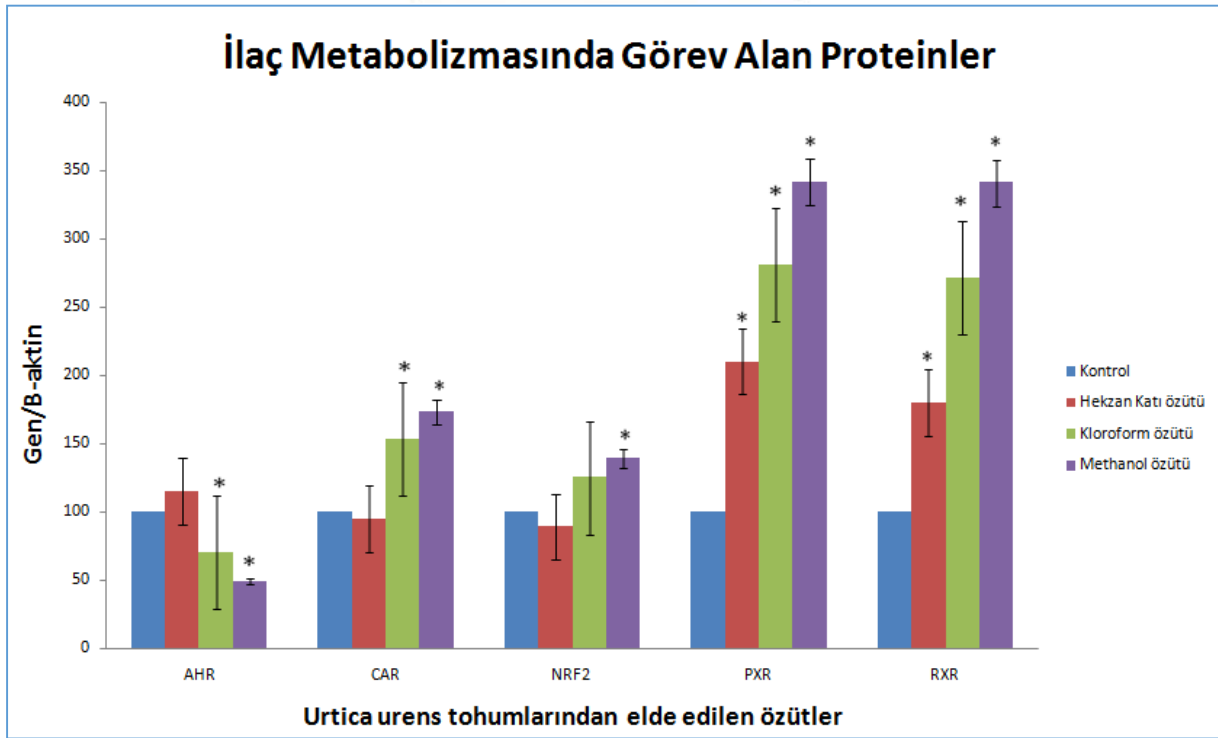
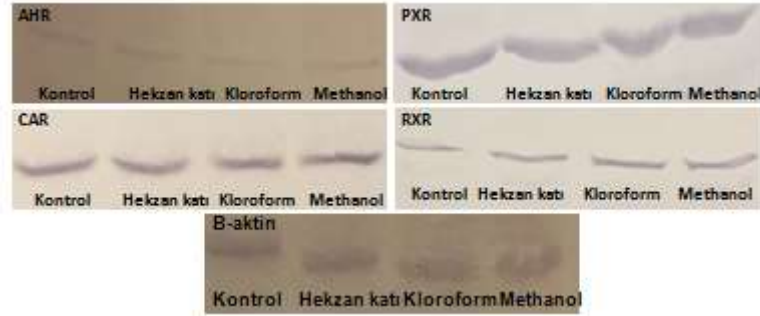
protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %75, %115 ve %145 artış elde edilmiştir (Şekil 3.119).



Şekil 3. 119. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında onkogenik ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

A549 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR; CAR; PXR ve RXR protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. AHR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonrasında sırasıyla %16, %48 ve %39 azalış elde edilmiştir. CAR ve PXR protein seviyelerinde ise özütlerden herhangi birinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim elde

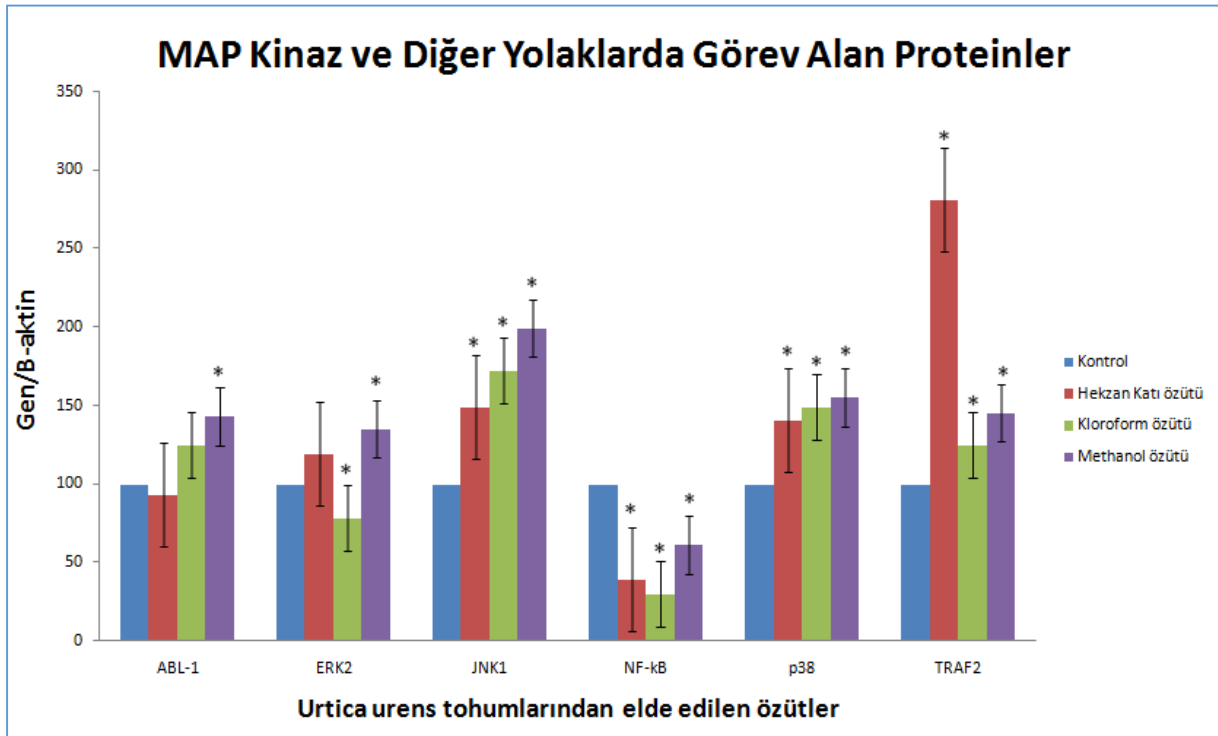
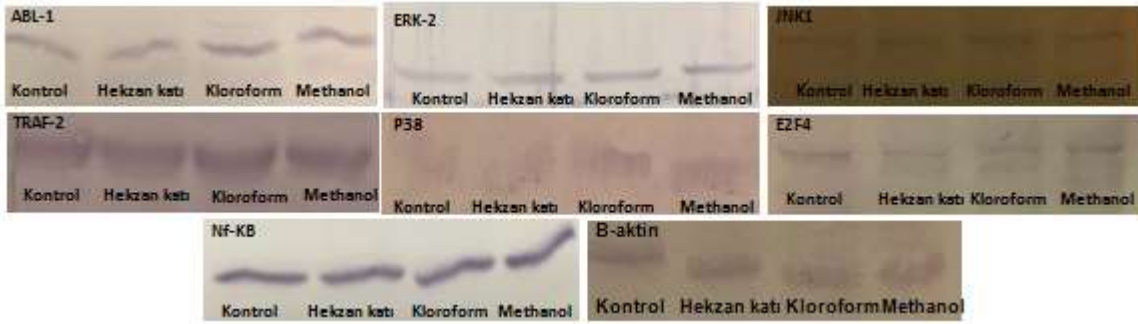
edilememiştir. Buna karşın RXR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %52; %89 ve %72 artış gözlenmiştir (Şekil 3.120).



Şekil 3. 120. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Tüm bunlara ek olarak A549 hücre hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerden ABL1; E2F4; ERK2; JNK1; P38; TRAF2 ve NF-KB protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. A549 hücre hattında ABL1 protein seviyesinde hekzan katı uygulaması sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim elde edilemezken, kloroform ve metanol özütü uygulamasında sırasıyla %45 ve %60 artış gözlenmiştir. ERK2 protein seviyesinde ise hekzan katı, kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %90, %70 ve %110 artış

gözlemlenmiştir. Buna karşın E2F4 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde metanol uygulamasında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken; hekzan ve kloroform uygulamasında %50 ve %28 azalma elde edilmiştir. P38 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %30, %135 ve %50 oranında bir artış gözlemlenmiştir. A549 hücre hattında hekzan katı; kloroform ve metanol uygulamasıyla JNK1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %90, %70 ve %50 artış elde edilmiştir. TRAF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim elde edilemezken; kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %55 ve %89 artış gözlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak NF-KB protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %25, %20 ve %35 artış elde edilmiştir (Şekil 3.121).

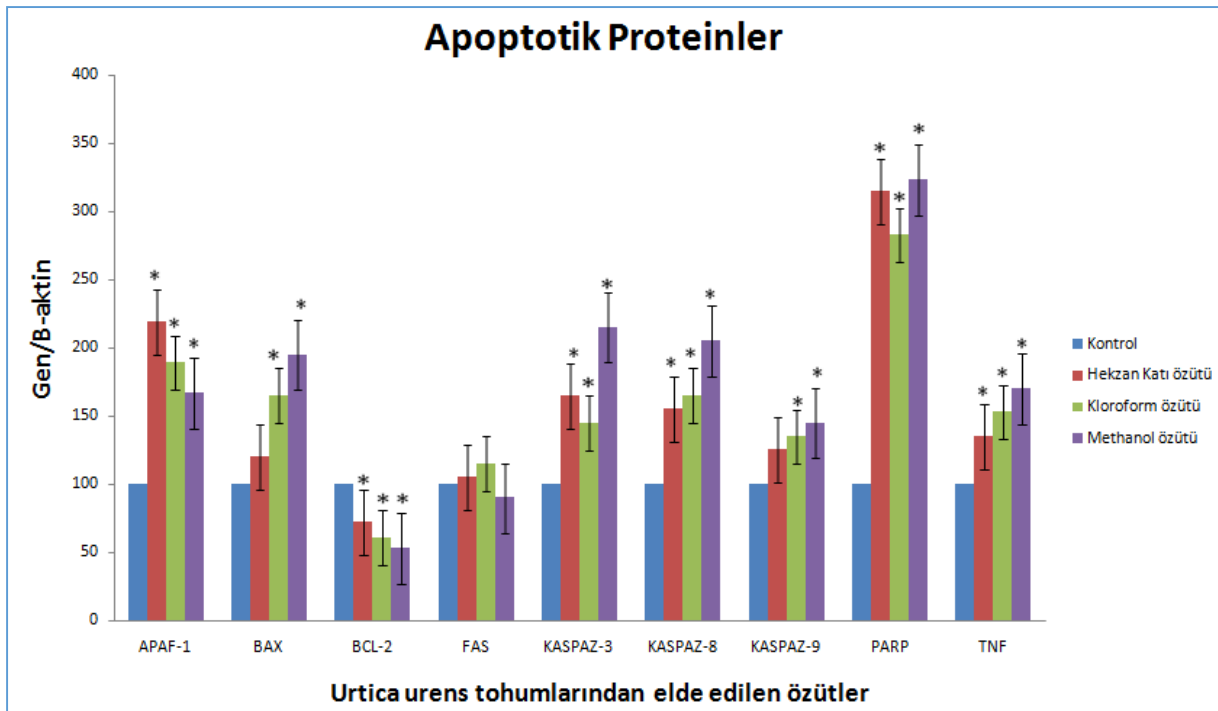
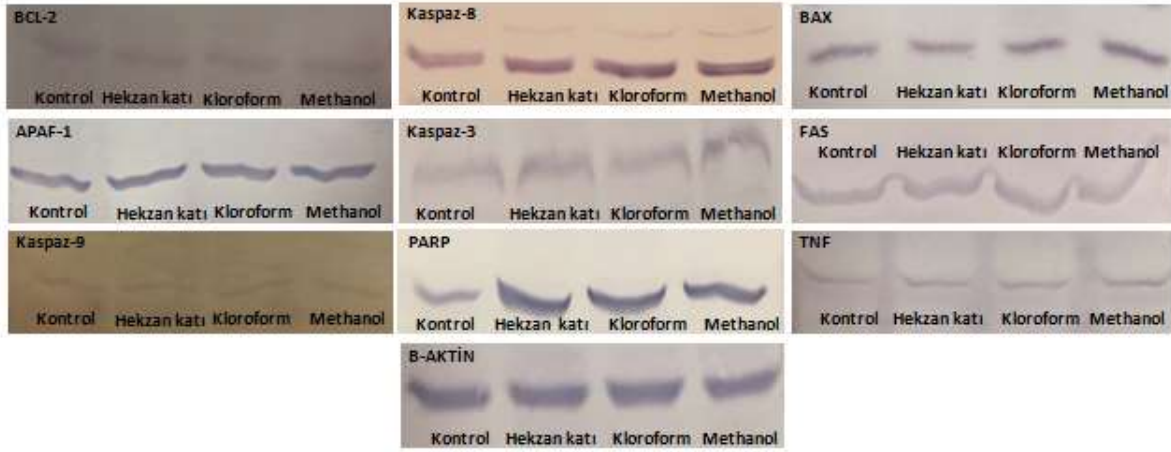




Şekil 3. 121. Küçük ısırgan otu tohumlarında elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) hattında MAP kinaz ve diğer yolaklarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.2.7.2 Caco2 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

