



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE NOBİLETİN
FLAVANOİDİNİN TLR4 VE TLR9 RESEPTÖRLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ASUMAN DEVECİ ÖZKAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2018



**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE NOBİLETİN FLAVANOİDİNİN
TLR4 VE TLR9 RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Asuman DEVECİ ÖZKAN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

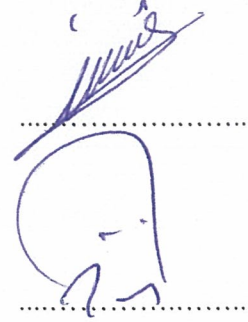
HAZİRAN 2018

Asuman DEVECİ ÖZKAN tarafından hazırlanan “Prostat Kanseri Hücrelerinde Nobiletin Flavanoidinin TLR4 ve TLR9 Reseptörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Gazi Üniversitesi

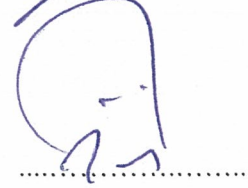
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



İkinci Danışman: Prof. Dr. Süleyman KALELİ

Tıbbi Biyoloji, Sakarya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan: Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Gazi Üniversitesi

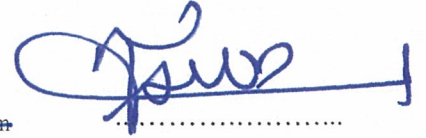
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Taner AKAR

Adli Tıp, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Akın YILMAZ

Tıbbi Biyoloji, Hitit Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Ebru ALP

Tıbbi Biyoloji, Giresun Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 08/06/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Asuman DEVECİ ÖZKAN

08/06/2018

PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE NOBİLETİN FLAVANOİDİNİN TLR4 VE TLR9 RESEPTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Asuman DEVECİ ÖZKAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2018

ÖZET

Toll-benzeri reseptörler (TLR) epitelyal, immün ve kanser hücrelerinde ifade edilen ve iyi bilinen bir patern tanıma reseptörü ailesidir. Nobiletin (NOB), kanser karşıtı özelliklere sahip ve prostat kanseri riskini azalttığı bildirilen bir O-metillenmiş flavonoiddir. Bu çalışmada NOB'un etkileri TLR4 ve TLR9 üzerinde PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerinde araştırılmıştır. Lipopolisakkarit (LPS) ve CpG-oligodeoksinükleotid (CpG-ODN) sırasıyla TLR4 ve TLR9 uyarımı için kullanılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 ile analiz edilmiştir. NOB'un inhibe edici konsantrasyonu (IC₅₀) LNCaP için 20 µM, PC-3 ve HUVEC için 40 µM olarak bulunmuştur (p<0,05). TLR4 ve TLR9 genlerinin ifade düzeyi Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile analiz edilmiştir. NOB'un TLR4 ve TLR9 genlerinin ifade edilmesini azalttığı PC-3 hücrelerinde gözlenmiştir (p<0,05). Sitokinler (IFN-α ve IFN-β) enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile analiz edilmiştir. NOB'un IFN-α ve IFN-β miktarını LNCaP hücrelerinde azalttığı bulunmuştur (p<0,05). TLR4 ve TLR9 sinyal yollarını NOB'un özellikle LNCaP hücrelerinde baskıladığı gözlenmiştir (p<0,05). Jelatinaz aktivitesi ve protein miktarı sırasıyla zimografi ve western blot ile analiz edilmiştir. MMP-2 ve MMP-9 jelatinaz aktivitesi PC-3 ve LNCaP için düşük bulunmuştur. MMP-2 aktivitesi HUVEC için yüksek bulunmasına rağmen, MMP-9 aktivitesi gözlenmemiştir (p<0,05). Aynı zamanda NOB'un LNCaP hücrelerine TLR4 ve IRF3 protein miktarını azalttığı bulunmuştur (p<0,05). Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, NOB'un anti-tümöral ve anti-metastatik etkisinin varlığı hem TLR4 hem TLR9 sinyal iletim yolu için gösterilmiştir. Araştırmamız NOB'un insanlarda prostat kanserinde immunoteropatik tedavi için iyi bir aday olduğunu ve prostat kanseri hücre canlılığını ve metastazını baskılamada etkili bir aday molekül olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu	: 1055.1
Anahtar Kelimeler	: Prostat Kanseri, TLR4, TLR9, Flavonoid, Nobiletin
Sayfa Adedi	: 102
Danışman	: Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN
İkinci Danışman	: Prof. Dr. Süleyman KALELİ

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FLAVONOID NOBILETIN ON TLR4 AND TLR9 RECEPTORS IN PROSTATE CANCER CELLS

(Ph. D. Thesis)

Asuman DEVECI OZKAN

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are a well-known family of pattern recognition receptors that expressed in epithelial, immune and cancer cells. Nobiletin (NOB) is an O-methylated flavonoid that possesses anti-cancer properties and has been reported to reduce the risk of prostate cancer. In this study we investigated the effects of NOB on TLR4 and TLR9 in LNCaP, PC-3 and HUVEC cells. Lipopolysaccharide (LPS) and CpG-ODN (CpG-oligodinökleotid) were used for TLR4 and TLR9 stimulation, respectively. Cell viability was analyzed with WST-1 assay. Inhibitory concentrations (IC₅₀) of NOB were found 20 µM for LNCaP and 40 µM for PC-3 and HUVEC (p<0,05). TLR4 and TLR9 gene expression was examined by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). It was observed that NOB decreased TLR4 and TLR9 gene expression in PC-3 (p<0,05). Cytokines (IFN-α and IFN-β) were analyzed with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). It was found that NOB reduced the amount of IFN-α and IFN-β in LNCaP (p<0,05). Gelatinase activity and protein level were examined by zymography and western blotting, respectively. Gelatinase activity of MMP-9 and MMP-2 was found low in PC-3 and LNCaP, although there was high MMP-2 activity in HUVEC, MMP-9 activity was not observed (p<0,05). Also it was found that NOB reduced TLR4 and IRF3 protein levels in LNCaP (p<0,05). When all the results are evaluated together, the presence of anti-tumoral and anti-metastatic effect of NOB has been shown for both TLR4 and TLR9 signaling pathway. Our study showed that NOB is a good candidate for immunotherapeutic treatment in human prostate cancer and it may be an effective candidate molecule for suppressing prostate cancer cell viability and metastasis.

Science Code	: 1055.1
Key words	: Prostate Cancer, TLR4, TLR9, Flavonoid, Nobiletin
Page Number	: 102
Supervisor	: Assoc. Prof. Dr. Hacer İlke ÖNEN
Co-Supervisor	: Prof. Dr. Süleyman KALELİ

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda sonsuz yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen çok kıymetli emekli hocam Sayın Prof. Dr. Emine Sevdâ MENEVŞE'ye, tezimin birçok aşamasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım hiçbir zaman desteğini ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN ve ikinci danışmanım Sakarya Üniversitesi'nden Sayın Prof. Dr. Süleyman KALELİ'ye teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca bilgi ve desteğiyle yanımda olan Sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ, Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM ve Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a ve her zaman destekleriyle yanımda olan kıymetli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Gülşah ALBAYRAK, Arş. Gör. Selen GÜÇLÜ DURGUN, Arş. Gör. Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ, Arş. Gör. Dr. Çiğdem DÖNMEZ ve Arş. Gör. İlker KILIÇCIOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deneysel yardımlarını esirgemeyen ve bana destek olan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Sayın Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ, Sayın Prof. Dr. Murat KASAP, Sayın Doç. Dr. Gürler AKPINAR, Arş. Gör. Mehmet SARIHAN ve DEKART çalışma grubundan Mehin ZÜLFİGAROVA ve diğer çalışma arkadaşlarıma, Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Özlem AKSOY'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelebilmemde maddi manevi her türlü desteği veren, her zaman yanımda olan kıymetli anneme, babama ve kardeşlerime, hayatımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim desteğini bir an bile eksik etmeyen canım eşim Resul ÖZKAN'a ve oğlum Selim Deniz ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Finansal olarak bu tezin tamamlanmasında 1002-Hızlı Destek Programı aracılığıyla "116S102" numaralı proje desteği için ve doktora eğitimim boyunca 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı ile aldığım burs desteği için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji ve risk faktörleri	4
2.1.2 Androjen ve androjen reseptörü (AR).....	5
2.2. Flavonoidler ve Nobiletin	8
2.2.1. Flavonoidler	8
2.2.2. Flavonoidlerin anti-karsinogenik etkileri.....	8
2.2.3. Nobiletin	8
2.3. Toll Benzeri Reseptörler (TLR).....	9
2.3.1. TLR'lerin yapısal özellikleri.....	9
2.3.2. TLR sinyal yolağı	11
2.3.3. TLR'ler ve prostat kanseri ilişkisi.....	13
2.4. Prostat Kanserinde İnflamasyonun Rolü	15
2.4.1. Sitokinler.....	15
2.4.2. İnflamasyon ve prostat kanseri ilişkisi.....	16
2.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	17

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereçler.....	19
3.1.1. Kullanılan cihazlar	19
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	19
3.1.3. Kullanılan kitler	21
3.1.4. Kullanılan solüsyonların hazırlanması.....	21
3.2. Yöntemler	23
3.2.1. Hücre kültürü	23
3.2.2. WST-1 hücre canlılık testi	24
3.2.3. Ligand ve/veya NOB'un hücrelere uygulanması	25
3.2.4. Hücrelerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	26
3.2.5. qPCR	28
3.2.6. IFN- α ve IFN- β analizi	29
3.2.7. Total protein izolasyonu ve miktar tayini	30
3.2.8. SDS-PAGE ve western blotlama	30
3.2.9. Jelatin zimografi.....	33
3.2.10. İstatistiksel analizler.....	34
4. BULGULAR	37
4.1. WST-1 Hücre Canlılık Analizi Bulguları	37
4.2. qPCR Analizi Bulguları	38
4.3. Sitokin Analizi Bulguları	44
4.4. Western Blotlama Analizi Bulguları	57
4.5. Jelatin Zimografi Bulguları.....	69
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR	91

ÖZGEÇMİŞ	101
----------------	-----



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Farklı kanser türlerinde ifade edilen TLR'ler	15
Çizelge 3.1. TLR4 reseptör uyarımı için LPS uygulama kombinasyonları	25
Çizelge 3.2. TLR9 reseptör uyarımı için CpG-ODN uygulama kombinasyonları	26
Çizelge 3.3. qPCR deneylerinde kullanılan gene özgül primer çiftleri	29
Çizelge 3.4. SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları	31
Çizelge 3.5. Western blotlama analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorların listesi	33
Çizelge 3.6. Jelatin zimografi jel içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları	34