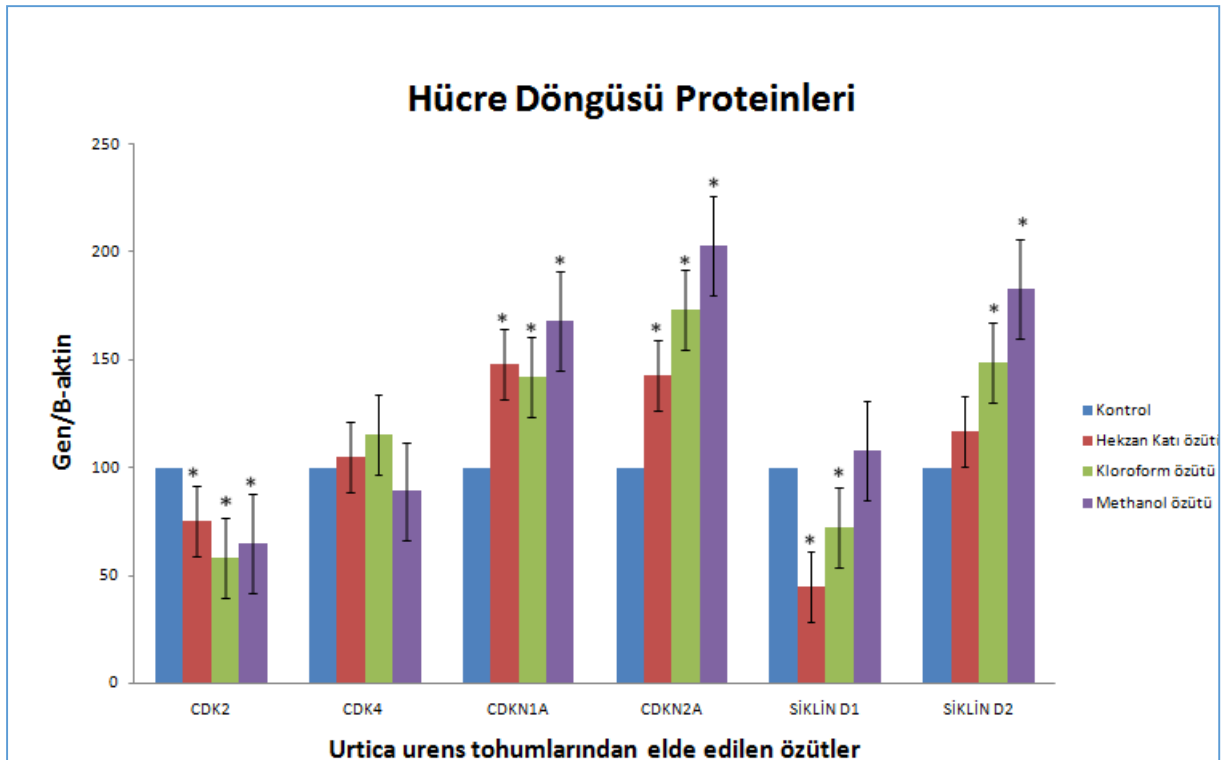
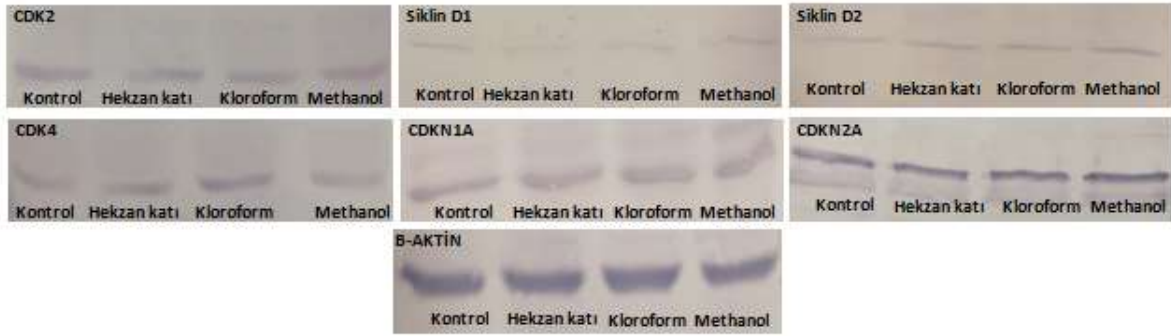
Caco-2 hücre hattına küçük ısırgan otundan elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin uygulaması sonucunda apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1, BAX, BCL2, FAS, KASPAZ3, KASPAZ8, KASPAZ9; PARP ve TNF-alfa protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri için belirlenen etkin doz değerlerinin uygulanması ile APAF1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda özütlerde sırasıyla %119, %89 ve %67 artış elde edildi. Bu hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması ile BAX protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %20, %65 ve %95 artış elde edilmiştir. Buna karşılık, BCL2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonrasında sırasıyla %28, %39 ve %37 oranlarında azalma gözlemlenmiştir. FAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı ve kloroform özütleri uygulamasında sırasıyla %5 ve %15 artış gözlemlenirken; metanol özütü uygulaması sonucunda %10 azalma gözlemlenmiştir. Kaspaz3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %65, %45 ve %115 artış gözlemlendi. Kaspaz8 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %55, %65 ve %105 artış elde edilmiştir. Buna karşılık, Kaspaz9 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %25, %35 ve %45 artış gözlemlendi. PARP1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %215, %183 ve %223 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak da Caco-2 hücre hattında TNF-alfa protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonrasında sırasıyla %35, %53 ve %70 artış gözlemlenmiştir. (Şekil 3.122).



Şekil 3. 122. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A, SiklinD1 ve SiklinD2 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında hekzan katı kloroform ve metanol uygulamasıyla CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %25, %42 ve %35 azalma gözlemlenmiştir. Caco-2 hücre hattında hekzan katı ve kloroform uygulamasıyla CDK4 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %5 ve %15

artış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %11 azalma gözlemlenmiştir. Caco-2 hücre hattında hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasıyla CDKN1A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %48, %42 ve %68 artış gözlemlenmiştir. Caco-2 hücre hattında hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasıyla CDKN2A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %43, %73 ve %103 artış gözlemlendi. Caco-2 hücre hattında hekzan katı ve kloroform uygulamasıyla SiklinD1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %55 ve %28 azalış gözlemlenirken; metanol uygulaması sonucunda %8 artış gözlemlendi. Son olarak Caco-2 hücre hattında hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasıyla SiklinD2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %17, %49 ve %83 artış gözlemlenmiştir (Şekil3.123).

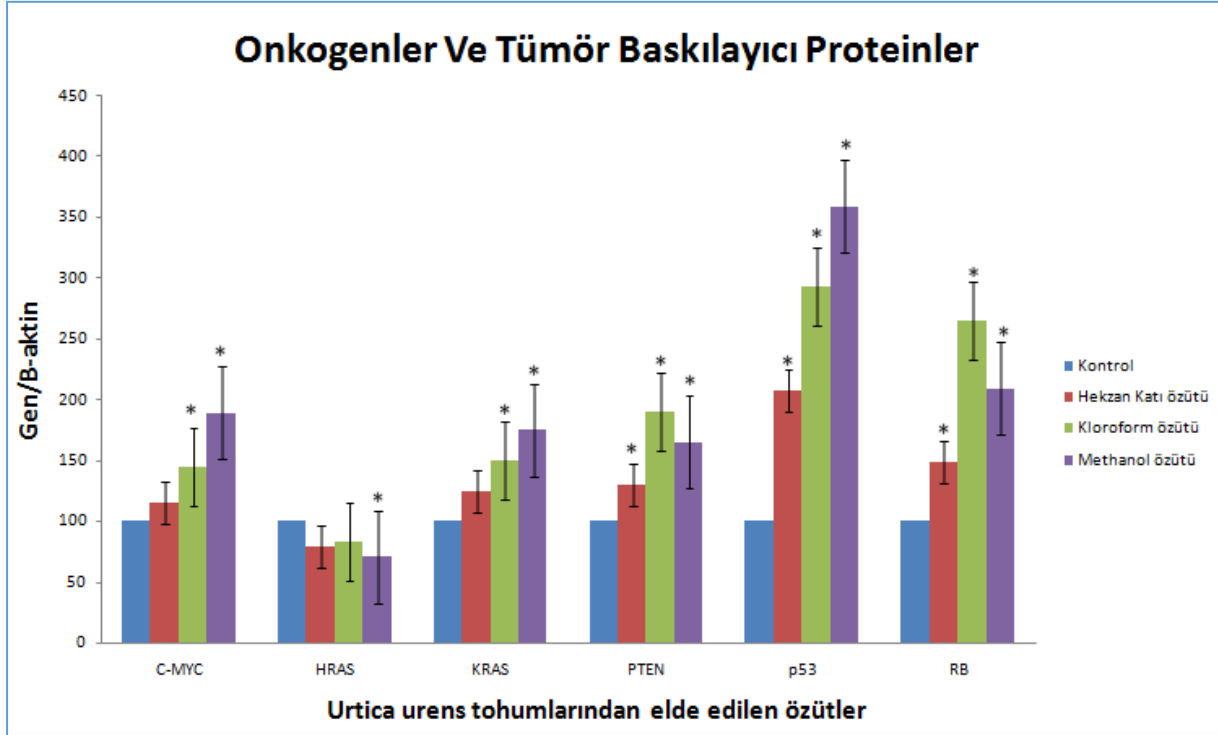


Şekil 3. 123. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) hücre döngüsü proteinlerin seviyesine olan

etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

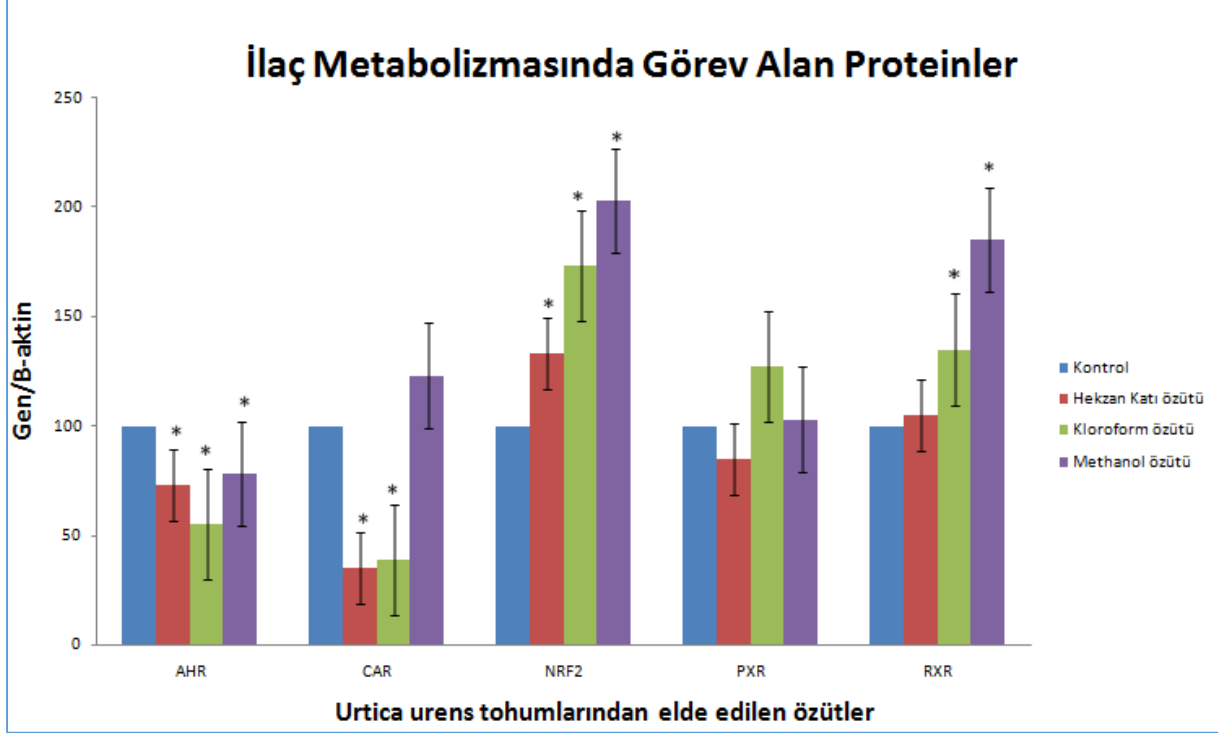
Caco-2 hücre hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerden c-MYC, HRAS, KRAS, PTEN, P53 ve RB protein seviyelerindeki değişimlere bakıldı. c-MYC protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütü uygulamasında %15, %45 ve %89 artış elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda bu hücre hattında HRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %21, %17 ve %29 azalma gözlenmiştir. KRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %25, %50 ve %75 artış gözlemlenmiştir. PTEN protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %30, %90 ve %65 artış gözlemlendi. P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %108, %193 ve %259 artış gözlemlendi. Tüm bunlara ek olarak, RB protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %49, %165 ve %109 artış elde edilmiştir (Şekil 3.124).





Şekil 3. 124. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

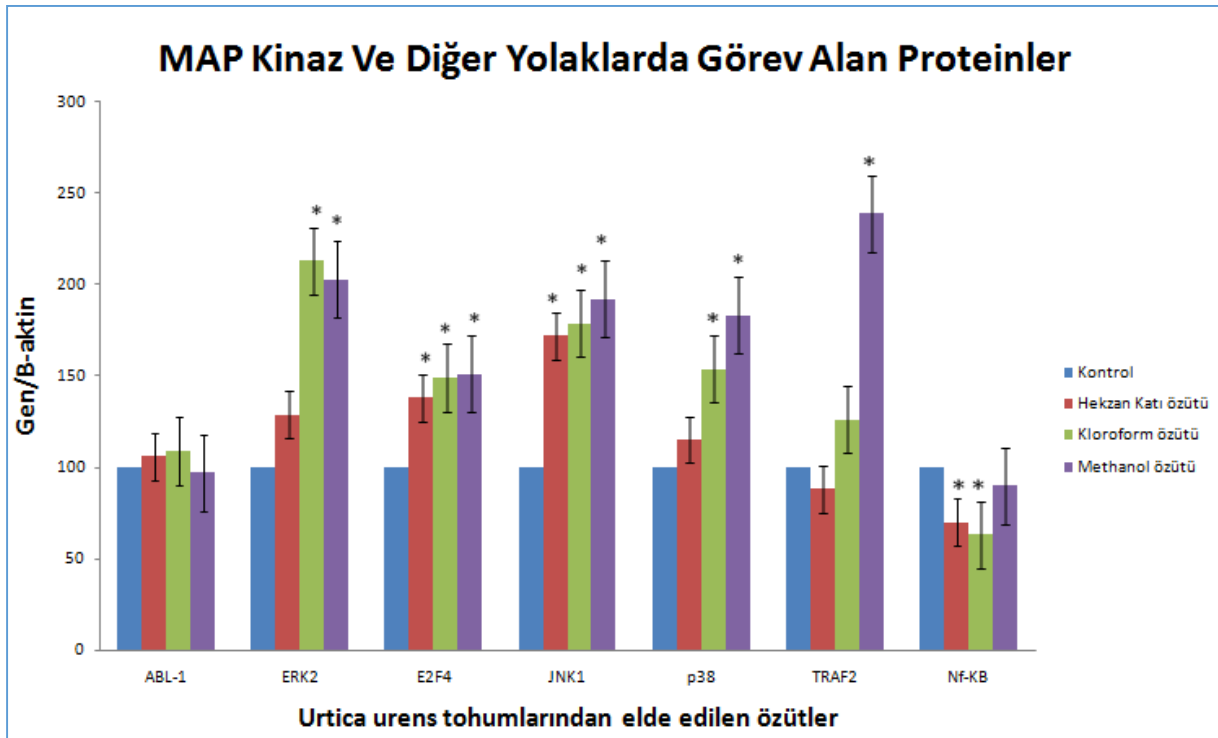
Caco-2 hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerden AHR, CAR, NRF2, PXR ve RXR protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. AHR protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütü uygulamasında %27, %45 ve %22 oranlarında azalış elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda bu hücre hattında CAR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı ve kloroform özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %65 ve %61 azalış gözlemlenirken; metanol uygulamasında ise %23 artış elde edilmiştir. NRF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %33, %73 ve %103 artış gözlemlendi. PXR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde metanol özütü uygulamasında istatistiksel olarak bir değişim gözlemlenmezken; hekzan katı özütü uygulamasında %15 azalma gözlemlenirken; kloroform özütü uygulamasında %27 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak, RXR protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %5, %35 ve %85 artış elde edilmiştir (Şekil 3.125).



Şekil 3. 125. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Tüm bu sonuçlara ek olarak Caco-2 hücre hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerden ABL1, E2F4, ERK2, JNK1, P38, TRAF2 ve NFkB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Caco-2 hücre hattında hekzan, kloroform ve etil asetat uygulamasıyla ABL1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmedi. TRAF2 protein seviyesinde de hekzan katı özütünde %22 azalma gözlemlenirken; kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %26 ve %139 artış gözlemlendi. Caco-2 hücre hattında hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasıyla ERK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %29, %113 ve %103 artış elde edildi. Benzer şekilde JNK1 protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri için sırasıyla %72, %79 ve %92 artış gözlemlendi. P38 protein bantlarının

densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %15, %54 ve %83 artış gözlemlendi. E2F4 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol sırasıyla %38, %49 ve %51 artış elde edildi. Son olarak Nf-KB protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütü uygulaması sonucunda sırasıyla %30, %37 ve %10 oranlarında azalma bulunmuştur (Şekil 3.126).

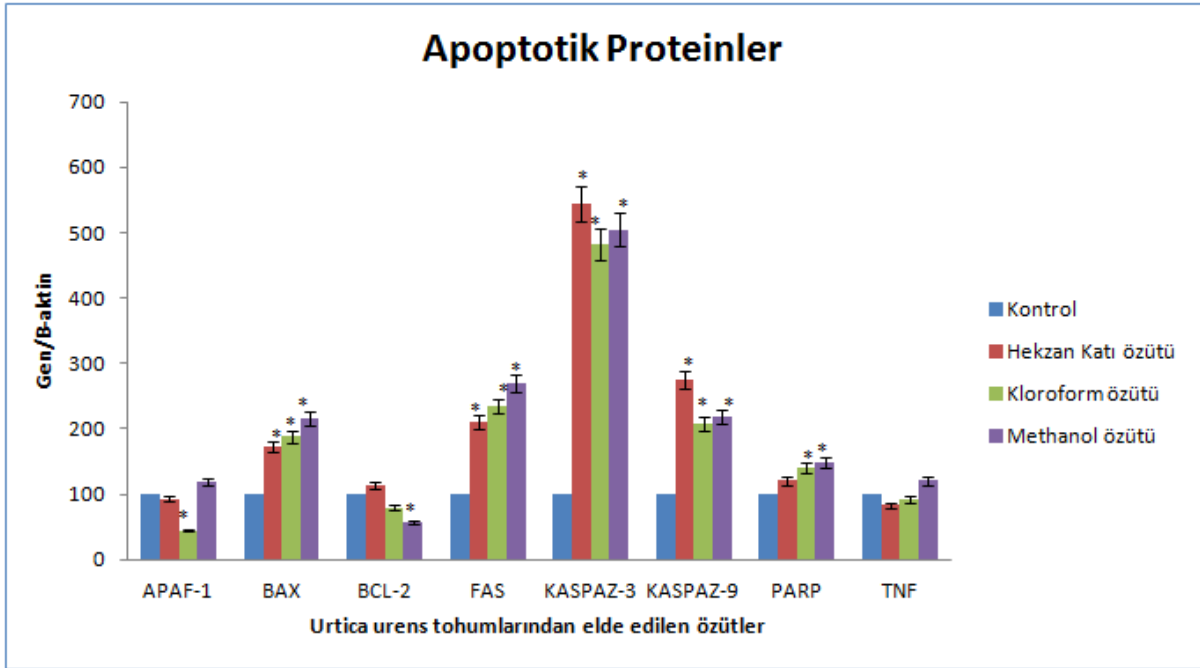


Şekil 3. 126. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco-2) Map kinaz ve diğer yolaklarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

3.1.2.7.3 LNCaP Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

Proje kapsamında çalıştığımız diğer bir hücre hattı olan LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otu özütlerinin uygulaması sonucunda apoptoz mekanizmasında görev alan APAF1, BAX, BCL2, FAS, KASPAZ3, KASPAZ9, PARP ve TNF-alfa protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması ile APAF1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda özütlerden kloroform özütünde %55 azalma elde edilirken diğer özütlerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir. BAX protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %73, %89 ve %115 artış tespit edilmiştir. Buna karşın BCL2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda ise metanol özütü uygulaması sonrasında %42 azalma gözlemlenirken diğer özütlerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir. LNCaP hücre hattında küçük ısırgan otuna ait hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması ile Kaspaz3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde sırasıyla %445, %383 ve %405 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde, kaspaz9 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %175, %109 ve %119 artış elde edildi. PARP1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %21, %41 ve %49 artış gözlemlendi. Tüm bunlara ek olarak da LNCaP hücre hattında TNF-alfa protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir (Şekil 3.127).

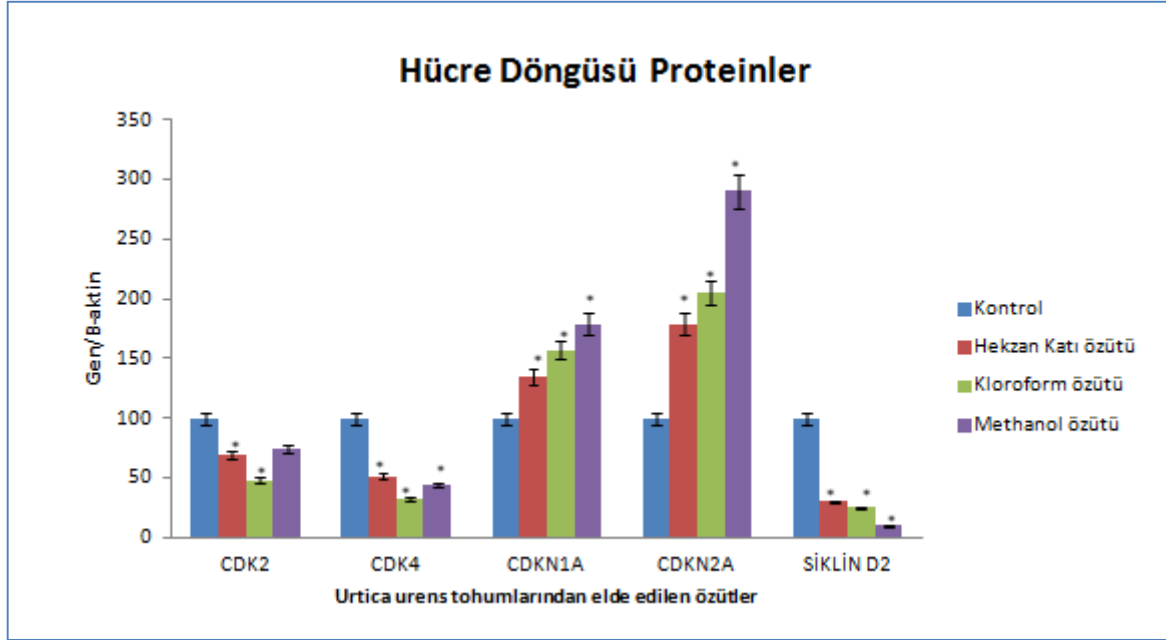




Şekil 3. 127. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) apoptotik proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

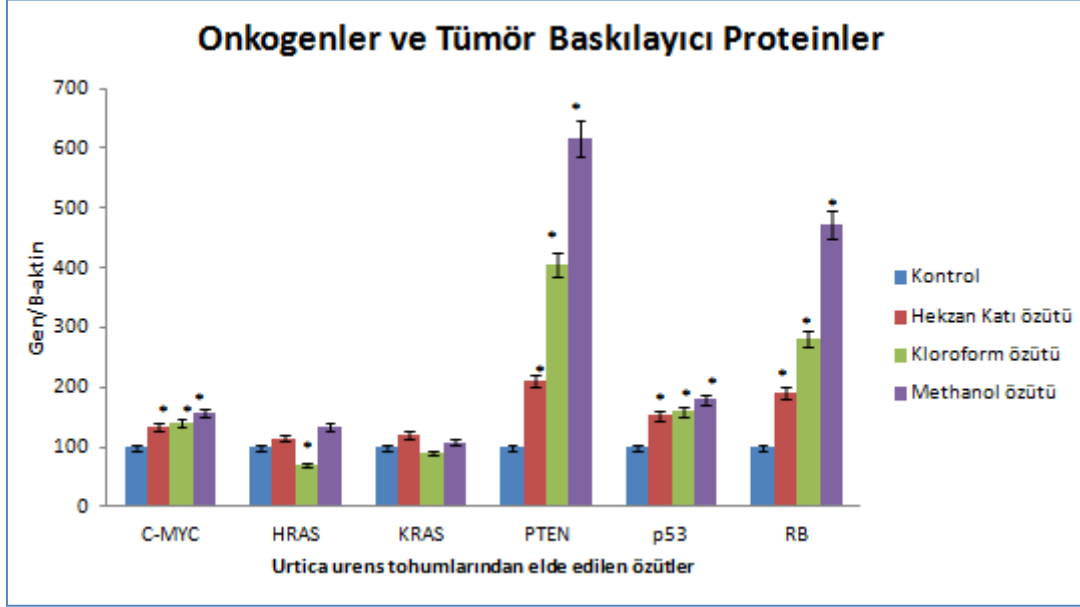
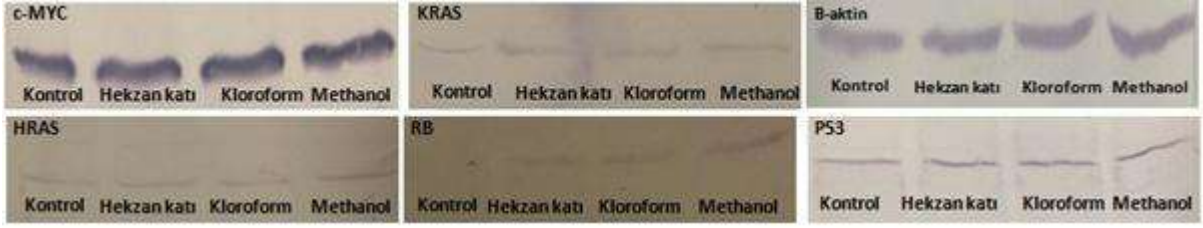
LNCaP hücre hattında hücre döngüsünde görev alan CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A ve SiklinD2 protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCaP hücre hattında hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasıyla SiklinD2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinin sırasıyla %70, %75 ve %90 azalma elde edilmiştir. CDKN1A protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinde sırasıyla %35, %57 ve %79 artış gözlenmezken; CDK4 protein seviyesinde sırasıyla %49; %67 ve %56 azalma elde edilmiştir. Benzer şekilde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulanan LNCaP hücre hattında CDK2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %30, %52 ve %26 azalma gözlemlenmiştir. Buna karşılık CDKN2A protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %79, %105 ve %190 artış elde edilmiştir (Şekil 3.128).





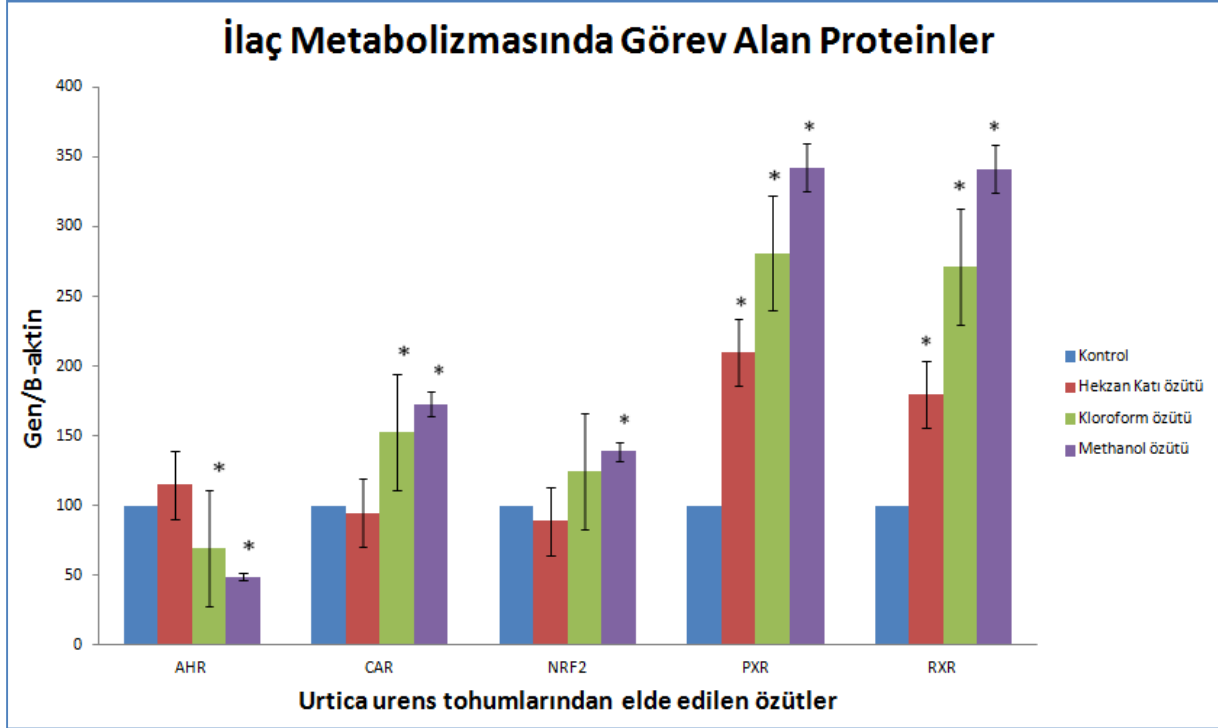
Şekil 3. 128. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hücre döngüsünde görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Çalışmaların devamında LNCaP hücre hattında onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerden yolağındaki proteinlerden c-MYC, HRAS, KRAS, PTEN, P53 ve RB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. Yapılan analizler sonucunda LNCaP hücre hattında c-MYC protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %35, %40 ve %57 azalma gözlemlenmiştir. KRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilememiştir. HRAS protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı ve metanol özütlerinde %15 ve %35 artış elde edilirken; kloroform uygulamasında ise %31 azalma elde edilmiştir. P53 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyelerinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri uygulaması sonucunda sırasıyla %53, %59 ve %78 artış elde edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak hekzan katı, kloroform ve metanol uygulaması sonrasında RB protein seviyesinde sırasıyla, %91, %181 ve %371 artış elde edilmiştir (Şekil 3.129).



Şekil 3. 129. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) onkogenler ve tümör baskılayıcı proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

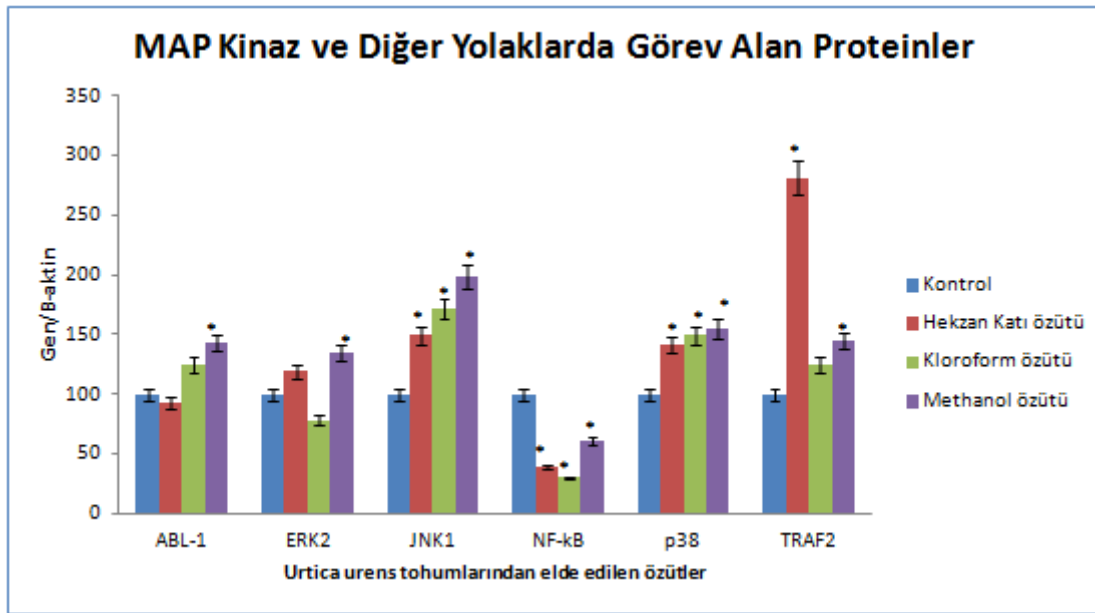
LNCaP hücre hattında ilaç metabolizmasında görev alan AHR, CAR, NRF2, PXR ve RXR protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. AHR protein seviyesinde de hekzan katı uygulaması sonucunda %15 artış gözlemlenirken, kloroform ve metanol uygulaması sonrasında sırasıyla %30 ve %51 azalma gözlemlenmiştir. CAR protein seviyesinde ise hekzan katı uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlenmezken; kloroform ve metanol özütlerinde sırasıyla %53 ve %73 artış elde edilmiştir. NRF2 protein seviyesinde ise özütlerden herhangi birinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim elde edilememiştir. PXR protein bantlarının dansitometrik analizi sonucunda hekzan katı, kloroform ve metanol uygulaması sonrasında sırasıyla %110, %181 ve %242 artış elde edilmiştir. Benzer şekilde RXR protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %80, %171 ve %241 artış elde edilmiştir (Şekil 3.130).