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Dünya genelinde prostat kanseri insidansı ve ölüm oranı	5
Şekil 2.2. Androjen reseptörü (AR)'nın, kansere bağlı bazı genlerin aktivitesini düzenleme mekanizması.....	6
Şekil 2.3. Androjen bağımlı ve androjenden bağımsız sinyal iletim yolları	7
Şekil 2.4. Nobiletin molekülünün kimyasal yapısı	9
Şekil 2.5. TLR'nin şematize modeli	11
Şekil 2.6. Toll-benzeri reseptörler ve TLR-aracılı sinyal yolağı	13
Şekil 2.7. Toll-benzeri reseptörler ve prostat kanseri arasındaki ilişki.....	14
Şekil 4.1. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücrelerine NOB'un ve ligandların hücre canlılığı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.2. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının kantitatif TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi	39
Şekil 4.3. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının kantitatif TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi	40
Şekil 4.4. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının kantitatif TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi	41
Şekil 4.5. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının kantitatif TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi	42
Şekil 4.6. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının Kantitatif TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.7. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının kantitatif TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi	44
Şekil 4.8. IFN- α miktarı hesaplanan standart eğri grafiğı.....	45
Şekil 4.9. IFN- β miktarı hesaplanan standart eğri grafiğı.....	45
Şekil 4.10. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.11. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi.....	47

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.13. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.14. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi.....	50
Şekil 4.15. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.16. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.17. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.18. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.19. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.20. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.21. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya CpG-ODN uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.22. PC-3 hücre hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif TLR4 protein miktarı ve western blot görüntüleri.....	58
Şekil 4.23. PC-3 hücre hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif IRF3 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	59
Şekil 4.24. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif TLR4 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri	60
Şekil 4.25. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif IRF3 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	61
Şekil 4.26. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif TLR4 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri	62
Şekil 4.27. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif IRF3 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	63

Şekil	Sayfa
Şekil 4.28. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif TLR9 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri	64
Şekil 4.29. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif IRF7 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	65
Şekil 4.30. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif TLR9 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri	66
Şekil 4.31. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif IRF7 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	67
Şekil 4.32. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif TLR9 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri	68
Şekil 4.33. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif IRF7 protein düzeyleri ve western blot görüntüleri	69
Şekil 4.34. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri ve zimografi jel görüntüleri	70
Şekil 4.35. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri ve zimografi jel görüntüleri	72
Şekil 4.36. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi ve zimografi jel görüntüsü	74
Şekil 4.37. PC-3 hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri ve zimografi jel görüntüleri	75
Şekil 4.38. LNCaP hücrelerine NOB ve/veya ODN uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri ve zimografi jel görüntüleri	77
Şekil 4.39. HUVEC hücrelerine NOB ve/veya LPS uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi ve zimografi jel görüntüsü	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
CO₂	Karbondioksit
mM	Milimolar
mL	Mililitre
mg	Miligram
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
ng	Nanogram
μl	Mikrolitre
mM	Milimolar
M	Molar
V	Volt
kDa	Kilodalton
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
H₂O	Dihidrojenoksit
HCl	Hidrojen klorür
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
s	Saniye
dk	Dakika

Kısaltmalar	Açıklama
NOB	Nobiletin
TLR	Toll-benzeri reseptör
PRR	Patern tanıyan reseptör

Kısaltmalar**Açıklama**

PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler yapılar
HUVEC	İnsan umbilikal ven endotel hücre hattı
dsRNA	Çift zincirli RNA
dNTP	Deoksinükleozidtrifosfat
poly I:C	Polinozinic: polycytidylic asit
LPS	Lipopolisakkarit
IRF3	İnterferon düzenleyici faktör 3
TIR	Toll interlökin reseptör
TICAM-1	TIR domain içeren adaptör molekül 1
MMP	Matriks metalloproteinaz
PKC	Protein kinaz C
IL	İnterlökin
TNF	Tümör nekroze edici faktör
IFN	İnterferon
PIN	Prostatitisten intraepitelyal neoplazi
DAMP	Hasar ilişkili moleküler yapı
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
CpG-ODN	CpG - oligodinükleotid
NF-κB	Nükleer faktör - kappa B
MAPK	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ECGM	Endotelyal hücre büyüme medium
IC	İnhibe edici konsantrasyon
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı İmmünosorbent assay
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
BSA	Sığır serum albümin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
APS	Amonyum persülfat
TBS-T	Tris - buffered saline-tween

Kısaltmalar**Açıklama****OD**

Optik yoğunluk

TEMED

Tetramethylethylenediamine

HRP

Horseradish peroksidaz

PSA

Prostat spesifik antijen

DHT

Dihidroksitestosteron

AR

Androjen reseptörü

NK

Doğal öldürücü

ECM

Ekstraselüler matriks

1. GİRİŞ

Prostat kanseri tedavi seçenekleri arasında cerrahi, hormon tedavisi, kemoterapi ve radyoterapi yer almaktadır, böylece hastaların hayatta kalma şansı artmaktadır. Ancak çoğu hasta ölümle sonuçlanan metastaz ve ataklara dayanmak zorunda kalmaktadır. Bu tedaviler kanser hücreleri gibi aynı zamanda normal hücreleri de tahrip etmektedir. Bu nedenle daha etkili ve daha az yan etkiye sahip yeni tedavilerin keşfine ihtiyaç vardır.

İmmünoterapinin kanser gelişiminin önlenmesi ve iyileştirilmesi için kullanılabilecek umut vadeden bir tedavi olabileceği düşünülmektedir. Kanser hücreleri çok çeşitli mekanizmalar yoluyla bağışıklık sistemi hücrelerinin saldırısından kaçabilmektedir. Uyarılmış bir immün sistem ve kronik inflamasyon kanser gelişim sıklığını arttırmaktadır. İnflamasyon kanserin yedinci ayırt edici özelliği olarak önerilmektedir. Kanserle mücadele için konakçının immün sistemini kullanan immünoterapi; özgüllüğü, daha az yan etkisinin bulunması ve daha az direnç oluşturması gibi bazı avantajlarıyla son zamanlarda yeni bir tedavi seçeneğidir. İmmünoterapi yönteminde; kanser hücrelerine saldırmak için immün sistemi uyarma ya da kanserde immün sistemin inhibitörlerinin uzaklaştırılması hedeflenmektedir.

İmmün sistemi düzenlemek için potansiyel bir yaklaşım olarak; aralarında çok iyi çalışılmış olan toll benzeri reseptör (TLR)'leri de içeren doğal bağışıklık sistemindeki patern tanıyan reseptör (PRR)'leri hedeflemek önerilmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar; tümör hücrelerinde TLR'lerin aşırı ifade edildiklerini ve işlevsel olarak görev aldıklarını göstermiştir. Tümör hücrelerinde aşırı ifade edilen TLR'lerin gerek tümör hücre çoğalmasına gerekse apoptoza direnci arttırdığı gösterilmiştir. TLR'ler aynı zamanda tümör metastazını da arttıırırlar. Bu nedenle, TLR'ler kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak görölmektedirler. Ayrıca, immün yanıtı arttırabilmesi ama daha az yan etkisinin olması TLR'leri kanser tedavisi için iyi bir hedef yapmaktadır.

TLR'ler tümör gelişiminde iki zıt görev üstlenmektedirler. Bunlar: 1. Tümör büyümesini ve epitel hücrelerin malign dönüşümünü tetikler. 2. Apoptozu indükleyip tümör gelişimini baskılar. Bu durum TLR'lerin aktivasyonu ve tümör mikroçevresiyle tetiklenen karmaşık sinyal yollarına bağlı olmaktadır. Bu nedenle TLR'lerin aktive olması tümör gelişiminde “iki ucu keskin kılıç” şeklinde ifade edilmektedir. Bu özellikleri göz önüne alındığında,

TLR'ler üzerine immünoterapötik bir molekül olma potansiyeli olan moleküllerin etkinliğinin araştırılması önem kazanmaktadır.

Nobiletin (NOB), antikanser, antiviral ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olan turunçgillerden elde edilen bir polimetoksi flavanoiddir. Son zamanlardaki araştırmalarda NOB'un bir hücre farklılaşması modülatörü olduğu gösterilmiştir. Hücre farklılaşması anjiyogenezde çok önemli bir adımdır ve bu yüzden de NOB'un tümör büyümesi ve metastazı etkileyebilme potansiyeli bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı; prostat kanserinde inflamasyonun rolünü değerlendirmek ve kemoterapötik bir ajan olarak NOB'un kullanım potansiyelini belirlemek üzere; TLR4 ve TLR9'un ifadelenmesi, reseptör proteinlerin miktarı, başlattıkları sinyal yolağındaki bazı proteinlerdeki değişimler, sinyal yolağının sonunda yapımı gerçekleşen pro-inflamatuvar sitokinlerin miktarı ve ayrıca tümör invazyonundaki rolü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için matriks metalloproteinazların miktarındaki değişimler prostat kanseri hücreleri olan LNCaP, PC-3 ve kontrol hücreleri olan HUVEC hücrelerinde incelemektir.

NOB'un prostat kanseri riskini azalttığı rapor edilmiş, ancak mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu tez çalışmasının bir diğer amacı; NOB'un TLR9 aracılı sinyal üzerindeki etkinliğini araştırmak ve prostat kanserinde önemli rol oynayan metastaz için bir tedavi geliştirme potansiyeli üzerinde durmaktır.

Bu amaç ile tez çalışmasında hem prostat kanserinde TLR4 ve TLR9 reseptörlerinin rolleri, hem de bu rol üzerinde tedaviye yönelik olarak immünoterapötik bir molekül olma potansiyeline sahip NOB'un etkinliği değerlendirilmiştir. Sonrasında tedavi yaklaşımları konusunda laboratuvar düzeyinde edinilen verilerin daha ileri çalışmaları desteklemesi beklenmektedir. Elde edilen bulgular ile mevcut durumdaki tedavi stratejilerine ek olarak TLR4 ve TLR9 aracılı başlayan immün yanıt için NOB'un yeni tedavi molekülü olarak belirlenme potansiyeli ilk defa değerlendirilmiş ve kanserde immünoterapinin etkinliği ile ilgili veriler elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

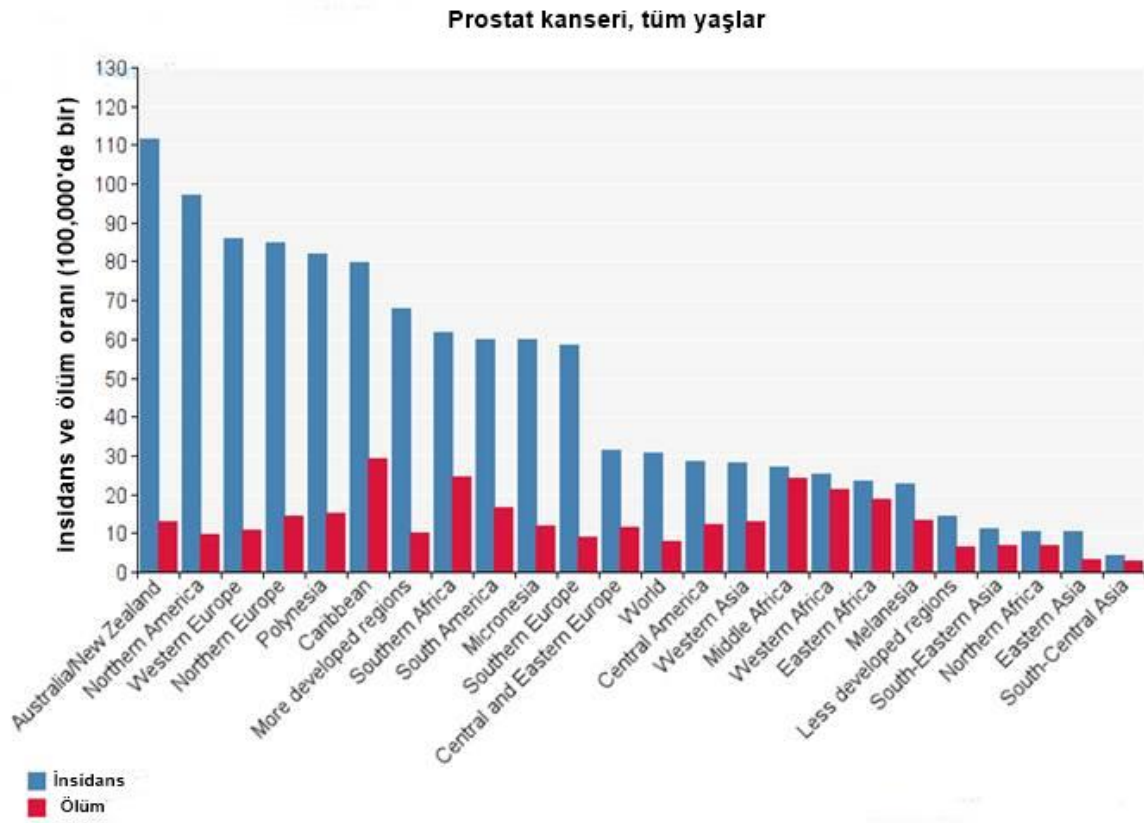
Prostat bezi rektumun ön tarafında, idrar kesesinin altında bulunan ve sadece erkeklerde olan bir bezdir. Prostatın büyüklüğü yaşa göre değişiklik göstermektedir. Gençlerde ceviz büyüklüğünde olurken, yaşlılarda daha büyük boyutlarda rastlanabilmektedir. Prostatın görevi, semeni daha akışkan hale getiren ve sperm hücrelerini koruyup besleyen prostat sıvısını üretmektir (Humphrey, 2014). Erkeklerde, prostat bezinde yaşla beraber iyi huylu veya kötü huylu patolojik durumlar meydana gelebilmektedir. İyi huylu prostat hiperplazisi (BPH), yaşlı erkeklerde sıklıkla saptanan ve tedavi edilebilen bir patolojik durumdur. Bu durum prostatın büyümesi olarak tanımlanmaktadır. Prostat bezinde gelişen malign patolojik durum ise prostat adenokarsinomudur (Thorpe ve Neal, 2003). İleri evredeki prostat kanseri hastalarında, boşaltım sisteminde zayıflık, sık idrara çıkma, böbrek tıkanıklığı, idrarda kan görülmesi ve ereksiyon olamama gibi belirtiler görülebilmektedir. Ancak iyi huylu prostat hiperplazisi gibi durumlarda da bu belirtiler görülebilmektedir (Humphrey, 2014).

Dijital rektal muayene, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve serumda prostat spesifik antijen (PSA) düzeylerinin belirlenmesi prostat kanserinin ilk tanısında kullanılan yöntemlerdir. Tanı aşamasında rektal muayene sonrası farklı bir kitle, dokuda sertleşme ya da asimetri gibi durumlara rastlanıldığı zaman TRUS, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi gibi diğer yöntemler tanıyı kolaylaştırmak için kullanılmaktadır (Rowan ve diğerleri, 2008). PSA, glikoprotein yapıda bir serin proteazdır. İnflamasyon, hiperplazi ya da neoplazi gibi durumlarda seminal sıvıda bulunan PSA, bariyeri geçerek dolaşıma karışmakta ve serumdaki düzeyi normalden yüksek olmaktadır. Belirtisi olmayan tümörler ile birlikte, invaziv prostat kanserinin tespiti için PSA değerinin ölçülmesi önemli bir aşamadır (Rowan ve diğerleri, 2008). Buna rağmen iyi huylu prostat hiperplazisi ya da prostat iltihabı gibi durumlarda da kanda PSA düzeyi artabilmektedir. Bu nedenle PSA testinin güvenilirliği tartışmalıdır (Prensner ve diğerleri, 2012).

2.1.1. Epidemiyoloji ve risk faktörleri

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin ikinci büyük nedenidir. Prostat kanseri riski ve yaşam tarzı arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar son 10 yıldır prostat kanseri olgu sayısının artmasından dolayı daha yaygın hale gelmektedir (Siegel ve diğerleri, 2018). Ancak çalışmalarda bu hastalığa neden olan özel bir karsinojen tanımlanamadığı için prostat kanseri etiyolojisi hala açık değildir (Bosland, 2000; Mohile ve Shelke, 2011). Araştırmalarda gelişmekte olan prostat kanseri olasılığı ile ilişkili; artan yaş, etnik köken ve pozitif aile hikâyesi gibi bazı risk faktörlerinin olduğu bildirilmiştir (Crawford, 2003). Ancak bazı araştırmalar da prostat kanserinin sadece genetik faktörlere bağlı olmadığını, aynı zamanda yaşam tarzı, beslenme ve çevresel faktörlerle de ilişkili olduğunu göstermektedir (Whittemore ve diğerleri, 1995; Crawford, 2003; Grönberg, 2003). Son bulgulara göre bütün kanserlerin %90-95'inde yaşam tarzının neden olduğu düşünülmektedir (Gupta ve diğerleri, 2010; Siegel ve diğerleri, 2018).

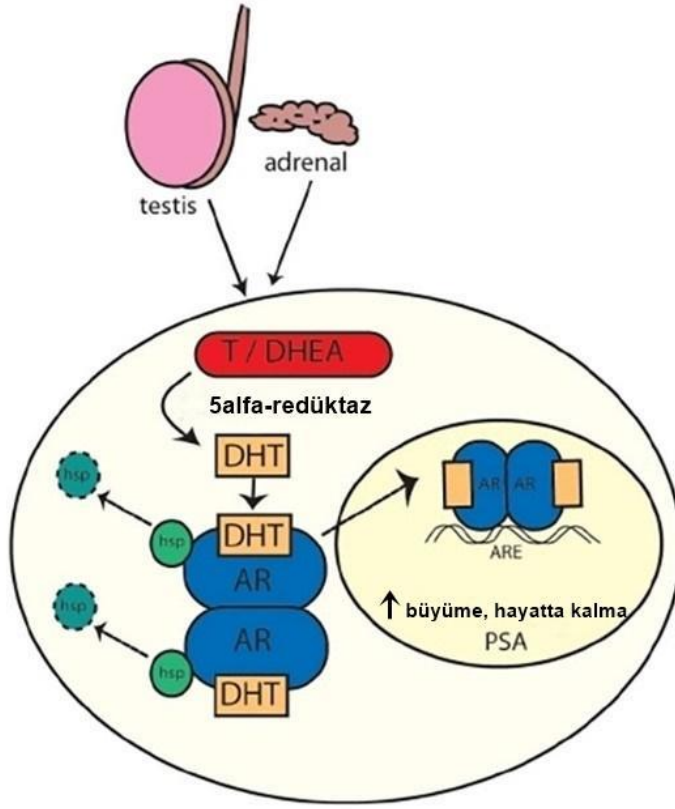
Yaşlanan toplumlarda PSA taraması kullanımının artmasıyla, son on yılda yüksek riskli ülkelerde prostat kanseri sıklığında belirgin bir artış kaydedilmiştir (Majeed ve Burgess, 1994; Potosky ve diğerleri, 1995; Chirpaz ve diğerleri, 2002). Prostat kanseri sıklığı ülkeler arasında değişiklik göstermekte olup; en yüksek sıklık Amerika ve Batı Avrupa'da, en düşük sıklık ise Asya ülkelerinde görülmektedir (Banerjee ve Kaviani, 2016) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Dünya genelinde prostat kanseri insidansı ve ölüm oranı (Banerjee ve Kaviani, 2016)

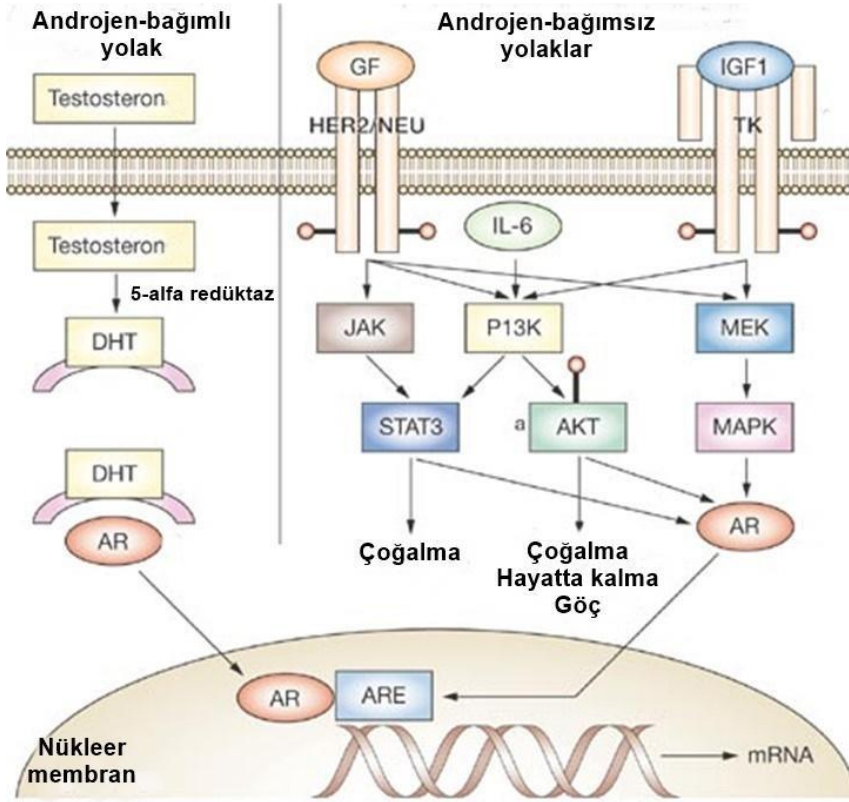
2.1.2. Androjen ve androjen reseptörü (AR)