Şekil 3. 130. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat karsinoma hücre hattında (LNCaP) hattında ilaç metabolizmasında görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Tüm bunlara ek olarak LNCaP hücre hattında MAP kinaz ve diğer yollarda görev alan proteinlerden ABL1, ERK2, JNK1, P38, TRAF2 ve NF-KB protein seviyelerindeki değişimlere bakılmıştır. LNCaP hücre hattında ABL1 protein seviyesinde hekzan katı ve kloroform uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlenmezken, metanol uygulamasında protein seviyesinde %43 artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde ERK2 protein seviyesinde de hekzan katı ve kloroform uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlenmezken, metanol uygulamasında protein seviyesinde %35 artış gözlemlenmiştir. JNK1 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütü uygulamasında sırasıyla %49, %72 ve %99 artış elde edilmiştir. Buna karşın Nf-KB protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde ise hekzan katı, kloroform ve metanol özütü uygulamasında

sırasıyla %61, %70 ve %39 azalış elde edilmiştir. TRAF2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde hekzan katı, kloroform ve metanol uygulamasında sırasıyla %181, %25 ve %45 artış gözlemlenmiştir. Son olarak da P38 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde de hekzan katı, kloroform ve metanol uygulaması sonucunda sırasıyla %41, %49 ve %55 artış elde edilmiştir (Şekil 3.131).

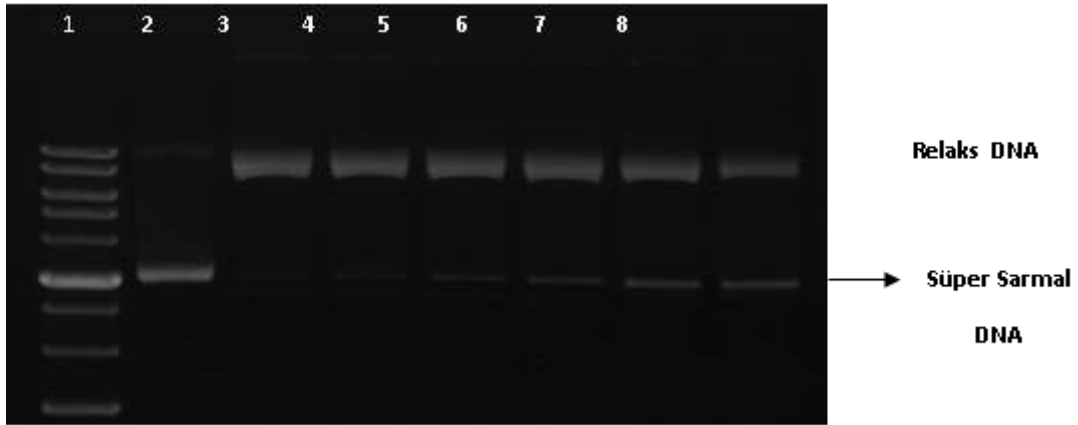


Şekil 3. 131. Küçük ısırgan otu tohumlarından elde edilen hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin insan prostat kansinoma hücre hattında (LNCaP) MAP Kinaz ve diğer yolaklarda görev alan proteinlerin seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

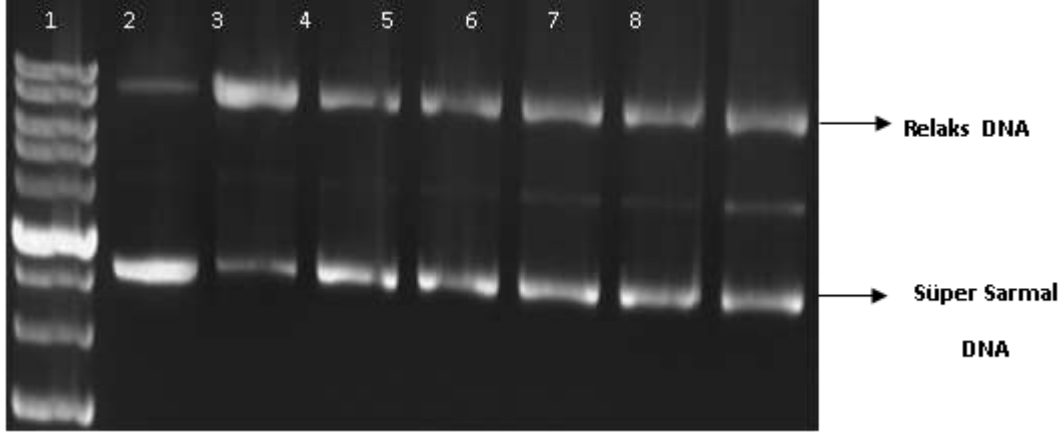
3.1.2.8 *Urtica urens* Tohum Özütlerinde Topoizomeraz I ve II Aktivitesinin Belirlenmesi

Küçük ısırgan otu (*Urtica urens*) tohumundan elde edilen hekzan, kloroform ve metanol özütlerinin **Topoizomeraz I** üzerine olan inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Deneyin ilkesi

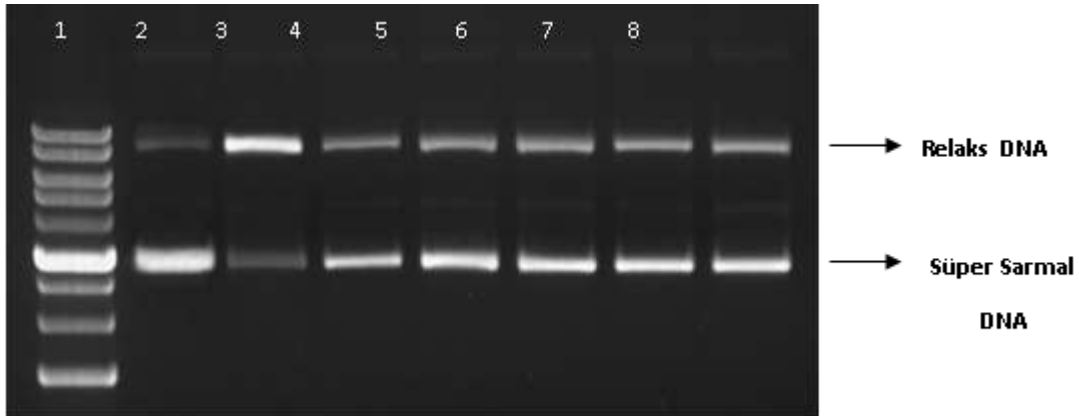
topoizomeraz I enziminin süpersarmal DNA substratını relakse etmesine ve bu özelliğın özütler tarafından ne kadar inhibe edildiğinin belirlenmesine dayanmaktadır. Diğer rapor döneminde belirtildiğı üzere çalışmalara Topoizomeraz I enziminin çalışması optimize edilmesiyle başlanmış ve yüksek sitotoksitate gösteren hekzan katı, kloroform ve metanol özütler denenmeye başlanmıştır. Bu amaçla, 20 µL hacimde; 3 ünite topoizomeraz I enzimi, 0,3 µg süpersarmal plazmid substratı (pBR322), değişik konsantrasyonlarda özüt, 2 µL 10X Topo I tamponu (35 mM Tris-HCl, (pH: 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl, 5mM DTT, 5 mM spermidin) karıştırılmış ve son hacim su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım, 37 °C 30 dakika inküb edildi. Her tüpe 6x yükleme tamponu eklenerek 90 voltta etidyum bromit (EtBr) içeren %1'lik agaroz jelde, TAE pH 8.0 tamponunda yürütüldü. Elde edilen jeller DNR Bio-imaging system görüntüleme sisteminde kullanılarak fotoğraflandı. (şekil 43-45). Elde edilen sonuçlara göre, Topoizomeraz I relaksasyon analizinde hekzan katı, kloroform ve metanol özütleri düşük konsantrasyonlarda bile (2.5 µg/ml) Topo I üzerinde inhibisyon etkisi göstermektedir. Bu inhibisyon etkisi en fazla hekzan özütünde gözlemlenmiştir (şekil 3.132-3.134).



şekil 3. 132 Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohum hekzan katı özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,3 µg pBR 322 DNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 5, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml Hekzan özütü.



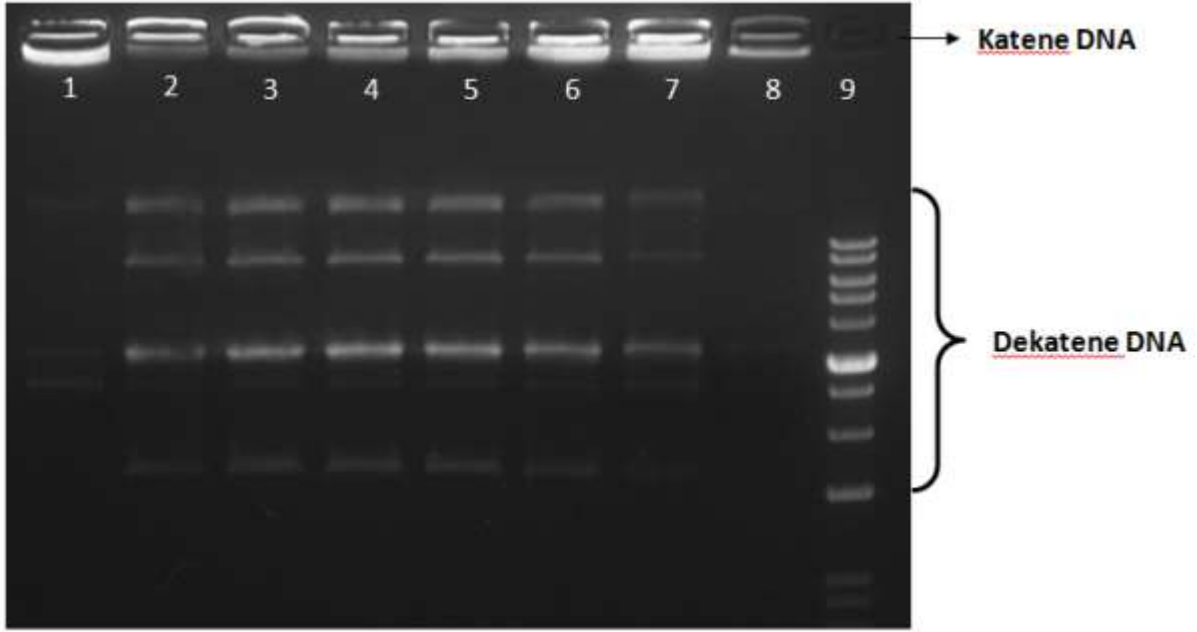
Şekil 3. 133. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohum kloroform özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,3 µg pBR 322 DNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz +0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 5, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml Kloroform özütü.



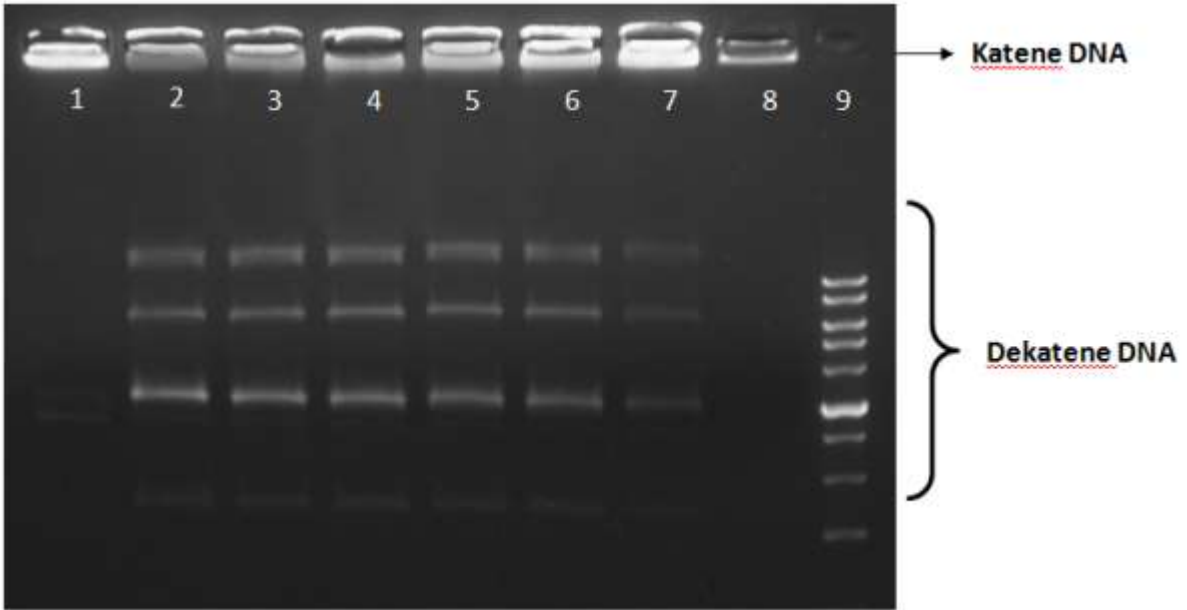
Şekil 3. 134. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohum metanol özütünün topoizomeraz I enzimine etkisi. Kuyucuk 1: DNA marker; Kuyucuk 2: 0,3 µg pBR 322 DNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz +0.1 % DMSO; Kuyucuk 4-8: 0,3 µg pBR 322 DNA + 3 Ünite Topoizomeraz + 5, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml I metanol özütü.