Androjen adlı hormon, her iki cinsten de bulunmakla birlikte erkekler için prostat bezinin gelişimi, farklılaşması ve işlevini sürdürmesi için gerekli olan bir hormondur, üretimi hipotalamus ile düzenlenmektedir ve ikincil eşey özelliklerinin gelişimi ve devamının yanı sıra erkek genital sistemin gelişimini de testosteron hormonu sağlamaktadır (Taplin ve diğerleri, 2001). Androjen; testislerden testosteron sentezlendikten sonra hedef dokulara transfer edilir ve 5α -redüktaz enzimi ile daha aktif bir metabolit olan 5α -dihidrotestosteron (DHT) hormonuna dönüşmektedir (Heinlein ve Chang, 2004). Androjenler çok sayıda büyüme faktörü, apoptoz-ilişkili genler gibi birçok genin ifadesini düzenlemektedir (Young ve diğerleri, 1992; Fasciana ve diğerleri, 1996; Perry ve diğerleri, 1996) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Androjen reseptörü (AR)'nın, kansere bağlı bazı genlerin aktivitesini düzenleme mekanizması (İnternet, NIH, 2016)

Testosteron ve DHT androjen reseptörü (AR)'ye bağlanarak, AR'nin transkripsiyonel aktivitesini arttırmakta ve prostat bezi üzerinde etki göstermektedir (Gioeli, 2005). AR prostat kanserinin bütün süreçlerinde merkezi rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, büyüme faktör reseptörü, sitokin ve Wnt sinyal yolağı gibi iletim yolları ve bu yolların AR sinyal iletim yolu ile etkileşimlerinin özellikle prostat kanserinin ileri aşamalarında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Heinlein ve Chang, 2004; Kaarbø ve diğerleri, 2007) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Androjen bağımlı ve androjenden bağımsız sinyal iletim yolları (Lattouf ve diğerleri, 2006)

AR'den gelen sinyaller prostat gelişimini ve kanseri başlatmaktadır. Prostat kanseri tedavisinde AR'nin baskılanması ilk seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücre çoğalması ve apoptoz, prostat bezi hücrelerinde androjen hormonu ile dengelenmektedir. Ancak, hücre çoğalması arttığında denge bozulur ve prostat kanseri gelişirken, hızla büyüyen bu kanser hücreleri androjen hormonu ile apoptozdan kaçmaktadır (Isaacs ve diğerleri, 1994). Nükleer reseptör ailesine dahil bir transkripsiyon faktörü olan AR, testosteron veya DHT ile aktive olarak hücre çoğalması ve farklılaşmasında görevli çok sayıda genin ifade edilmesinde görev almaktadır (Vander ve diğerleri, 2010). AR, ligandı varken AR-şaperon yapısının şekli değişir ve AR ligandı ile bağlanarak sitoplazmadan çekirdeğe geçer, AR çekirdeğe geçince reseptör ligand kompleksi dimerize olarak hedef genin ifade edilmesini gerçekleştirir. (Gelman, 2002; McEwan, 2004).

2.2. Flavonoidler ve Nobiletin

2.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, meyvelerde, sebzelerde, çayda ve şarapta bulunan fitokimyasallardır. Flavonoidler *in vitro* şartlarda anti-karsinojenik karakter sergilemekte ve cinsiyet hormonlarının düzeyini değiştirerek, hücreleri oksidasyon ya da inflamasyondan koruyarak, anjiyojenezi ya da hücre çoğalmasını azaltarak ve apoptozu düzenleyerek kanser riskini azaltmaktadırlar (Gates ve diğerleri, 2009). Turunçgiller gibi flavonoidler bakımından zengin doğal besinler ile beslenmenin kanserin önlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Meiyanto ve diğerleri, 2012). Turunçgillerde bulunan tangeretin, nobiletin, hesperetin, hesperidin, naringenin ve naringin flavonoidleri kemoterapötik ajan olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Araştırmalar bu flavonoidlerin çeşitli mekanizmalar yoluyla bazı kanser hücrelerinin büyümesini engelleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Meiyanto ve diğerleri, 2012).

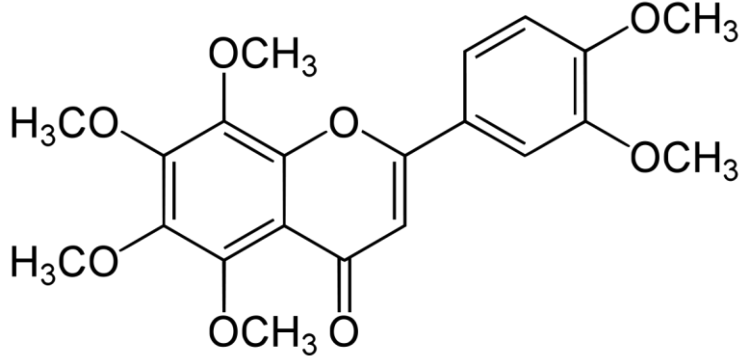
2.2.2. Flavonoidlerin anti-karsinojenik etkileri

Son zamanlarda beslenmenin kanser gelişiminde etkili olduğunun fark edilmesiyle bazı sebze ve meyvelerin kansere karşı koruyucu etkisinin olabileceği fikri öne çıkmaktadır. Besin maddelerinde bulunan antioksidan yapıların kansere karşı koruyucu etkiden sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Li ve diğerleri, 2018). Özellikle bitkilerde bulunan fenolik maddelerin antikarsinojenik veya antioksidan etki göstererek kansere karşı koruma sağladığını gösteren çalışmalar son yıllarda artmıştır. Örneğin yapılan çalışmada flavonoid yapıda olan kuersetinin polinükleer aromatik hidrokarbon olan benzo(a)piren (BP)'ye karşı anti-mutajenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Ruch ve diğerleri, 1989; Namiki ve diğerleri, 1990; Renaud ve De Lorgeril, 1992; Frankel ve diğerleri, 1993; Hertog ve diğerleri, 1993; Durak ve diğerleri, 2004).

2.2.3. Nobiletin

Yiyecek kaynaklarımızda 400'den fazla flavonoid bulunmaktadır (McCann ve diğerleri, 2003). NOB turunçgil kabuklarında bulunan $C_{21}H_{22}O_8$ kimyasal formülüne ve 402,39

g/mol moleküler ağırlığına sahip bir O-metillenmiş, hekzametoksiflavon ve polar olmayan özellik gösteren bir flavonoiddir (Bernini ve diğerleri, 2011) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nobiletin molekülünün kimyasal yapısı

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri araştırılmış ve olumlu etkilerinin sağlık alanında belirlenmesi ile flavonoidlere olan ilgi bir hayli artmaktadır (Xiao ve diğerleri, 2015; Surichana ve diğerleri, 2018). Yapılan çalışmalar NOB'un anti-inflamatuar etkiye ve tümör invazyonunu, çoğalmasını, metastazını engelleyici ve hücre farklılaşma düzenleyicisi etkilerine sahip olduğunu göstermektedir (Knekt ve diğerleri, 1997; Li ve diğerleri, 2006). Hücre farklılaşması anjiyojenezde çok önemli bir adımdır ve bu yüzden de tümör büyümesi ve metastazı etkileyebilmektedir (Kunimasa ve diğerleri, 2010). Araştırmalar aynı zamanda flavonoidlerce zengin gıdalarla beslenme tarzına sahip kişilerde flavonoidlerin bazı kanserlerin önemli bir başlangıç aşaması olan DNA hasarına karşı oksidatif stresi engelleyerek bu hasarı azalttığını göstermektedir. Ayrıca NOB molekülünün insan prostat kanser hücreleri ve melanom hücrelerine karşı etkili inhibitör olduğu gösterilmiştir (Kunimasa ve diğerleri, 2010; Xiao ve diğerleri, 2016). Bu bulgular NOB'un inflamasyon ilişkili tümör oluşumunda işlevsel olarak eşsiz ve muhtemel bir kemopreventif ajan olma önerisini desteklemektedir (Murakami ve diğerleri, 2000).

2.3. Toll Benzeri Reseptörler (TLR)

2.3.1. TLR'lerin yapısal özellikleri

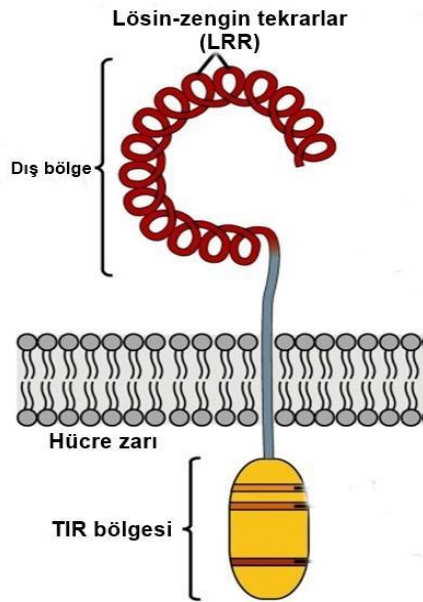
İlk kez *Drosophila* (sirke sineği) türünde, embriyonal gelişim basamaklarında rol aldığı bilinen bir reseptör olarak tanımlanan ve daha sonra mutant olan sineklerde fungal

infeksiyonlara yatkınlık olduğu fark edilerek, immün sistem cevabında önemli işlevi olduğu düşünülen reseptöre “toll” adı verilmiştir. İlk insan toll-benzeri reseptörü Nomura ve çalışma arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmış, Taguchi ve çalışma arkadaşları tarafından 1996 yılında kromozom üzerinde haritalanmıştır ve “toll-benzeri reseptör” (Toll-Like Receptor, TLR) olarak adlandırılmışlardır (Konat, 2008).

TLR'ler doğal bağışıklıkta anahtar rol oynayan bir transmembran reseptör ailesidir. TLR'ler doğal immün sistemde, patern tanıyan reseptörler (PRR) olarak görev yapan bir reseptör ailesidir. Bu reseptörler yüksek olarak korunmuş yapılar olan bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi patojen ile ilişkili moleküler yapıları (PAMP) tanıır ve bir dizi hücre içi sinyal basamağı yoluyla immün sistemi aktive ederler (Takeda ve diğerleri, 2003). Ayrıca farklı bozukluklar ve kanser gibi hastalıklarda endojenik olarak oluşan hasar-ilşkili moleküler yapıları da (DAMP) tanıyabilmektedirler (Takeda ve diğerleri, 2003). Günümüzde insanda 10 TLR tanımlanmaktadır. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR6 hücre yüzeyinde ifade edilmektedir. Ancak TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 endozomal reseptörler olarak bulunmaktadır. Farklı TLR'ler ligandlarını tanımak için özgüllük göstermektedir. TLR2 bakteriyel lipopolisakkaritleri, TLR3 çift zincirli RNA/Poly (I:C), TLR4 bakteriyel lipopolisakkaritleri (LPS), TLR5 flajellini, TLR7 tek zincirli RNA'yı ve TLR9 DNA'daki metillenmemiş CpG-oligodinökleotidleri (CpG-ODN) tanımaktadır (Poltorak ve diğerleri, 1998; Aliprantis ve diğerleri, 1999; Hemmi ve diğerleri, 2000; Alexopoulou ve diğerleri, 2001; Hayashi ve diğerleri, 2001; Heil ve diğerleri, 2004).

TLR'ler evrimsel süreçte sıkı şekilde korunmuşlardır. Hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta antijenik yapıların tanınabilmesi için özelleşmiş reseptörler görev alır. Doğal bağışıklıkta rol oynayan fagositer hücreler, memeli hücrelerinde bulunmayan belli moleküler kalıplara bağlanarak mikroorganizmaları tanırlar. Doğal bağışıklık için gerekli olan reseptörler genom tarafından doğrudan kodlanır. Oysa antikörler ve lenfosit reseptörlerini kodlayan genler sürekli yeniden düzenlenmeye tabidirler. Doğal bağışıklıkta kullanılan bu reseptörler, yeniden düzenlenmeye uğramadıklarından özgüllük açısından sınırlı bir repartuara sahiptir. Ancak tanıdıkları bu kalıplar mutasyona uğramadığından verdikleri yanıt oldukça etkilidir (Zhao ve diğerleri, 2014).

Memeli TLR'lerinin sahip olduğu ligand bağlanma bölgelerinin yapısal özellikleri ortaktır. TLR, karakteristik olarak hücre dışı lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve hücre içi toll/interlökin (IL)-1 reseptör (TIR) bölgesinden oluşur (Şekil 2.5). Kristallografi çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, TLR'lerin dimerler olarak işlev gösterdiğine inanılmaktadır. Çoğu TLR homodimer olarak işlev gösterse de, TLR1, TLR2 ya da TLR6 ile heterodimerleri oluşturur. Her dimer farklı bir liganda özgüdür. TLR, PAMP ile bağlandığında, sitoplazma içindeki TIR bölgesi aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur (Owen ve diğerleri, 2013). Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir (Zhao ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.5. TLR'nin şematize modeli (Owen ve diğerleri, 2013)

2.3.2. TLR sinyal yolağı

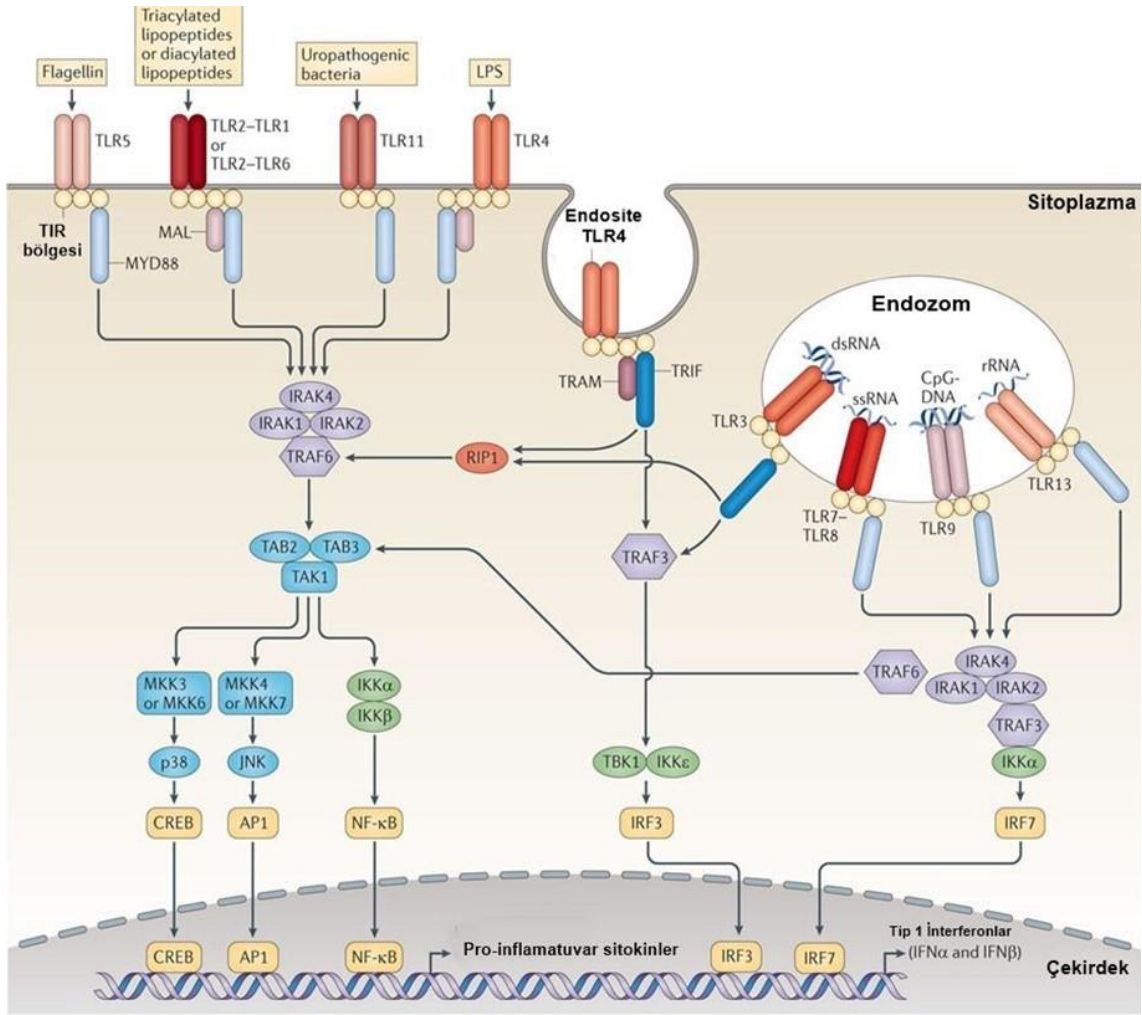
TLR'lerin aktivasyonunu takiben sinyalin bir ya da daha fazla adaptör protein (Miyeloid farklılaşma birincil yanıt 88; MYD88, TIR bölgesi-içeren adaptör molekül 1; TICAM1, Toll/interlökin-1 reseptör bölgesi-içeren adaptör protein; TIRAP ve TIR bölgesi-içeren adaptör molekül 2; TICAM2) aracılığıyla aktarımı gerçekleşmektedir. Tüm TLR'ler (TLR3 hariç) ve IL-1 reseptör ailesi üyeleri MyD88 aracılığıyla sinyali aktarmaktadır. TLR3 sinyali TIR bölgesi içeren adaptör-indükleyici interferon- β (TRIF) yolağıyla aktarır. TLR4 ise hem MyD88 hem de TRIF yolağını kullanarak sinyal iletimini gerçekleştirmektedir (Takeda ve diğerleri, 2003).

MYD88-bağımlı yolak

MYD88 bir adaptör moleküldür. TLR'ler TIR bölgesine bağlanır ve bir karboksi (COOH) TIR bölgesi ile bir N-terminal bölgesine sahiptir (Konat, 2008). Bu yolakta TLR'ler TIR bölgeleri ile MYD88 ile etkileşirler. Bu etkileşim ile TIR 42 bölgesine Interlökin-1 reseptör-ilişkili kinaz-1 (IRAK) gelir ve bu kinaz tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptör-ilişkili faktör 6/nükleer faktor kappa-B inhibitörü (TRAF6/IKK) ve mitojenle aktiveleşen protein kinaz kinaz (MAPKK) proteinini fosforiller. Böylelikle hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 gibi MAP kinazlar, Nükleer faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ve aktivatör protein 1(AP-1) uyarılır. $\kappa\beta$ -kinaz, $\kappa\beta$ 'yı fosforillediği zaman, NF- $\kappa\beta$ sitoplazmadan çekirdeğe geçer ve TNF- α İnterlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-12 gibi sitokinlerin transkripsiyonunu başlatır (Maierov ve diğerleri, 2013). Bu şekilde başlayan immun yanıt, akut inflamasyon ile sonuçlanır. Aşağı yönlü bu yolak devam ettiği sürece tümörleşme gelişebilir. MYD88-bağımlı yolak ile uyarılan İnterferon düzenleyici faktör (IRF) ailesi üyelerinden IRF-5 ve IRF-7, MYD88 ile direkt etkileşime girer ve inflamatuvar sitokinlerin ifadesini düzenler. IRF-1, IFN- α ile uyarıldıktan sonra MYD88 ile kompleks yapar ve çekirdeğe geçerek IFN- β , nitrik oksit sentaz, IL-12 ve p35 ifadesini başlatır. TRAF6 ile IRF-8 etkileşime girerek inflamatuvar sitokinlerin ifadesini düzenlemektedir (Konat, 2008).

MYD88-bağımsız ya da TRIF-bağımlı yolak

TLR3 ve TLR4 MYD88-bağımsız yolağı kullanmaktadırlar. TLR4'ün ligandı ile aktiveleşmesini takiben, IRF-3 ve NF- $\kappa\beta$, TRIF-bağımlı yolak ile geç de olsa uyarılır. TLR4 ile başlayan, IRF-3 aktivasyonu ile IFN- β ifade edilir. Bunu takiben IFN- β , transkripsiyon sinyal aktarıcı ve aktive edici 1 (STAT1)'i fosforiller ve IFN ile uyarılan bazı genlerin ifadesinde artma meydana gelir. TLR3 uyarımı sonrasında da IRF-3 aktive olur ve TRIF-bağımlı yoldan IFN- β uyarılır (Konat, 2008). MYD88 dışında TIR bölgesi içeren proteinler TRIF-bağımlı yolakta görev almaktadır. TIR bölgesi içeren adaptör proteinlerden biri olan TRIF, TICAM-1 olarak da adlandırılmaktadır. TRIF'ın aktive olması ile IFN- β transkripsiyonu meydana gelir. TRIF; TLR3 ve TLR4 ile ilgili, TRIF-bağımlı yolak için çok önemlidir ve TRIF, reseptör-aktive edici protein 1 (RIP1) ile etkileşime girerek TRIF-bağımlı NF- $\kappa\beta$ uyarımını başlatmaktadır (Konat, 2008) (Şekil 2.6).