Ayrıca Tip II topoizomeraz enzimi ile yapılan topoizomeraz dekatasyon testleri ile ısırgan otu tohumundan elde edilen özütlerin herhangi bir inhibisyon etkisi olup olmadığı belirlenmiştir. Bu katene DNA ile dekatene ürünler arasındaki yapısal farkların analizleri sonucunda topoizomeraz II inhibitörlerinin tanımlanmasına yapılmaktadır. Bu amaçla, Topoizomeraz II enziminin çalışması optimize edilmiş ve özütlerin inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Topoizomeraz I enzim aktivitesinde olduğu gibi, 20 µL hacimde; 4 ünite topoizomeraz II enzimi, 0,35 µg katene DNA (kDNA), değişik konsantrasyonlarda özüt, 2 µL 10X ATP Topo II tamponu (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 0,5 mM Dithiothreitol) karıştırılmış ve son hacim su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. Özütlerin varlığında ve yokluğunda enzimin kinetoplast DNA substratları ile 37°C'de 30 dk inkübasyon

süresinde gösterdiği dekatasyon aktivitesine ait reaksiyon ürünleri 0,5 µg/mL EtBr içeren %1'lik agaroz jelinde 90 dk yürütüldükten sonra DNR Bio-imaging system görüntüleme sisteminde görüntülenerek analiz edilmiştir (Şekil 3.135-3.137)

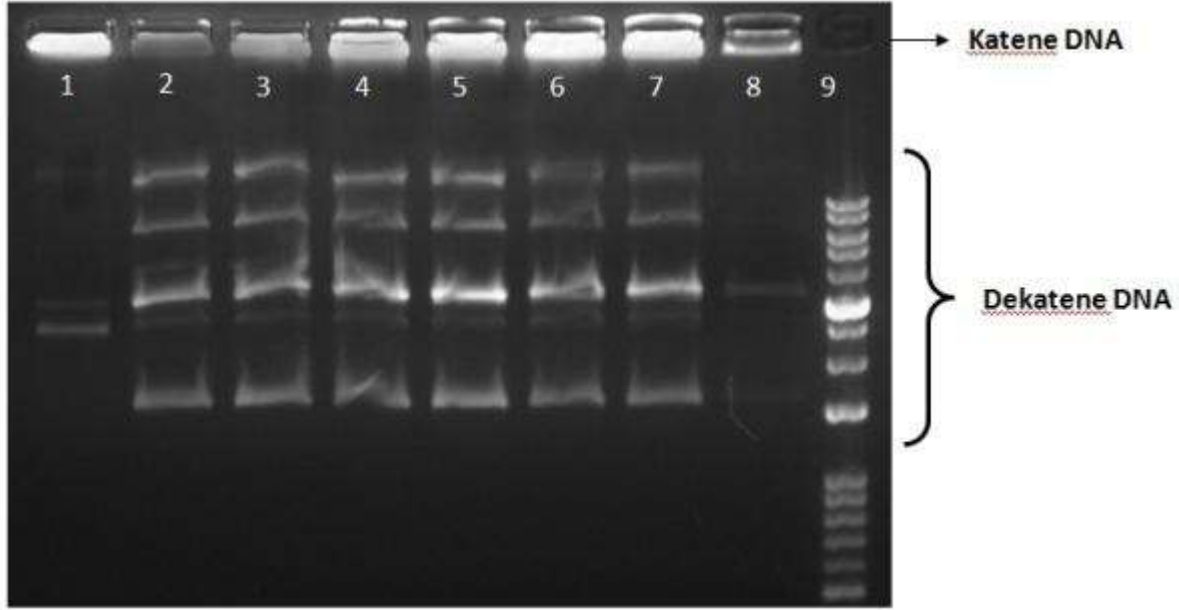


Şekil 3. 135. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumunun hekzan katı özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi; Kuyucuk 1: 0,35 µg kDNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 2: 0,35 µg kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3-7: 0,3 kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 5, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml hekzan özütü Kuyucuk 8: DNA marker.



Şekil 3. 136. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumunun kloroform özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi; Kuyucuk 1: 0,35 µg kDNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 2: 0,35 µg kDNA

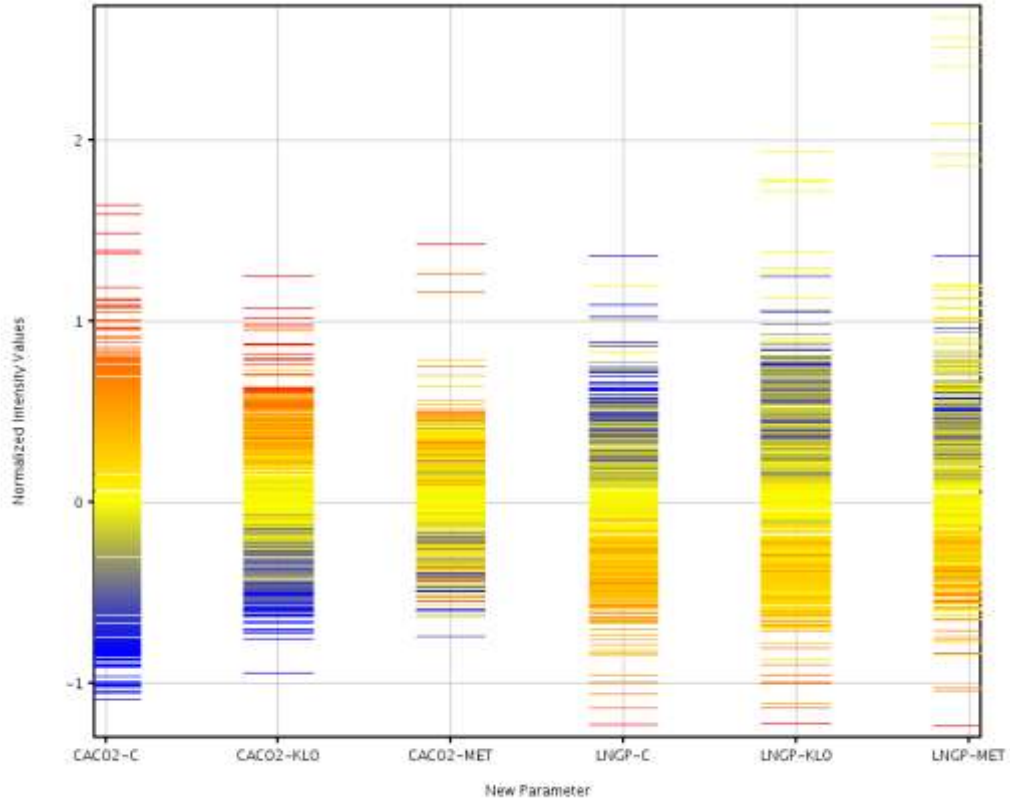
+ 4 Unite Topoizomeraz II + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3-7: 0,3 kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 5, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml hekzan özütü Kuyucuk 8: DNA marker.



Şekil 3. 137. Değişik konsantrasyonlardaki küçük ısırgan otu tohumunun metanol özütünün topoizomeraz II enzimine etkisi; Kuyucuk 1: 0,35 µg kDNA + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 2: 0,35 µg kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 0.1 % DMSO; Kuyucuk 3-7: 0,3 kDNA + 4 Unite Topoizomeraz II + 5, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml hekzan özütü Kuyucuk 8: DNA marker.

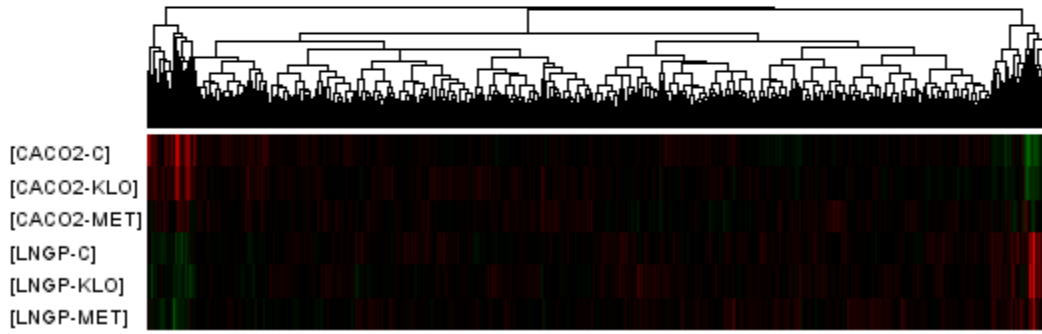
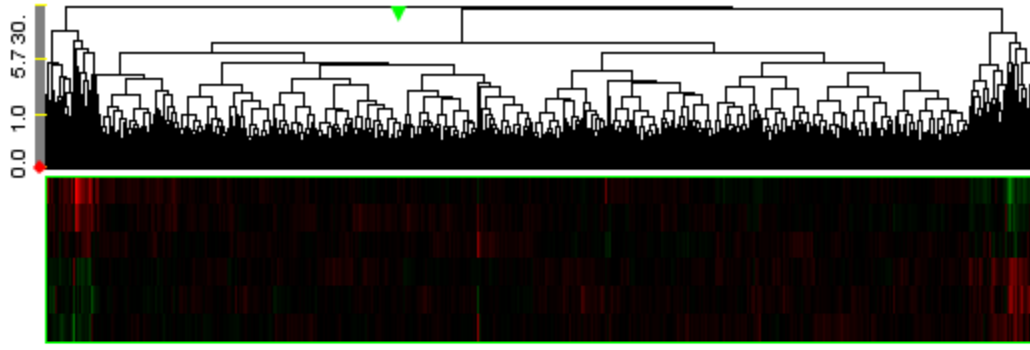
3.1.2.9 *Urtica urens* Tohum Özütlerinin Tüm Genom Transkriptome Çalışmaları

Çalışma kapsamında; 6 farklı gruptan toplam 12 adet RNA örneğinin cRNA dönüşümleri yapılarak Illumina iScan platformunda 45 binden fazla prob kullanılarak, “HumanHT-12 V4 Expression BeadChip” ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır. Çalışmada aynı örnek grubuna dahil olan örnekler aynı kodla adlandırılıp, teknik replika olarak değerlendirilmiştir. Ham mikrodizi verisi Genome Studio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Mikroarray verilerinin kalite kontrol amaçlı oluşturulan sinyal yoğunluk grafikleri aşağıda gösterilmiştir. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arka plan gürültüsü uzaklaştırılmış ve tüm örneklerin verisi yüzdelik (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur. Probların dağılım grafikleri Şekil 3.138’de verilmiştir.



Şekil 3. 138. Profil Plot gösterimi.

Normalize edilen verilerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu aşağıdadır. Hiyerarşik kümeleme 'Hierarchical' yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Uzaklık birimi olarak "Euclidean" ve bağlantı kuralı "Wards" olarak seçilmiştir. Ayrıca teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob ışımalarının ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu ve heta map ler ise Şekil 3.139'da verilmiştir.



Şekil 3. 139. Örnekler baz alınarak yapılan Cluster Analizi (Probu gösterim).

Çalışmalara 47.322 adet proba başlandı. Bu problemler ekspresyon seviyelerine göre filtrelendi. Normalize datalardan %20'nin altında ışığa alınan problemler filtrelendi. Filtreye prob takılmadı. Bir probtan, herhangi bir grupta %20'nin üzerinde ışığa alındıysa, filtreden geçmesi sağlandı ve bu sayede prob kaybı en aza indirildi. Gruplar arası One Way ANOVA ve Post Hoc Tukey testleri gerçekleştirilmiştir. FC (Fold Change) Analizi yapılarak 1.5'den büyük kat değişimleri her bir prob için artış ve azalış olarak belirlendi.

Caco-2 hücre hattında tohum kloroform uygulaması sonucunda, 1598 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 1551 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmış olduğu saptandı. Hücre hattında kloroform özütü uygulaması sonucunda bu genlerin hücre döngüsü, apoptoz, kromozom segregasyon, yağ asidi sentezi, RNA stabilizasyonu, protein kinaz kaskatı, mikro RNA prosesi gibi 577 değişik yolakta bulunduğu saptanmıştır. Benzer şekilde filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, Caco-2 hücre hattında metanol uygulaması 2444 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmasına, 2383 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmasına sebep olmuştur. Bu genlerin hangi yollar da bulunduğu saptanması amacıyla ileri analizler yapılmış ve 691 adet yolda özüt uygulaması sonucunda değişimler saptanmıştır. Analizler sonucunda



apoptoz, kanser, wnt sinyal yolağı, P53 sinyal yolağı, DNA replikasyonu, angiogenez, karbonhidrat, yağ, streol metabolizması, nükleotid metabolizması, protein kinaz, vitamin A ve Karetoid metabolizması gibi metabolik yollar tohumdan elde edilen kloroform özütü uygulaması sonucunda sonucunda değişmektedir. Tüm bu sonuçlar daha önce elde ettiğimiz Real Time PCR ve western blot sonuçları ile de örtüşmektedir. Benzer şekilde LNCaP hücre hattında tohum kloroform ve metanol özütlerinin tüm genome mRNA seviyelerine etkileri belirlenmiştir. Bu hücre hattında kloroform özütü uygulaması sonucunda elde edilen filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1386 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı, 1399 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Bu genlerin ileri analizi sonucunda protein sentezi, apoptoz, hücre döngüsü, mTOR Sinyal yolağı, DNA tamir yolağı gibi 464 değişik yolda değişimler saptanmıştır. Benzer şekilde, LNCaP hücre hattında metanol uygulaması sonucunda elde edilmiş filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1067 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 1146 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. DAVID analizleri sonucunda ksenobiyotik metabolizması, apoptoz, hücre döngüsü, kalsiyum metabolizması, oksidatif stress, nonkoding RNA metabolizması, pentoz fosfat yolağı gibi toplam 677 adet metabolik yoldaki genlerde değişimler gözlemlenmiştir.



4. TARTIŞMA

Kanser, organizmaya ait hücrelerin çeşitli nedenlerden dolayı kontrolsüz şekilde çoğalmaları ile karakterize edilen bir hastalıktır. Bu kontrolsüz çoğalma sonucu tümör adı verilen kitle oluşmaktadır. Tümörler normal vücut işleyişini, bulunduğu dokuya bağlı olarak sekteye uğratmakta ve organizmaya ölümlü sonuçlanabilecek zararlar vermektedir. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı 2013 yılı verilerine göre kanser hızı erkeklerde yüzde 267,9 kadınlarda ise yüzde 186,5'dir ve toplam kanser insidansı ise yüzde 227,2'dir. Yine bu verilere göre ülkemizde 2013 yılında 174 bin kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur. Bu bağlamda kanser tedavilerini daha etkin hale getirmek son yıllarda yapılan birçok çalışmanın hedefi olmuştur.

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

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



bileşik FDA tarafından 1992 yılında ovaryum ve 1994 yılında da meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır.

Bu nedenle, bu çalışmada Türkiye’de kanser hastalarının sıklıkla kullandığı bitkilerden birisi olan *Urtica urens*’in (küçük ısırgan otu) iyileştirici etkilerinin moleküler mekanizmaları insan kanser hücre hatlarında değişik yaklaşımlar ile açığa kavuşturulmaya çalışıldı. Ayrıca, bu bitkinin yaprak ve tohumları içeriği çeşitli teknikler kullanılarak ve saf madde izolasyonları tanımlamaya çalışıldı. Literatürde *Urtica urens* ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup olası anti-karsinojenik etkisinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması dışında anti-enflamatuar, anti-nosiseptiv etkili olduğu yönündedir (Marrassini ve diğ. 2010). Yapılan diğer bir çalışmada *Urtica urens*’in karsinojen/prokarsinojen ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 izozimleri ile bazı Faz II enzimlerinin enzim aktiviteleri ile protein ve mRNA seviyelerini etkilediğini göstermiştir (Özkarslı ve diğ. 2008, Agus ve diğ. 2009). Önemli bir kimyasal karsinojen olan 3-metilkolantren uygulanması ile indüklenen CYP1A1/1A2’in ısırgan tohumlarından hazırlanan ekstre verilmesiyle baskılandığı bu çalışmalar ile belirlenmiştir (Özkarslı ve diğ. 2008). Ayrıca, benzen, piridin, nitrozaminler gibi birçok düşük moleküler ağırlıklı prokarsinojenik maddelerin metabolizmasında rol oynayan CYP2E1 izozimi ekstre uygulanması sonucunda önemli derecede inhibe olmuştur (Agus ve diğ. 2009). Fakat bu izozimlerin ısırgan tohumu ekstresi sonucunda inhibisyonun moleküler mekanizması hakkında bir bilgi yoktur. Laboratuvarımızda yapılan bu çalışmalar ve elde edilen sonuçlar bu projenin önemli çıkış noktalarından birisi olmuştur. Ayrıca, *Urtica urens* bitkisinin seçiminde halk arasında özellikle kanser hastalarında çok fazla kullanılması sonrasında ise literatürde anti-karsinojenik ve anti-oksidant etki mekanizmaları hakkında veri bulunmaması diğer etmenler arasındadır.