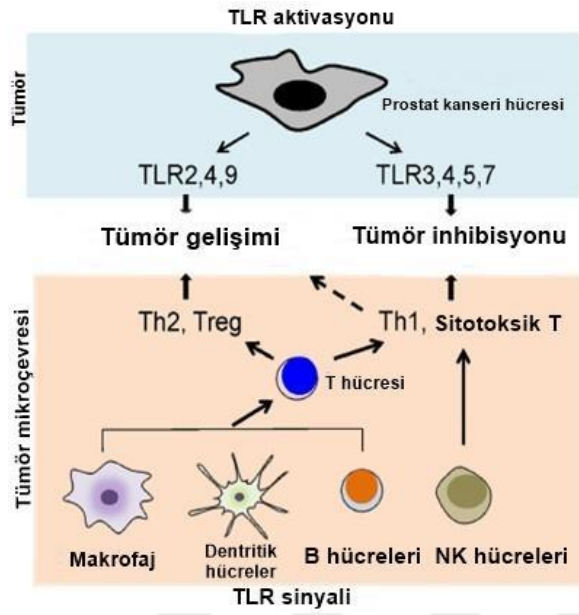


Şekil 2.6. Toll-benzeri reseptörler ve TLR-aracılı sinyal yolağı (Luke ve diğerleri, 2013)

2.3.3. TLR'ler ve prostat kanseri ilişkisi

Toll-benzeri reseptörler ağırlıklı olarak dentritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK) gibi doğal bağışıklık hücrelerinde ifade edilmektedirler. TLR'lerin bu hücrelerde uyarılması doğal bağışıklığın aktivasyonuna neden olmaktadır ve pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve adhezyon moleküllerinin yapımıyla sonuçlanmaktadır ve sonrasında da kazanılmış bağışıklığın aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır (Iwasaki ve Medzhitov, 2004). Artan kanıtlar TLR'lerin tümör hücrelerinde de ifade edildiğini göstermektedir. Tümör hücrelerinde TLR'lerin aktive olması ve tipik doğal bağışıklık hücrelerinin tümör mikroçevresinde aktive olmaları kompleks bir senaryoyla sonuçlanmaktadır (Şekil 2.7). Bu yüzden TLR'lerin uyarılması tümör gelişiminde “iki ucu keskin kılıç” rolü oynamaktadır. TLR'lerin dentritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri gibi antijen sunan hücrelerde aktive olması ya T yardımcı hücre

1 (Th1) ve T sitotoksik yanıtla ya da Th2 ve Düzenleyici T hücre (Treg) yanıtla sonuçlanmaktadır. Prostat kanserinde ise TLR2, TLR4 ve TLR9 aktivasyonunun tümör büyümesini uyardığı, ancak TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR7'nin aktivasyonunun prostat kanserini baskıladığı önerilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2014) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Toll-benzeri reseptörler ve prostat kanseri arasındaki ilişki (Zhao ve diğerleri, 2014)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı TLR'lerin farklı kanserlerde ifade edildiği ve meme, kolorektal, melanoma, akciğer, prostat, glioma, pankreas, karaciğer ve özofagal kanserlerde TLR ifade düzeylerinin arttığı belirtilmiştir (Ridnour ve diğerleri, 2013) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Farklı kanser türlerinde ifade edilen TLR'ler (Sato ve diğerleri, 2009)

Kanser Tipi	TLR
Gastrik kanseri	TLR2/4/5/9
Kolorektal kanseri	TLR2/3/4/5/9
Over kanseri	TLR2/3/4/5
Servikal kanseri	TLR3/4/5/9
Akciğer kanseri	TLR2/3/4/9
Prostat kanseri	TLR4/9
Melanoma	TLR2/3/4
Beyin kanseri	TLR2/4
Meme kanseri	TLR2/3/4/9
Hepatoselüler karsinoma	TLR2/3/4/6/9
Larinks kanseri	TLR2/3

2.4. Prostat Kanserinde İnflamasyonun Rolü

2.4.1. Sitokinler

Bağışıklık sisteminde ve inflamasyonda görevli olan, bunları düzenlemeye yardımcı olan, depolanmayan ve bağışıklık yanıtına cevap olarak kısa süreli üretilen proteinlere sitokin denilmektedir (Akdoğan ve Yöntem, 2018). Hücre içine sinyal iletimleri genellikle membran reseptörlerine bağlanma aracılığıyla olur ve birçok hücrede üretilir. Çeşitli hücrelerde özgül reseptörlere bağlanarak otokrin, parakrin ve endokrin etki gösterebilmektedirler (Akdoğan ve Yöntem, 2018). İnterferon-alfa (IFN- α), beta hücrelerinden ifade edilir ve pro-inflamatuar etki gösteren bir lökosit interferonudur (Meagher ve diğerleri, 2001). İnterferon-beta (IFN- β), doğal öldürücü hücrelerin (NK) aktive edilmesinde, fibroblastlarda ve doğal bağışıklığın artmasında görevlidir (Willenborg ve Staykova, 2001).

1800'lü yılların sonuna doğru yapılan araştırmalarda, enfeksiyon sonrası tümör gelişiminin azalmasıyla sitokinlerin kanserde rol oynayabileceği fikri öne sürülmüştür ve 1900'lü yıllarda bakteriyel endotoksinlerden TNF ve IFN gibi kanseri baskılayan faktörler salgılandığı bulunmuştur (Heikkila ve diğerleri, 2007). Sitokinler tümör hücrelerinin büyümesini doğrudan baskılayabildiği gibi bazı sitokinler tümör hücreleri üzerinde büyüme faktörü olarak davranabilirler. Bu sitokinlerin etkilerinin baskılanmasıyla tümör

büyümesi üzerinde inhibe edici bir tedavi uygulanmaktadır ve biyolojik sıvıda sitokin miktarının belirlenmesi tümör büyümesi için klinik bir belirteç olabilmektedir (Tisi ve diğerleri, 1992; Bilen ve Balcerska, 2008).

2.4.2. İnflamasyon ve prostat kanseri ilişkisi

Enfeksiyonları önleyen, kontrol eden veya ortadan kaldıran ilk yanıt doğal bağışıklıktır. Doğal immünite mikroorganizmaların yaşamsal yapılarını tanımaktadır ve edinsel bağışıklığı uyararak, en uygun yanıtın oluşturulmasını sağlar. Ayrıca doğal bağışıklığın TLR'ler ile birlikte kanser gelişimini düzenlediği yönünde çalışmalar mevcuttur (Junishi, 2012). İnflamasyon, kontrol altına alınmazsa kanser ile sonuçlanabilmektedir. Tümör gelişimi, invazyon, metastaz gibi evrelerde inflamasyon önemli rol oynamaktadır. Hücresel strese sebep olan inflamasyon DNA'da hasar ve genetik kararsızlığı ortaya çıkarabilmekte, böylelikle malign hücre dönüşümüne sebep olan mutasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte inflamasyon bağışıklık sistemi hücrelerini tümör gelişimine engel olmaktan alıkoymaktadır (Mairov ve diğerleri, 2013).

TLR ligandları kanser hücrelerinde TLR ifade edilme düzeylerini arttırırlar ve böylelikle aktive olan kanser hücreleri tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olan sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını başlatırlar. Bu sitokinlerle uyarılan immun sistem hücreleri, tümör immuntoleransına neden olacak daha fazla sitokin salınımına neden olurlar. Bu yeni salınan sitokinler aynı zamanda pro-anjiyojenik faktörlerin ve büyüme faktörlerinin salınımını başlatarak tümör gelişimine de katkıda bulunurlar (Sato ve diğerleri, 2009).

Meta-analizler de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalar, inflamasyonun prostat kanseri patogenezinde önemli bir rol oynamakta olduğunu göstermektedir (Mishina ve diğerleri, 1985; Dennis ve Dawson, 2002; Dennis ve diğerleri, 2002; Platz ve Marzo, 2004; Roberts ve diğerleri, 2004). Birçok vaka-kontrollü çalışma cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ile prostat kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmektedir (Fernández ve diğerleri, 2005; Patel ve diğerleri, 2005). Prostat bezinin inflamasyonu sonucu ortaya çıkan prostatitise neden olan mikroorganizmaların kronik inflamasyon aracılığıyla hücresel hasara, hücresel hiperproliferasyona ve sitokinlerin yapımının artmasına sebep olarak hücreleri kanserleşmeye yönlendirdiği ortaya konulmaktadır (Coussens ve Werb, 2002). Sitokinler hasarlı hücreleri, anjiyojenez ve doku onarımını

değiştirerek doku hasarını sınırlamak için gerekli olsa da, kontrolsüz sitokin yanıtı iyi huylu prostatitisten intraepitelyal neoplazi (PIN) ve kanser gelişimine neden olmaktadır (De Marzo ve diğerleri, 1999; Putzi ve Marzo, 2000).

2.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Matriks metalloproteinaz (MMP)'lar, ekstrasellüler proteinaz ailesi üyeleridir. MMP'ler ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkımından sorumludurlar. MMP'lerin ECM'nin yenilenmesinde, dokuların yeniden şekillenmesi, anjiyogenez, morfogenez ve gelişimde çok önemli görevleri vardır. MMP'ler; embriyonik gelişim, ovulasyon, kemik şekillenmesi ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik olayda görev alırlar. Ayrıca hücre göçü, invazyon, hücre çoğalması ve apoptozda da MMP'ler görev yapmaktadırlar (Vu ve Werb, 2000; Visse ve Nagase, 2003). MMP'lerin hepsi ilk üretildiklerinde proenzimlerdir. Proteolitik işlemlerden geçerek aktif olurlar ve MMP aktivitesindeki artış sonucu kardiyak hastalıklar, ateroskleroz, periodontal hastalıklar, tümör hücre metastazı ve artritler gibi birçok hastalık gelişmektedir (Visse ve Nagase, 2003). MMP'lerin molekül ağırlıkları 19-92 kDa arasında değişmektedir (De Souza ve diğerleri, 2002). MMP ailesine dâhil 25 MMP vardır. MMP'ler beş temel sınıfa ayrılırlar; kollajenazlar, stromelizinler, jelatinazlar, matrilisinler ve membran-tip MMPler (Mt-MMP) (Amano ve diğerleri, 2001; Murphy ve Nagase, 2008).

MMP'lerin jelatinaz grubunda iki alt grubu vardır (tip A ve tip B). Jelatinaz A, 72 kDa olan MMP-2'dir ve keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreler, kondrositler, osteoblastlar, monositler ve transforme olmuş değişik hücreler tarafından yapılmaktadır (Opdenakker ve diğerleri, 2001). Jelatinaz B, 92 kDa olan MMP-9'dur. MMP-9, aktive olduktan sonra, birçok ekstrasellüler matriks molekülünü parçalayabilir (Woessner ve diğerleri, 1991).

Farklı kanserler, farklı organlara metastaz yapmaktadırlar. Prostat kanserinden ölen bireylerde yapılan araştırmalarda, %90'lık oranla kemiklere, sonrasında akciğer, karaciğer, plevra ve adrenal bezlere prostat kanseri hücrelerinin metastaz yaptığı gösterilmiştir (Bubendorf ve diğerleri, 2000).

Metastaz için gerekli olan lokal invazyon, tümör hücreleri adezyon yeteneklerini kaybettiklerinde ve migrasyon ile ECM'yi sindirdiklerinde gerçekleşebilmektedir. Prostat kanseri hücreleri normal hücelere göre hücre-hücre ve hücre-ECM bağlantısını kaybetmiştir. E-kaderin ifadesi azalmıştır ve hücre-hücre bağlantılarını kaybeden prostat kanseri hastalığının şiddeti artmaktadır (Cheng ve diğerleri, 1996; Saha ve diğerleri, 2008). Prostat kanserinin kötü huylu özellik kazanmasında epitelyal mezenkimal geçişinde (EMT) E-kaderin kaybı önemlidir (Wallerand ve diğerleri, 2010).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Azot tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu (-20 °C) (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-86 °C) (Sanyo, Japonya)
- ELISA okuyucu (Thermo Scientific, ABD)
- Nanodrop (Thermo Scientific, ABD)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD)
- Güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)
- Kuru ısıtıcı blok (VWR, ABD)
- Manyetik karıştırıcı (VWR, ABD)
- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 1000 µL, 5 mL) (Thermo Scientific, ABD)
- pH metre (Mettler Toledo, İsveç)
- Real-time PCR cihazı, (Bio-Rad, ABD)
- Su banyosu, (Nüve, Türkiye)
- Soğutmalı santrifuj (Beckman Coulter, ABD)
- Spin vorteks (Biosan, Türkiye)
- Jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Ultra saf su cihazı (Milipore, Almanya)
- Tetracell elektroforez (Bio-Rad, ABD)
- Mini protean dikey elektroforez (Bio-Rad, ABD)

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- RPMI 1640 (Thermo Scientific, ABD)
- Akrilamid (Sigma, ABD)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma, ABD)

- Bis-akrilamid (Sigma, ABD)
- Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma, ABD)
- Fosfat Tuzlu çözelti (PBS) (Sigma, ABD)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, ABD)
- Tetrametilendiamin (TEMED) (Sigma, ABD)
- Tris (Sigma, ABD)
- Fetal sığır serum (FBS) (Sigma, ABD)
- Epitel hücre büyüme ortamı (ECGM) (Gibco, ABD)
- Düşük serumlu büyüme destekleyicisi (LSGS) (Gibco, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco, ABD)
- Lipopolisakkarit (LPS) (Invivogen, ABD)
- CpG- Oligodinükleotid (CpG-ODN) (Invivogen, ABD)
- Nobiletin (Sigma, ABD)
- SYBR green (Bio-Rad, ABD)
- Tripan mavisi (Sigma, ABD)
- Bradford çözeltisi (Bio-Rad, ABD)
- RIPA lizis tamponu (Thermo Scientific, ABD)
- PageRuler protein belirteci (Bio-Rad, ABD)
- GAPDH, TLR4 ve TLR9 genlerine özgü primerler (Gen-Era, Türkiye)
- Tripsin (Thermo Scientific, ABD)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Thermo Scientific, ABD)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma, ABD)
- Tween-20 (Sigma, ABD)
- Nitroselüloz membran (Bio-Rad, ABD)
- Whatman filtre kâğıdı (Whatman, İngiltere)
- β -merkaptoetanol (Sigma, ABD)
- Bromfenol mavi (Merck, Almanya)
- Glisin (Sigma, ABD)
- Asetik asit (Sigma, ABD)
- Metanol (Sigma, ABD)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma, ABD)
- Ponceau S (Thermo Scientific, ABD)
- Süt tozu (Sigma, ABD)
- Kalsiyum klorür (CaCl₂) (Sigma, ABD)

- Triton-X (Sigma, ABD)
- Coomassie brilliant mavi (Sigma, ABD)
- Kemilüminesans çözelti (Bio-Rad, ABD)
- İzopropanol (Bio-Rad, ABD)

3.1.3. Kullanılan kitler

- Kemilüminesans kit (Bio-Rad, ABD)
- IFN- α ve IFN- β ELISA kiti (Elabscience, ABD)
- cDNA ters transkriptaz kiti (Vivantis, ABD)
- RNA izolasyon kiti (Vivantis, ABD)
- WST-1 (Roche, Almanya)

3.1.4. Kullanılan solüsyonların hazırlanması

Tris-HCl (1,5 M pH 8,8)

18,15 g Tris tartılıp son hacim 80 mL olacak şekilde distile suda çözüldü. HCl ile pH 8,8'e ayarlandı ve 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl (1 M pH 6,8)

6 g Tris tartılarak son hacim 80 mL olacak şekilde distile suda çözüldü. HCl ile pH 6,8'e ayarlandı ve 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum asetat (3M)

2,46 g Sodyum asetat tartılıp son hacim 1 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.

%10 SDS

1 g SDS tartılıp son hacim 10 mL olacak şekilde distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

Amonyum persülfat (APS) (%10)

1 g APS tartılıp 10 mL distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C’de saklandı.

6X Yükleme boyası

İçeriği 1 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2 mL gliserol (% 99,7), 1,6 mL % 10 SDS, 0,4 mL β -merkaptoetanol, 0,4 mL % 0,5 (w/v) bromofenol mavi ve 2,6 mL distile su şeklindedir.

%30 Akrilamid/Bisakrilamid

29,2 g Akrilamid, 0,8 g Bisakrilamid tartılıp son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C’de saklandı.

5X SDS-PAGE yürütme çözeltisi

4,5 g Tris, 21,6 g glisin ve 1,5 g SDS tartılıp son hacim 1000 ml olacak şekilde distile suda çözüldü ve elde edilen 5X tampon 1X 'e seyreltili.

SDS-PAGE sabitleştirici solüsyon (fiksatif)

40 mL metanol ve 10 mL asetik asit karıştırıldı ve distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.

Western blot transfer çözeltisi

0,58 gr tris, 0,29 gr glisin, 0,025 gr SDS (0,375 mL % 10 SDS’den) tartılıp son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.

TBS-T pH 7,6

2,42 gr tris ve 8 gr NaCl tartılıp son hacim 900 mL olacak şekilde distile suda çözüldü. 1 mL Tween-20 eklendi ve pH 7,6’ya ayarlandıktan sonra distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Ponceau S boyama çözeltisi

0,1 gr Ponceau S ve 0,5 mL asetik asit karıştırıldı ve 100 mL distile suda çözüldü.

Bloklama çözeltisi

5 g süt tozu, 10 mL TBST içinde çözüldü ve filtre kâğıdından geçirilerek kullanıldı.

Aktivasyon tamponu

6,06 g Tris, 1,47 g CaCl₂, 2,92 g NaCl, 1 L distile su içinde çözüldü ve +4 °C 'de saklandı.

Renatürasyon çözeltisi

25 mL triton X-100, 975 mL distile suda çözüldü.

2X indirgeyici olmayan çözelti

İçeriği 1,0 mL 0,5 M tris-HCL, 0,8 mL gliserol, 3,2 mL %10'luk SDS, 0,2 mL % 0,2'lik bromfenol mavi, 2,8 mL distile su şeklindedir. Oda sıcaklığında saklandı.

Boyama çözeltisi

İçeriği %0,5'lik coomassie brilliant mavi R-250, %40 metanol, %10 asetik asid olacak şekilde taze hazırlandı.

Yıkama çözeltisi

İçeriği %40 metanol, %10 asetik asit olacak şekilde taze hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

Prostat kanseri hücreleri olarak LNCaP (p53 işlevsel, AR-bağımlı), PC-3 (p53 null, AR-bağımsız) ve kontrol hücreleri olarak HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücreleri) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Kocaeli Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKART)'nde gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü steril laminar hava akımlı kabinde gerçekleştirilmiştir. Sıvı azot tankında depolanan hücreler çalışma sırasında 37 °C su banyosunda çözölmüş ve hücre dondurma solösyonundan arındırıldıktan sonra 60 mm'lik besiyeri içeren petri kaplarına ekilmiştir. Maksimum miktarda hücre elde etmek için hücreler 60 mm'lik petri kabında çoğaltıldıktan sonra 100 mm'lik petri kaplarına aktarılmıştır ve bu işlem yaklaşık 5-6 pasaj olacak şekilde uygulanmıştır.

LNCaP ve PC-3 hücreleri petri kaplarında %10 FBS içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), kontrol grubu olan HUVEC hücreleri ECGM (düşük serum büyüme desteğı içeren endotelyal hücre büyüme ortamı) besiyerinde çoğaltılmıştır. Besiyerlerine 2 mM L-glutamin, 50 IU/mL penisilin ve 50 mg/mL streptomisin eklenmiştir. Daha sonra 37 °C'de (%5 CO₂) kültüre edilmiştir.

LPS, ODN ve NOB kimyasalları ticari olarak temin edilmiştir. Analizlerin yapılması aşamasında kullanılmak üzere hücreler Tuzlu fosfat çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra tripsin-EDTA (%0,25 tripsin/1mM EDTA) solösyonu kullanılarak hücreler petri kaplarından kaldırılmaları sağlanmıştır.

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır ve üzerine eşit miktarda tripan mavisi boyası konarak iyice karışması sağlanmıştır. Bu karışımdan mikropipet yardımıyla Thoma lamına (Marienfeld, Almanya) 12 µL aktarılmış ve binoküler ışık mikroskopunda 10x objektifinde renksiz (canlı) ve renkli (ölü) hücreler ayrı ayrı sayılmıştır.