Proje kapsamında *Urtica urens* yaprak ve tohumlarından hekzan, kloroform ve etil asetat çözücüleri kullanılarak özütler elde edilmiş ve bu özütlerin hem içerik analizleri hem de madde izolasyonları bu proje ile ilk defa gerçekleştirilmiştir. Tohum özütlerinde çok fazla miktarda şeker ve organik kalıntı olmasından ötürü saflaştırma işlemlerinde farklı yaklaşımlar denenmiştir. Örneğin, yüksek aktivite gösteren kloroform ve metanol özütleri saf madde izolasyonları için birleştirilmiş ve çalışılmış, fraksiyonlara ayırmak pek mümkün olmamıştır. Elde edilen ekstraların ve fraksiyonların GC-MS ve LC-MS teknikleri kullanılarak içerik analizleri yapılmıştır. GC-MS ile yaprak ve tohum hekzan özütlerinin analizinde majör bileşen olarak %90-95 oranında genellikle yağ asidi ve basit alken ağırlıklı bileşikler tespit edilmiştir. İnflamatuar eikozanoidler, sitokinler ve reaktif oksijen türlerinin üretimindeki azalma ile birlikte tümör hücrelerindeki inhibitör etkisinden dolayı birçok yağ asidi anti-kanser ilaçlara ek olarak



kullanılır (Hunt ve Dean 1989, Calder 2006, Deckelbaum ve diğ. 2006). Örneğin, doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarının fonksiyonu ve yapısı üzerindeki geniş etkileri (Szachowicz-Petelska ve diğ. 2007) dışında birde pankreatik adenokarsinoma hücrelerine (Pettersson ve diğ. 2002), neoplastik hücrelere (Germain ve diğ. 1998) ve lenfositlere (Kageyma ve diğ. 1989) karşı sitotoksik etkisi de belirtilmiştir. Yağ asidi profilinde tespit edilen çoklu doymamış yağ asitlerinden bazıları gama-linoleik asit (GLA), linoleik asit (LA) ve araşidik asittir. Yapılan bir araştırmada GLA, Tamoxifen adlı meme kanserinde kullanılan ilaçla birlikte kullanılmış ve hastaların ilaca yanıt verme oranında artış tespit edilmiştir (Kenny ve diğ. 2001). Başka bir çalışmada ise GLA'nın kronik lösemi K562 hücre hattında lipid peroksidasyonunu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu indüklediği saptanmıştır (Ge ve diğ. 2009). Farklı tümör hücreleri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada da *Euphorbia kansui* bitkisinden ekstrakte edilen LA'nın membran bütünlüğünün bozulması ve tümör hücresinde apoptozun indüklenmesi ile anti-tümör etkisi gösterdiği bulunmuştur (Farong ve diğ. 2008). *Urtica urens* bitkisinden elde edilen hekzan özütünün de içeriğindeki doymamış yağ asitlerinden ve eser miktarda bulunan diğer bileşiklerden dolayı anti-kanser etkisi gösterebileceği düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında, tohum ve yapraklardan elde edilen hekzan özütlerinde hekzadekanoik asit metil esteri, stigmasterol ve Daucosterin bileşikleri saflaştırılmış ve yapıları NMR çalışmaları ile aydınlatılmıştır. hekzadekanoik asit metil esteri birçok bitkide bulunan ve aynı zamanda izole edilen, anti-oksüdant, hipokolestrolemik, anti-kanser gibi değişik biyolojik aktiviteleri rapor edilen bileşiktir (Sudha ve ark., 2013; Ajoku ve ark., 2015). Stigmasterol, bir bitkilerde bulunan bir polisteroldür. Aynı zamanda; bitkilerde birçok maddenin yapımında kullanılan bir kök bileşiktir. Proje kapsamında çalıştığımız bitkinin yanı sıra birçok bitkinin tohum ve yapraklarından izole edilen anti-oksüdant, anti-kanser anti-mikrobial, Anti-artritik, Anti-astım, Diuretik ve Anti-inflamatuar aktivilere sahip bir bileşiktir (Woyengo ve ark., 2009; Ghosh ve ark., 2011; Sudha ve ark., 2013). Daucosterin stigmasterol gibi bir polisterol olup *Panax ginseng* gibi değişik bitkilerde izole edilmiş aktif bir bileşiktir. Bu polisterol, değişik hücre hatlarında düşük konsantrasyonda hücrelerin ölmesine sebep olmuştur (Guevara ve ark., 1999; Wang ve ark. 2007). Hem GC-MS sonuçlarında belirlenen fitol gibi maddeler hem de izole edilen maddeler küçük ısırgan otunun muhtemel anti-karsinojenik ve anti-oksüdant aktivitesi olabileceğini ortaya koymuştur.

Bunların dışında LC-MS ile kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin içerik analizleri hem yaprakta hem de tohumlarda gerçekleştirilmiş olup özellikle etil asetat özütünde diğerlerine kıyasla daha çok fenolik bileşik tespit edilmiştir. Hem kütüphane taramasında hem de



salisilik asit, kersetin, kaftarik asit, gentisik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, 4-hidroksibenzaldehid, şikorik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glukozit, rosmarinik asit, protokateşuik asit ethyl ester, sinamik asit, naringenin, kamperol, gallik asit, klorojenik asit, kateşol, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, rutin, hesperidin gibi fenolik maddeler standard olarak kullanılarak yapılan çalışmalarda bu özütlerin ve fraksiyonlarının bu maddeleri içerdiği saptanmıştır. Bitkilerde bulunan birçok doğal fenolik bileşiklerin (özellikle flavonoidler) kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan birçok genin, protein ve gen ekspresyon seviyelerini değiştirdikleri, bu sayede anti-karsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli bitkilerden elde edilen bu bileşiklerin pankreas, akciğer, deri, tiroid ve göğüs kanseri hücre hatlarında mitokondrial yolak aktivasyonu ile Bax/Bcl-2 oranını artırarak (Kang ve diğ. 2010, Shin ve diğ. 2010, Wang ve diğ. 2010, Zhang ve diğ. 2009) anti-kanser etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, Çalışma kapsamında *Urtica urens* yaprak özütlerinde urasil, rutin ve 4-hidroksibenzoik asit saflaştırılmış ve yapısı NMR çalışmaları ile aydınlatılmıştır. Bu maddeler literatür de bilinen ve daha önce değişik bitkilerde saflaştırılan maddeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu maddelerden rutin birçok bitkide bulunan ve Wnt sinyal yolağı, JAK-STAT sinyal yolağı, EGF sinyal yolağı, AP-1, NF-κB ve Akt sinyal yolları modüle ederek anti-karsinojenik aktivite gösteren bir bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır (Perk ve ark., 2014). Benzer şekilde urasil ve derivatları ile 4-hidroksibenzoik asit değişik yolları etkileyerek kanser hücrelerin ölmesine sebep olan bileşiklerdir (Wang ve ark., 2014; Seidel ve ark., 2016). Hem LC-MS sonuçlarında belirlenen maddeler hem de izole edilen maddeler küçük ısırgan otunun muhtemel anti-karsinojenik ve anti-oksidadant aktivitesi olabileceğini ortaya koymuştur.

Proje kapsamında yapılan içerik analizleri sonucunda *Urtica urens* bitkisine ait özütlerinin anti-kanser etki mekanizmalarını aydınlatılmak amacıyla 3 değişik hücre hattında sitotoksik etkileri ve farklı yolları ait yaklaşık 35 adet genin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakılmıştır. Yapılan sitotoksikite deneyi sonucunda yapraklarda hekzan, etil asetat ve kloroform ile tohumlarda hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinin özütünde ED(50) değerlerinin son derece düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1). Sitotoksikite sonuçlarına göre yukarıda belirtilen maddelerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu sonuçlara göre yüksek aktivite gösteren özütler aynı hücrelere uygulanmış ve bu hücrelerde birçok metabolik yolları ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde özüt uygulaması sonucunda meydana gelen değişimler ortaya konulmuştur.

Tablo 4. 1.Hücre hatlarında Küçük ısırgan otu uygulaması sonucunda elde edilen LD50 dozları.

		LD50		
		A549	Caco-2	LNCaP
YAPRAK	Hekzan özütü	27,8µg/ml	35,3µg/ml	20,5µg/ml
	Kloroform özütü	35,1µg/ml	42,5µg/ml	35,9µg/ml
	Etil Asetat özütü	29µg/ml	31,2µg/ml	25,6µg/ml
	Metanol özütü	73,6µg/ml	72,5µg/ml	78,1µg/ml
TOHUM	Hekzan katı özütü	28,45µg/ml	28,9µg/ml	31,3µg/ml
	Hekzan sıvı özütü	100,1µg/ml	126,15µg/ml	258,4µg/ml
	Kloroform özütü	38,5µg/ml	48,9µg/ml	36,3µg/ml
	Etil Asetat özütü	306,02µg/ml	128,35µg/ml	216,7µg/ml
	Metanol özütü	78,9µg/ml	33,96µg/ml	58,6µg/ml

Programlı hücre ölümü olan apoptozun gerçekleşmesi, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla kaspaz aktivasyonu ya da DNA hasarı neticesinde Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından mitokondriyal membran bütünlüğünün bozularak sitokrom c salınımla sitokrom c, kaspaz-9 ve Apaf-1'den oluşan apoptozom kompleksinin oluşumu temeline dayanmaktadır. Anti-karsinojenik çalışmalarda en çok apoptoz yolağında etki görülmektedir. Çalışmamız kapsamında apoptoz yolağıyla ilişkili Apaf-1, Bax, Bcl-2, Casp-3, Casp-9, Fas, Parp, Tnf ve Traf-2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde *Urtica urens* yaprakları ve tohumlarından elde edilen özütlerin uygulaması sonucunda Apaf-1, Bax, Casp-3, Casp8, Casp9, Fas, Traf2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişimler (özellikle artışlar) saptanmıştır. Bunlara ters olarak, ED(50) uygulaması sonucunda Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı bir azalışlar saptanmıştır. *Urtica urens* etil asetat özütünün mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlerden yola çıkarak anlamlı bir değişim gösteren bu genlerinin protein düzeyindeki etkisini saptamak için LD50 uygulanan hücrelerden western blot analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bu genlerin protein seviyelerinde mRNA çalışmalarını destekler elde edilmiştir. Apoptoz mekanizmasının temelinde kaspaz aktivitesi bulunmaktadır. Kaspazlar iki temel yolla aktive olmaktadır: İç ve dış yolak. (Wong 2011) İç yolak mitokondriyal permeabilitenin artması ve sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınması ile sonuçlanır. Bu yolak Bcl-2 ailesinden bir grup protein tarafından düzenlenir (Keane ve diğ. 2001). Bu şekilde kanser hücresi büyüme önleyici etkisi Bcl-2 gibi anti-apoptotik gen ürünlerinin ve çeşitli proliferatiflerin ifadesinde azalmayla ilişkilidir. Bcl-2



ailisi 2 gruba ayrılmaktadır: pro-apoptotikler (Bax, Bim vs.) ve anti-apoptotikler (Bcl-2, Bcl-W vs.). Bax/Bcl-2 oranı apoptozda önemli rol oynamaktadır. Bu oranın artması sitokrom c salınımı artırır ve kaspaz yolaklarını aktif hale getirir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, pro-apoptotik proteinleri nötralize eder ve komşu hücrelerinin apoptoza geçme yeteneğini belirlemede önemlidir. Bax normalde sitoplazmadayken apoptozu başlatmak için mitokondriye transloke olur (O'Brien 2008).Elde edilen tüm bu sonuçlar hücre hattında belirlenen LD50'nin anti-kanser etki mekanizmasını hücrede apoptozu iç ile dış yolak üzerinden indükleyerek sergilediğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışma kapsamında yapılan tüm genom transkriptom analizleri sonucunda anlamlı bulunan yolaklar arasında apoptoz regülasyonu yolağının bulunması da elde edilen verileri desteklemektedir.

Hücre döngüsü, siklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CKI'lerin düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde döngünün ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, sikline bağlandıklarında aktifleşir ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Çalışmamızda hücre döngüsünü düzenleyici CDK2, CDK4, CDKN1A, CyclinD1 ve CyclinD2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakıldığında *Urtica urens* özütlerin uygulaması sonucunda sadece bu genlerinde mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişim saptanmıştır. Bu değerler CyclinD1 ve D2 ile CDK2 ve 4 genleri için birçok özütte azalma CDKN1A ve 2A genlerinin mRNA ekspresyon seviyesinde de ise artış olarak karşımıza çıkmaktadır. ED(50)'de 4,03 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir. Bunlara ek olarak CylinD1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde etil asetat özütü uygulaması sonucunda sırasıyla ED(25) ve ED(50)'de 2,93 ve 2,97 kat anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak kanser hücre hatlarında özüt uygulaması sonucunda hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve özellikle hücrelerin G1 fazında durakladığı ortaya sürülebilir. Birçok bitki özütü ve resveratrol gibi birçok fenolik bileşiğin hücre döngüsünün G1, S, S/G2 ve G2 gibi farklı aşamalarında çeşitli hücrelerde inhibisyon etkisi gösterdiği hem *in vitro* hem de hayvanlarda kanser modeli ile *in vivo* olarak gösterilmiştir (Duthie 2007, Fresco ve diğ. 2006, Aggarwal ve Shishodia 2006, Meeran ve Katiyar 2008, Gusman ve diğ. 2001). Ayrıca tüm genom transkriptom analizleri sonucunda etil asetat için anlamlı bulunan yolaklar arasında hücre döngüsü proteinlerinin APC-C ilişkili yıkımı yolağının bulunması elde edilen verileri desteklemektedir. Anafaz ilerletici kompleks (Anaphase Promoting Complex or Cyclosome, APC-C) mitotik siklinlerin yıkımını ve mitozdan çıkışı kontrol etmektedir. G1 fazının uygun uzunluğunu koruyan bu kompleks interfazda aktiftir (Peters 2002).



Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptoza yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler. Bu genlerden başlıcaları: Retinoblastoma (Rb), p53, PTEN, BRCA-1 ve BRCA-2, Adenomatöz polipozis koli (APC), VHL, NF-1 ve NF-2 genleridir. PRb (Rb protein) hücre siklusunda G1'den S fazına ilerlemesinde fren görevi yapan proteindir. Bu protein fosforilasyon ile düzenlenir. Aktif defosforile formu E2F ailesi transkripsiyon faktörlerini bağlar ve hücre siklusunun G1'den S fazına geçmesine engel olur. Hücre büyüme faktörleri ile uyarıldığı zaman, Siklin D / Siklin bağımlı kinaz 4 (CDK 4) / CDKN2A (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A) kompleksi pRb'ü fosforile ederek inaktive eder ve hücre siklusunun S fazına geçmesini sağlar. İnsan kanserlerinin çoğunda hücre siklusu bu noktada düzenleyen düzenleyicilerin (CDKN2A, siklin D, CDK4 ve Rb) en azından biri mutasyonludur (Zhuang ve ark., 2010, Semczuk ve ark., 2004). Diğer önemli tümör baskılayıcı gen p53'tür. p53 geni 17. kromozom üzerinde bulunur. 11 eksondan oluşur. DNA hasarı sonrası ekspresyonu artar ve DNA tamiri tamamlanana kadar hücrenin S fazına girmesini engeller. Bu durumda, hücrede p53 proteini, p21 proteininin yapımını stimule eder. P21, CDK2 ile birlesince siklin bağımlı kinaz-siklin yolağını inhibe eder ve hücre bölünmede bir sonraki safhaya geçemez. Hücre siklusu durunca DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu artırır. Şayet hata giderilmez ise bu hücreleri apoptoza yönlendirerek yok edilmelerini sağlar. p53 tümör baskılayıcı gen, insan kanserlerinde en sık mutasyon gösteren genlerden biridir (Machado-Silva ve ark., 2010). Çalışma kapsamında tümör baskılayıcı PTEN, P53 ve RB proteinleri ile bunların düzenlenmesinde rol alan E2F4 proteinin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerine bakıldığında *Urtica urens* yaprak ve tohumlarından elde edilen özütlerin uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Ayrıca çalışmaların devamında yapılan western blot yöntemiyle P53, Rb, PTEN ve E2F4 genlerin protein düzeyinde analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda özütlerin mRNA sonuçlarına benzer şekilde bu genlerin protein seviyelerinde 5 kata kadar anlamlı artışlar tespit edilmektedir. PTEN ekspresyonundaki artış, azalan Akt/PKB aktivitesi, hücre yaşamı, mitozu ve anjiyogenezi baskılar, apoptozu indükler (Abate-Shen ve Shen 2000, Nelson ve diğ. 2003, Dong 2006). Elde ettiğimiz veriler neticesinde *Urtica urens* özütlerinin tümör baskılayıcı P53, PTEN ve RB için gen ve protein düzeylerindeki anlamlı artışın hücre döngüsünü baskılayıcı, apoptozu indükleyici etki göstererek anti-kanser etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca birçok kanser türünde aktive olan bir transkripsiyon faktörü c-Myc hücre döngüsünün ilerlemesi ile DNA replikasyonunu uyarır (Dong 2006). c-Myc için yapılan qRT-RZR sonucunda mRNA seviyesinde bazı özütlerde ve bazı hücre hatlarında anlamlı bir



azalış gözlenirken, western blot analizi sonucunda protein seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Proliferatif hücre içi sinyal yolları olan mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), fosfotidil inozitol-3 kinaz (PI3K) ve nükleer faktör-kappaB (NFkB) tümör hücresinin çoğalmasında merkezi öneme sahiptirler. Bu yollar, büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanmasını takiben aktive olurlar ve DNA'ya direkt bağlanarak transkripsiyonu arttıran mediyatörlerin sentezine aracılık ederler. Hücre içi sinyal yollarında görev alan AKT1, ERK2, JNK1 ve P38 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerindeki ekspresyonlarında anlamlı değişimler saptanmıştır. Tüm bunlara ek olarak yapılan western blot analizinde bu sonuçları destekler değişimler saptanmıştır. Akt (serin/treonin kinaz) ve P13K aktivasyonu meme, ovaryum, özefagus gibi birçok kanser türünde gösterilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS), PTEN'in inhibisyonu aracılığıyla Akt'ı aktive etmektedir. Aktifleşmiş Akt, siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27'nin ekspresyonunu azaltarak ve c-Myc ve siklinD1 ekspresyonunu arttırarak hücre proliferasyonunu uyarır. Akt, MDM2 etkileşimi yoluyla da P53'ün proteozomal degradasyonunu arttırarak ve caspase-9 gibi proapoptotik molekülleri inaktive ederek apoptozu inhibe eder (Chesire ve Isaacs 2003, Reuter ve diğ. 2010).

Bitkilerde bulunan birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidler) kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan birçok genin, protein ve gen ekspresyon seviyelerini değiştirdikleri, bu sayede anti-karsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Örneğin, fitokimyasalların kullanılarak apoptoz indüklenmesi ve kanser hücrelerin yok edilmesi, kanser tedavisinde çok önemli ve umut vaat edici bir strateji haline gelmiştir. *Ginkgo*, *Echinacea*, sarımsak, zencefil gibi bitkilerden elde edilen ekstreler veya droglar, oral kavite, pankreas, akciğer, deri, tiroid ve göğüs kanser hücre hatlarında kaspaz 3'e bağımlı, JNK-c-Jun-FasL-kaspaz-3 sinyal yolağını aktive ederek, Bax/Bcl-2 oranını arttırarak, p53 yolağını aktive ederek, mitokondrial yolak aktivasyonu ile (sitokrom c, Bax, Bcl-2, kaspaz 8, kaspaz-9, kaspaz-3), TNF, nitrik oksit sentaz, nükleer faktor Kappa B (NF-kappaB) gibi proteinlerin seviyelerini değiştirerek apoptozu indükledikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. (Kang ve ark., 2010., Oyagbem ve ark., 2010, Shin ve ark., 2010, Wang ve ark., 2010 Kuang ve ark., 2009, Zhang ve ark., 2009). Örneğin, üzümünden izole edilen resveratrol anti-karsinojenik etkisini COX-2, iNOS, JNK, MEK, AP-1, NF-κB, p21 Cip1/WAF1, p53, Bax, Kaspazlar, survivin, siklin D1, siklin E Bcl-2, Bcl-xL, cIAP, Egr-1, PKC, PKD, Kasein kinase II, 5-LOX, VEGF, IL-1, IL-6, IL-8, AR, PSA, CYP1A1, Typell-PtdIns-4 kinaz, Cdc2-tyr15*, HO-1, Nrf2, endothelin-1 gibi birçok proteinin seviyesini değiştirerek göstermektedir. Benzer şekilde, zerdaçal'dan izole edile curcumin ve



deoksicircumin NF- κ B, AP-1, Egr-1, STAT1, STAT3, STAT5, PPAR γ , EpRE, CBP, β -katenin, Nrf2, IKK, EGFR, HER2, Akt, Src, JAK2, TYK2, JNK, PKA, PKC, VCAM-1, Bcl-2, Bcl-XL, ICAM-1, TF, AR/ARP, P53, MDR, ELAM-1, FTPaz, GST, GSH-px, uPA, HO, XOD, siklin D1, 5-LOX, COX-2, I NOS, MMP-9, TNF, IL-6, IL-8, IL-12 kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan proteinleri miktarlarını ve aktivitelerini değiştirdiği ve bu sayede anti-karsinojenik, anti-mutajenik, anti-oksidant etki gösterdiği bilinmektedir (Aggarwal ve ark., 2006). Proje kapsamında elde edilen sonuçlara bakıldığında hem mRNA hem de protein seviyesinde yukarıdaki bahsedilen proteinlerin ekspresyon seviyelerinde ısırgan otundan elde edilen özütler anlamlı değişikliklere sebep olarak kanserli hücreleri ölmesine ve dolayısıyla anti-karsinojenik etki gösterdiği sonucuna rahatlıkla varılmaktadır.

DNA topoizomerazlar DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon, kromozomların ayrılması gibi olaylarda rol oynayan enzimlerdir. Bu enzimler hücre çoğalması ve bölünmesinde mutlak gerekli enzimlerdir. Dolayısıyla, topoizomerazların inhibe edilmesi kontrolsüz bölünen kanser hücrelerin bölünmesini durdurması açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle topoizomeraz inhibitörlerinin tanımlanması ve de bunların kanser kemoterapik ajanı olarak kullanılması giderek artan bir şekilde karşımıza çıkmaktadır (Champoux, 2001). Özellikle Topoizomeraz II'nin hücre döngüsü sırasında miktarının değişmesi, bu enzimi çeşitli anti-karsinojenik ajanların hedefi haline getirmiştir. Tüm bunlara ek olarak, çalışma kapsamında *Urtica urens* özütlerinin DNA topoizomeraz I ve II enzimi üzerine inhibisyon etkileri relaksasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Relaksasyon yöntemiyle alınan deney sonuçlarına göre yaprak hekzan, kloroform ve etil asetat ile tohumlarda hekzan katı, kloroform ve metanol özütlerinde düşük konsantrasyonlarda bile DNA topoizomeraz I enzimi üzerine inhibitör etkili olduğu saptanmıştır. Bu özütlerin inhibisyon etkisi kıyaslandığında hekzan özütündeki inhibisyon etkisinin daha fazla olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan DNA topoizomeraz II enzimi ile yapılan dekatensasyon testinden elde edilen sonuçlara göre yaprak hekzan özütünde yüksek bir inhibisyon etkisi gözlenirken, kloroform ve etil asetat özütünde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Tohumlarda ise her üç özütte yüksek bir topoizomeraz II inhibe edici özelliğe sahip olduğu sonucuna varılabilir. Elde edilen veriler neticesinde DNA topoizomeraz I ve II enzimleri ile yapılan DNA relaksasyon, dekatensasyon analizlerine göre özellikle hekzan özütlerinin içeriğindeki bileşik ve/veya bileşiklerin anti-kanser etkisinde bu enzimleri hedefleyebileceği düşünülebilir. Ancak yaprak kloroform ve etil asetat özütü içeriğindeki bileşik ve/veya bileşiklerin DNA topoizomeraz II enzimini hedeflemediği, anti-kanser etkisinin bu enzimden bağımsız olarak farklı yollar üzerinden gerçekleştiği sonucuna varılabilir.



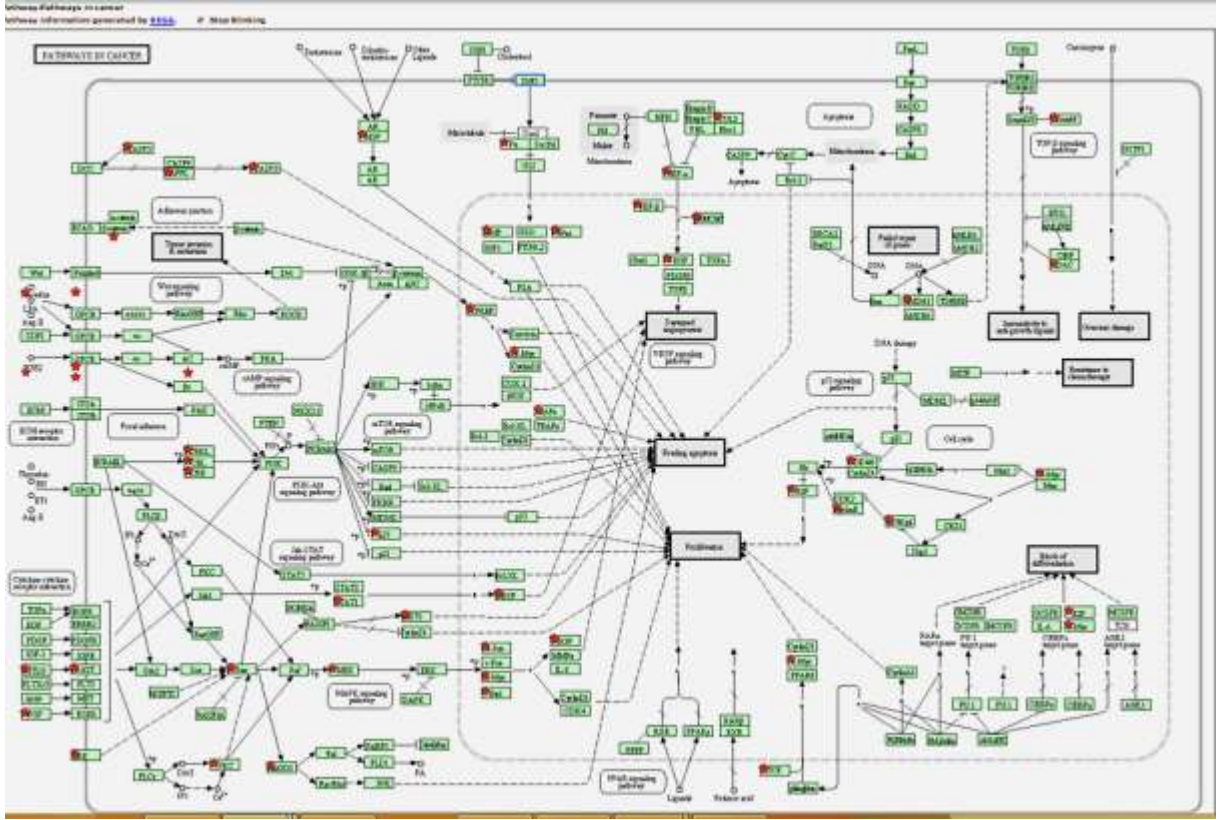
Birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidlerin) özgün sitokrom P450 izozimlerini indükledikleri, aktivitelerini artırdıkları veya ketledikleri ve böylelikle ikincil uyartılara olan cevaplarını değiştirdiği bilinmektedir. Birçok karsinojenin DNA gibi makro moleküllere kovalent olarak bağlanabilen reaktif elektrofilik metabolitlere veya inaktif metabolitlere dönüşümleri CYP450 (özellikle CYP1A, CYP1B, CYP2E ve CYP3A) enzimlerince katalizlenmektedir (McLemore 1990, Smith ve ark. 1996, Conney 2003). Oluşan reaktif metabolitler diğer Faz I veya Faz II enzimlerince inaktif ürünlere dönüştürülmektedir. Sonuç olarak, karsinojenlerin bu şekilde detoksifikasyonunda rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ve/veya diğer Faz I ve Faz II enzimlerinin indüksiyonu, karsinojenlerin etkilerine karşı bir koruma ve savunma sistemi oluşturabilir. Bütün P450 izoformlarının içinde CYP1A (CYP1A1 ve CYP1A2) karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasında rol oynadığından öncelikli bir yer tutar. Bu iki üye potansiyel mutajenik olan benzo(a)piren, sigara dumanında ve mangalda pişirilmiş yiyeceklerde bulunan aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunda rol oynarlar (Adamson, 1996; Hümmereich, 2004; Kim, 2005; Ma Lu, 2007). Aril hidrokarbon reseptörü (AhR) CYP1A ailesi dahil birçok genin transkripsiyonel olarak düzenlenmesinden sorumlu reseptördür. Bu çalışmada ısırgan otundan elde edilen özütlerden hekzan özütlerinde AhR'nin mRNA ve protein seviyesinde hücre tipine göre değişimler saptanmıştır. Özellikle bu proteinin hekzan özütü uygulaması sonucunda azalması birçoğu karsinojenik, mutajenik olan benzo(a)piren, aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunu azaltarak reaktif ara ürünlerin oluşumunu azaltabilir. Fakat bazı özütler bu proteinin ekspresyonunu artırarak kanser oluşumu riskini artırabilir.

İnsanlarda NR1I3 geni ile kodlanan konstitüif androstan reseptörü (CAR) nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir (Baes ve diğ. 1994). CAR, PXR ile birlikte ksenobiyotik ve endobiyotik maddelere bir sensör olarak fonksiyon göstererek bu maddelerin metabolizma ve atılımından sorumlu proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Wada ve diğ. 2009). Dolayısıyla CAR (ve PXR) ilaçlar gibi yabancı maddelerin detoksifikasyonunda önemlidir. Çalışma kapsamında CAR geni için kanser hücrelerinde özütlerin uygulaması sonucunda mRNA ekspresyon düzeyinde 5,50 kata kadar anlamlı bir artış saptanmıştır. Benzer şekilde RXR ve PXR genleri içinde bazı hücrelerde özüt uygulaması sonucunda anlamlı artışlar gözlenmiştir. Şu bir gerçektir ki CAR, PXR ve RXR, ilaçları metabolize eden enzimlerden olan CYP2B, CYP2C ve CYP3A gibi izozimlerim transkripsiyonel olarak regülasyonundan sorumlu nükleer reseptörlerdir. Karaciğerde ve ince bağırsakta en fazla bulunan izozim olduğundan ve çok çeşitli ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol aldığından dolayı, CYP3A4 önemli bir P450 izoformudur. Bu protein, antibiyotikler, yatıştırıcılar, kalsiyum kanal blokörleri, HMG KoA



redüktaz inhibitörleri AIDS ilaçları ve analjezikler gibi piyasadaki ilaçların %50'sinden fazlasını metabolize eder (Martin, 2003; Arayne, 2005; Van Herwaarden, 2005; Sica, 2006; Sugimoto, 2006; De Wildt, 2007; Klotz, 2007). CYP2C9 kanser ilaçları, antibiyotik gibi piyasadaki ilaçların %20'sinden fazlasını metabolize eden bir izozimdir (DeLisle ve ark., 2011). Bu reseptörlerin miktarının değişikliğin sitokrom P450'lerin ekspresyonlarının değişmesine yol açması muhtemeldir. Tüm bunlar elde ettiğimiz sonuçlarla ilişkilendirildiğinde *Urtica urens* özütleri uygulaması sonrasında CAR, RXR ve PXR genlerinin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde ki artıştan dolayı ilaç biyotransformasyonunda değişimlere ve klinik ilaç toksisitesine neden olabilirler. Bu yüzden doz ayarlaması yapılarak ilaç biyotransformasyonundaki negatif etkinin giderilmesi gerekmektedir. Diğer bir öneride özütlerin fraksiyonlanmasıdır. Bu çalışma kapsamında yaprak özütlerinde fraksiyonlama gerçekleştirilmiş ve AHR, CAR; PXR ve RXR mRNA seviyelerinde düzelmeler görülmüştür.

Isırgan otunun anti-karsinojenik etkileri ve diğer biyolojik aktiviteleri tüm genom transkriptom analizleri ile de teyit edildi. Özütlerin tümünde programlı hücre ölümünden sorumlu genlerin mRNA seviyelerinde değişiklikler olduğu saptanmıştır. İleri analizler sonucunda kanser yolağında birçok genin ekspresyonlarında değişimler tüm genom çalışmaları ile ortaya konulmuştur (Şekil 4.1). Bu sonuçlar gerçek zamanlı PCR ve western blot çalışmalarını destekler niteliktedir. Ayrıca bu üç hücre hattında tohum ve yapraklardan elde edilen özütler insulin salınımı, protein kinaz yolları, gametogenesis, glutathione metabolizması, metal taşınımı ve metabolizması, kalsiyum iyon metabolizması, hücre migrasyonu, protein katabolizması, anjiogenez, karbonhidrat, yağ, streol ve kolesterol metabolizması, vitamin A ve Karetonoid metabolizması, hücre döngüsü, kan pıhtılaşması, enerji metabolizması, glikoz taşınması, nükleotid metabolizması, kemik minerilizasyonu, glikoz ve glikojen metabolizması, DNA hasar tamir yolağı gibi değişik yolları değiştirdiği saptanmıştır. Başka bir deyişle, özütler anti-karsinojenik aktivitenin yanında anti-lipidemik, anti-diyabetik vb değişik biyolojik aktivitelere sahip olması olasıdır. Bunların hayvan ve hücre kültürü deneyleri ile ileri derecede test edilmesi gerekmektedir.



Şekil 4. 1. Tohum kloroform özütünün kanser yolağında sebep olduğu değişimler

Özetle tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, *Urtica urens* özütünden elde edilen özütler A549, Caco2 ve LNCaP hücre hatları üzerindeki anti-kanser ktiviteye sebep olduğu değişik yaklaşımlar ile ortaya konulmuştur. Tüm genom transkriptom analizinden elde edilen farklı yollardaki anlamlı değişimler bu düşünceyi desteklemektedir. *Urtica urens* özütleri içindeki fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin bu kanseri üzerindeki etkileri hücre döngüsü kontrol genleri, apoptoz yolağı genleri, tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve proliferatif hücre içi sinyal yollarında görev alan genler aracılığıyla kapsamlı olarak incelenmiş olup ileride ısırgan otu ile yapılacak olan diğer farmakolojik ve toksikolojik çalışmalara ipuçları sağlayacaktır.



5. SONUÇ

Proje kapsamında yürütülen moleküler, transkripsiyonel ve saflaştırma çalışmaları, *Urtica urens* bitkisinden elde edilen özütlerin veya bitkinin kendisinin kemoterapi almayan kanser hastalarında kullanılabilecek potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu hastalığı için hem düşük maliyetli olması avantaj gibi gözükse de yan etkilerinin tam olarak bilinmemesi akıllarda soru işaretleri bırakabilir.

Benzer olarak, proje kapsamında *bitkiden izole edilen* ve yapıları tayin edilen rutin, urasil, 4-hidroksibenzoik asit, daucosterin, stigmasterol, hekzadekanoik asit metil ester bileşikleri ile bitkinin içerisinde bulunduğu değişik analitik çalışmalarla ilk defa ortaya konulan bileşikler kanser için alternatif terapötik ajanlar olabileceği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak proje kapsamında bitki için ilk kayıt olan. 6 adet bileşik izole edilmiştir.

Yapılan bu çalışma ile küçük ısırgan otunun yaprak ve tohumlarından üretilen değişik polaritede özütlerinin apoptoz yolağını, hücre döngüsü ve tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonlarını değiştirdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, ilaçlar ve karsinojenler gibi birçok ksenobiyotiğin metabolizmasında rol alan P450 izozimlerinden CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP3A4 regülasyonlarına olan etkisi nükleer reseptörlerin seviyesine bakılarak belirlenmiştir. Bu özütlerin kanser oluşumunu ve gelişimini birçok noktadan engelleyerek anti-karsinojenik etki gösterdiği saptanmıştır. Fakat AHR, CAR, PXR ve RXR reseptörlerinin ekspresyonunu değiştirerek CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP3A4 gibi proteinlerin seviyelerinin değiştirme potansiyeli olması bu bitkinin kullanımının düzenlenmesi önem arz etmektedir. Bu sayede bitkinin insanlarda sebep olabileceği organ toksisitesi, mutajenite ve karsinojenite, ilaç metabolizmasında bozukluklar ve klinik ilaç toksisitesi engellenebilir.

Sonuç olarak, proje önerisinde başta öngörülen hedeflere tam manasıyla ulaşıldı ve çalışmalara devam edilecektir.



6. KAYNAKLAR

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

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

Adamson, R. H., Thorgeirsson, U. P., Sugimura, T., "Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans." *Arch Toxicol Suppl* 18: 303-318 (1996).

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

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

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

Aggarwal, B.B., Shishodia S., "Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer" *Biochem Pharmacol.* 14;71(10):1397-42 (2006).

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

Ajoku, G.A., Okwute, S.K., Okogun, J.I. "Isolation of Hexadecanoic Acid Methyl Ester and 1,1,2-Ethanedicarboxylic Acid-1-Hydroxy-1,1-Dimethyl Ester from the Calyx of Green Hibiscus Sabdariffa" (Linn.). *NatProdChemRes* 3:169. doi:10.4172/2329-6836.1000169 (2015).

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Conney, A. H., “Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450.” *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43: 1-30 (2003).

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

Fearnhead, H.O., "Getting back on track, or what to do when apoptosis is de-railed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery", *Cancer Biol Ther.*, 3, 21-28, (2004).

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

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques M.P.M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.* 2006;26:747–766. [PubMed]

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

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

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

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

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

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

Gross, A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999, 13: 1899-1911

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



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

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

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

Guevara, A.P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H., Nishino, H.,” An anti- tumor promoter from *Moringaoleifera*”, *Lam. Mutat Res.*, 440(2), 181-188. (1999)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

Hümmerich, J., Zohm, C., Pfau, W., “Modulation of cytochrome P450 1A1 by foodderived heterocyclic aromatic amines.” *Toxicology*; 199: 231-240 (2004).

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

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

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

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

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

Kang, S., Park, S.Y., Lee, H.J., Yoo, Y.H. TRAIL upregulates decoy receptor 1 and mediates resistance to apoptosis in insulin-secreting INS-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) Jun 4;396(3):731-5. Epub 2010 May 6.

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

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

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

Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W.D., , "Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury", *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 422-29, (2001).



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

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

Kim, D., Guengerich, F.P., "Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 27-49.

Kyhse-Anderson, J. (1984) Electroblothing of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank For Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10: 203-209.

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

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

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

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

Kuang, X., Du, J.R., Chen, Y.S., Wang, J., Wang, Y.N., "Protective effect of Z-ligustilide against amyloid beta-induced neurotoxicity is associated with decreased pro-inflammatory markers in rat brains." *Pharmacol Biochem Behav.* Jun;92(4):635-41 (2009).

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-684.

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

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

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



Ma, Q., Lu, A.Y., "CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies" *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1009-1016.

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

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

Marrassini, C., Acevedo C., Mino J., Ferraro G., Gorzalczy S., " Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. *Phytotherapy Research* 24(12):1807-12 (2010).

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

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

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

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

McLemore, T. L., Adelberg, S., Liu, M. C., McMahon, N. A., Yu, S. J., Hubbard, W. C., Czerwinski, M., Wood, T. G., Storeng, R., Lubet, R. A., et al. "Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas." *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1333-1339 (1990).

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

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

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

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



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

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

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

O'Brien, M. A., Kirby, R., "Apoptosis: a review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease", *J Vet Emerg Crit Car*, 18, 572–85, (2008).

Osheroff, N., "DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy", IGP, Autumn, (2003)

Oyagbemi, A.A., Saba, A.B., Azeez, O.I., Molecular targets of [6]-gingerol: Its potential roles in cancer chemoprevention. *Biofactors.* 2010 May-Jun;36(3):169-78.

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

Perk, A. A., Shatynska-Mytsyk, I., Gerçek, Y. C., Boztaş, K., Yazgan, M., Fayyaz, S. And Farooqi A. A., "Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells" *Cancer Cell Int.* 2014; 14: 124. doi: 10.1186/s12935-014-0124-6 (2014).

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

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

Pındur, U., ve Lemster, T., "Anti-tumour drug design: DNA binding ligands, which inhibit the topoisomerase I", *Review, Pharmazie*, 53 (2), 79-86, (1998).

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. and Marchand, C., "DNA topoisomerases and their poisoning by anti-cancer and anti-bacterial drugs", *Chemistry & biology*, 17 (5), 421-433, (2010).

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Seidel, C., Schnekenburger, M., Mazumder, A., Teiten, M.H., Kirsch, G., Dicato, M., Diederich, M., "4-Hydroxybenzoic acid derivatives as HDAC6-specific inhibitors modulating microtubular structure and HSP90 α chaperone activity against prostate cancer." *Biochem Pharmacol.* 2016 Jan 1;99:31-52. doi: 10.1016/j.bcp.2015.11.005. Epub 2015 Nov 5.

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

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



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

Shin, E.M., Kim S., Merfort I., Kim Y.S. Glycyrol Induces Apoptosis in Human Jurkat T Cell Lymphocytes via the Fas-FasL/Caspase-8 Pathway. *Planta Med.* (2010 Aug 17).

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

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

Smith, T. J., Guo, Z., Guengerich, F. P., Yang, C. S. (1996). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*. 17: 809-813.

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

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

Sudha, T., Chidambarampillai, S. and Mohan, V.R. “ GC-MS Analysis of Bioactive Components of Aerialparts of *FluggealeucopyrusWilld.* (Euphorbiaceae)” *Journal of AppliedPharmaceuticalScience* Vol. 3 (05), pp. 126-130, May, 2013 Availableonline at <http://www.japsonline.com> DOI: 10.7324/JAPS.2013.3524 ISSN 2231-3354 ShortCommunication

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

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

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

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

Tirtha, G., Tapan K. M., Jagadish, S. “Evaluation of anti-tumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites



Carcinoma in mice” Research Article *Oriental Pharmacy & Experimental Medicine* March 2011, Volume 11, Issue 1, pp 41-49

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

Tovey, P.C., and Baldo, B.A. (1987) Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes. *Electrophoresis.*, 8:384-387

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

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

Uzun, E., Sariyar, G., Adersen, A., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoglu, E., Pirildar, S., “Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and anti-microbial activities of selected species”, *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 287-296, (2004).

Van Herwaarden, A.E., Smit, J.W., Sparidans, R.W., Wagenaar, E., van der Kruijssen, C.M., Schellens, J.H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H., “ Midazolam and cyclosporin a metabolism in transgenic mice with liver-specific expression of human CYP3A4.” *Drug Metab Dispos.* 2005 Jul;33(7):892-5. Epub (2005 Apr 21). PMID:15845749

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

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

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

Wang, W.J., Sun, A.N., Guo F. Noncanonical NF-kappaB pathway and hematological malignancies. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* (2010) Jul;18(4):1069-73.

Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R. “ Invitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*,” *Cancer Chemother Pharmacol*, 59, 589-601.(2007)

Wang, C.Z., Zhang, Z., Anderson, S., Yuan, C.S., “ Natural products and chemotherapeutic agents on cancer: prevention vs. treatment.” *Am J Chin Med.* 42(6):1555-8. doi: 10.1142/S0192415X1420002X (2014).



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

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

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

Wong, R.S., "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment", *J Exp Clin Cancer Res*, 30-87, (2011).

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

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

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

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

Zhang, T., Mi Z., Schor NF. "Role of tyrosine phosphorylation in the anti-oxidant effects of the p75 neurotrophin receptor" *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Sep-Oct;2(4):238-46.

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

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

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

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ŞEVKİ ARSLAN
Proje No:	111T515
Proje Başlığı:	Küçük İsrırgan Otunun (<i>Urtica urens</i> 'in) Potansiyel Antikarsinojenik Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Aydınlatılması
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	HASALETTİN DELİGÖZ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. FEN-EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2011 - 01/02/2016
Onaylanan Bütçe:	276652.0
Harcanan Bütçe:	245137.54
Öz:	<p>Kanser, organizmaya ait hücrelerin çeşitli nedenlerden dolayı kontrolsüz şekilde çoğalmaları ile karakterize edilen bir hastalıktır. Genetik, kimyasal ve çevresel koşullar en önemli sebeplerindendir. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Dünyada ve de Türkiye de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif ve tamamlayıcı tedavileri de sıklıkla kullanmaktadırlar. Bunun sonucunda, günümüzde çoğunluğu bitkisel preparatlar olan alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artarak hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, fitokimyasal bileşenleri bilinmeyen ve ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılan <i>Urtica urens</i> (küçük ısırgan otu) bitkisinin fitokimyasal bileşenleri tanımlanarak anti-karsinojenik etki mekanizmaları moleküler düzeyde saptamaktır. Bu kapsamda, projede öncelikle <i>Urtica urens</i> bitkisinden elde edilen özütler çeşitli ekstraksiyon ve kromatografi teknikleri uygulanarak alt fraksiyonlar ve saf bileşikler elde edildi. Bu özütlerin GC/MS ve LC/MS analizleri hekzan özütlerinin doymamış yağ asidi bakımından ve kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin ise fenolik bileşiklerce zengin olduğunu göstermiştir. Proje kapsamında bitkiden izole edilen ve yapıları tayin edilen rutin, urasil, 4-hidroksibenzoik asit, daucosterin, stigmasterol, heksadekanoid asit metil ester bileşikler bitkide ilk defa saptanan bileşiklerdir. İçerdiği fenolik bileşikler ve mRNA analizleri bitkinin yüksek anti-oksidant özelliği olduğunu göstermiştir. <i>Urtica urens</i>'ten elde edilen özütlerin insan kanser hücrelerine (LnCap, A549 ve Caco-2) üzerlerine sitotoksik etkileri bu çalışmada incelenmiş olup elde edilen sonuçlara göre etkin doz değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlar özütlerin yüksek sitotoksik ve anti-karsinojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir. Ardından birçok farklı hücresel yolakla ilişkili 35 genin mRNA ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimler belirlenmiş ve içerdiği dolayı özütlerin apoptozu ve tümör baskılayıcı genleri indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca tüm genom transkriptom analizi sonucunda bu değişimler teyit edilmiştir. Tüm bunların yanı sıra, yaprak ve tohumlarda elde edilen özütlerin topoizomera I ve II aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, ilaç metabolize edici enzimlerin transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu nükleer reseptörlerin mRNA seviyeleri etil asetat uygulaması sonucunda anlamlı bir şekilde değiştirmiştir. Tüm bu sonuçlar, bu bitkinin değişik hücresel yolları değiştirerek antikarsinojenik ve sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, diğer ilaçların metabolizmasında değişikliklere yol açabileceği yine bu çalışma ile saptanmıştır. Bu çalışma ısırgan otu ile yapılacak olan diğer farmakolojik ve toksikolojik çalışmalara ipuçları sağlayacaktır. Sonuç olarak, proje ile önerilen hedefler başarı ile gerçekleştirildi ve patent dahil yeni araştırmalara temel oluşturacak çıktılar üretildi.</p>
Anahtar Kelimeler:	küçük ısırgan, <i>Urtica urens</i> , antikarsinojen, apoptotik, antioksidan, moleküler mekanizma
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Küçük İsrırgan Otunun (<i>Urtica urens</i> 'in) Artan Polarite Özütlerinin Antikarsinojenik Etkisinin İncelenmesi (Bildiri)