3.2.2. WST-1 hücre canlılık testi

NOB'un IC₅₀ değeri WST-1 (Roche, Almanya) testi ile belirlenmiştir. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücreleri için 96 kuyulu mikropłakanın her kuyucuğına 100 µL besiyeri ile 5×10³ hücre ekildi ve 100 µL besiyeri ile 24 saat inkübe edilerek hücrelerin %80 konfluent hale gelmesi sağlanmıştır. Fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ile farklı konsantrasyonlarda (0-5-10-20-40-80-160 µM) (Chen ve diğeri, 2014) NOB eklenerek 6 ve 24 inkübasyona bırakılmıştır.

LPS ve ODN'nin hücre canlılığına etkisini görebilmek için aynı şekilde WST-1 testi ile PC-3, LNCaP ve HUVEC hücreleri için 96 kuyulu mikropłakanın her kuyucuğuna 100 µL besiyeri ile 5×10^3 hücre ekildi. Daha sonra 100 µL besiyeri ile 24 saat inkübe edilerek hücrelerin %80 konfluent hale gelmesi sağlanmıştır. Fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ile farklı konsantrasyonlarda LPS ve ODN (1 ve 5 µM) eklenerek 6 ve 24 inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süreleri sonunda 10 µL WST-1 boyası her kuyuya eklenerek 4 saat beklenmiştir. 4 saat sonunda ELISA okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan™ FC Microplate Photometer, ABD) 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sonucunda her hücre için ayrı olarak ortalama IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Bu değerler göz önüne alınarak belirli zaman aralıklarında hücrelere NOB ve/veya ligand uygulaması (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2) sonrasında diğer moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Ligand ve/veya NOB'un hücrelere uygulanması

TLR4

TLR4 hücre yüzeyinde eksprese olup bakteriyel LPS'yi tanır (Zhao ve diğerleri, 2014). PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerine uygun hücre kültürü şartları altında moleküler analizler öncesinde NOB ile birlikte TLR4 reseptör uyarımı için LPS uygulaması çeşitli kombinasyonlarda Çizelge 3.1'deki gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.1. TLR4 reseptör uyarımı için LPS uygulama kombinasyonları

Zaman	1. grup (kontrol)	2. grup	3. grup	4. grup
6 saat	LPS yok (-)	LPS var (+)	LPS var (+)	LPS yok (-)
24 saat	Nobiletin yok (-)	Nobiletin var (+)	Nobiletin yok (-)	Nobiletin var (+)

TLR9

TLR9 hücre içi veziküllerde bulunur ve metillenmemiş CpG dinükleotid motifleri içeren omurgalı ve bakteriyel DNA'yı tanır (Zhao ve diğerleri, 2014). PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerine uygun hücre kültürü şartları altında moleküler analizler öncesinde NOB ile

birlikte TLR9 reseptör uyarımı için ODN uygulaması çeşitli kombinasyonlarda Çizelge 3.2'deki gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.2. TLR9 reseptör uyarımı için ODN uygulama kombinasyonları

Zaman	1. grup (kontrol)	2. grup	3. grup	4. grup
6 saat	ODN yok (-)	ODN var (+)	ODN var (+)	ODN yok (-)
24 saat	Nobiletin yok (-)	Nobiletin var (+)	Nobiletin yok (-)	Nobiletin var (+)

3.2.4. Hücrelerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

TLR4 ve TLR9 reseptörünün mRNA gen ifade düzeylerini belirlemek için PC-3, LNCaP ve HUVEC hücreleri 10 mm'lik hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası fenol kırmızısı ve FBS içermeyen besiyeri ile değiştirilerek her hücre için belirlenen doz ve 6 ve 24 saatlik sürelerde çeşitli ligand ve/veya NOB kombinasyonları uygulanmıştır. Uygulama süreleri sonrasında total RNA ticari RNA izolasyon kiti (Vivantis, ABD) kullanılarak protokole göre izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar her hücre için spektrofotometrede (Thermo Scientific, NanoDrop 3300, ABD) 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında ölçülerek konsantrasyonları ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) belirlenmiştir.

RNA izolasyon protokolünde izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- Hücrelerin olduğu 10 mm'lik petri kaplarına 1 mL PBS eklendi ve hücre kazıyıcı ile toplanarak 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. $1000 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Pellet üzerine 350 μl TR çözeltisi eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
- 350 μl lizat homojenizasyon kolonuna aktararak $1000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpüne geçen sıvıya 350 μl %80 etanol eklendi ve karıştırıldı.

- 650 µl örnek RNA bağlama kolonuna transfer edildi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 500 µl yıkama çözeltisi eklendi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 70 µl DNase I Digestion karışımı RNA bağlama kolonuna aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda 500 µl Inhibitor removal çözeltisi eklendi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 500 µl yıkama çözeltisi eklendi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 500 µl yıkama çözeltisi ile yıkama tekrarlandı ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Filtreyi arta kalan çözeltiden temizlemek için 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Filtre yeni mikrosantrifüj tüpüne geçirildi. Membranın üzerine doğrudan 40-60 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika sonra 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Alta geçen sıvı -20 °C'de saklandı.

Elde edilen RNA, ters transkriptaz (Vivantis, ABD) kiti kullanılarak kit protokolüne göre cDNA'ya çevrimi gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi için ısı döngü cihazı (Techne, İngiltere) kullanıldı ve protokolde izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- RNA-Primer karışımı hazırlandı (Her örnek için 10 µg RNA; Oligo dT'den 40 µM; Random Heksamer'den 50 ng/µl; dNTP karışımından 10 µM ve nükleaz içermeyen-su).

- Bu karışım 65 °C'de 5 dakika bekletildi ve sonrasında buzda 2 dakika soğutuldu.
- cDNA sentez karışımı hazırlandı (10X M-MuLV çözeltisi; 100 ünite M-MuLV Ters Transkriptaz ve nükleaz içermeyen su).
- 10 µl cDNA sentez karışımına 10 µl RNA-primer karışımı eklendi.
- Elde edilen 20 µl karışım 25 °C'de 10 dakika bekletildi. Ardından 42 °C'de 60 dakika bekletildi.
- Ardından 85 °C'de 5 dakika bekletildi ve buzda 1-2 dakika soğutularak reaksiyon sonlandırıldı.
- qPCR (kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) analizinde kullanılmak üzere cDNA'lar -80 °C'de saklandı.

3.2.5. qPCR

Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak ilgilenilen genlere ait mRNA düzeyleri, 3 tekrarlı olmak üzere her bir reaksiyon için 96'lık PCR plakaları kullanılarak belirlenmiştir. Her bir kuyu için 5 µL SYBR Green çözeltisi (2X), 0,3 µM ileri primer, 0,3 µM geri primer ve 2 µL kalıp cDNA (1:20) buz üstünde karıştırılarak kit içerisindeki su ile son hacim 10 µL'ye tamamlanmıştır. qPCR reaksiyonunda kullanılan gene özgül primer çiftleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. qPCR reaksiyonları CFX Connect sisteminde (Bio-Rad, ABD), 95 °C'de 20 saniye, 40 döngü olarak 95 °C'de 1 s ve 60 °C'de 20 s şeklinde gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak β -gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır ve deney grupları arasındaki karşılaştırmalar kontrol grubuna göre yapılmıştır. PCR reaksiyonlarında kontaminasyon kaynaklı olası hataların belirlenmesi amacı ile kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol grupları da kuyucuklara eklenmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin özgül olup olmadığının belirlenmesi için de bu reaksiyonlara ait erime eğrileri analiz edilmiştir. qPCR sonuçları REST (Version 2.0, 2008) programı ile analiz edilmiştir (Pfaffl ve diğerleri, 2002). ΔC_T değerleri kullanılarak gen ifadelerindeki göreceli değişim hesaplanarak grafikleri çizilmiştir.

Çizelge 3.3. qPCR deneylerinde kullanılan gene özgül primer çiftleri (F: İleri Primer, R: Geri Primer)

TLR4	F	5'-TAGCAGTCATCCAACAGAATCAT-3'
	R	5'-AATCTTCTGAGTTGATTATGGGTAA-3'
TLR9	F	5'-AGTCCTCGACCTGGCAGGAA-3'
	R	5'-GCGTTGGCGCTAAGGTTGA-3'
GAPDH	F	5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3'
	R	5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'

3.2.6. IFN- α ve IFN- β analizi

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücreleri 10 mm'lik hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası fenol kırmızısı ve FBS içermeyen besiyerinde her hücre için belirlenen doz ve 6 ve 24 saatlik sürelerde çeşitli ligand ve/veya NOB kombinasyonları uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kültür ortamındaki besiyeri toplanarak IFN- α ve IFN- β miktarı IFN- α ve IFN- β ELISA ticari kiti (Elabscience, ABD) kullanılarak protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Protokolde izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- 96'lık plakada belirlenen standart ve çalışma örnek kuyularına 100 μ L standart ve örnekler eklendi. Kör kuyuya ise herhangi bir örnek eklenmedi. 90 dakika 37 °C inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyulardan sıvı kısımlar uzaklaştırıldı. Tüm kuyulara 100 μ L biyotinlenmiş tespit edici antikor eklendi ve 1 saat 37 °C inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyulardan sıvı kısımlar uzaklaştırıldı ve kuyular yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı.
- Tüm kuyulara 100 μ L HRP eklendi ve 30 dakika 37 °C inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kuyulardan sıvı kısımlar uzaklaştırıldı ve kuyular yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı.

- Tüm kuyulara 90 µL substrat çözeltisi eklendi ve 15 dakika 37 °C inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 50 µL durdurucu çözelti eklendi ve bekletmeden oda ısısında 450 nm’de okundu.
- Sonuçlar hesaplandı.

3.2.7. Total protein izolasyonu ve miktar tayini

Total protein miktarını belirlemek için PC-3, LNCaP ve HUVEC hücreleri 10 mm’lik hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası fenol kırmızısı ve FBS içermeyen besiyerinde her hücre için belirlenen doz ve 6 ve 24 saatlik sürelerde çeşitli ligand ve/veya NOB kombinasyonları uygulanmıştır. Uygulama süreleri sonrasında total protein RIPA lizis çözeltisi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak izole edilmiştir. Her bir petri kabına 600 µL soğuk RIPA Lysis Buffer eklenmiş ve hücreler kazınarak toplanmıştır. 10 dakika 1000 g’de santrifüj edilmiş ve üst sıvı alınarak miktar tayini için kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

Miktar tayini için Bradford Assay (Bradford, 1976) yöntemi kullanılmıştır. Ölçülecek protein özütünden 1 µl alınarak 19 µl standart tamponu ile karıştırılmıştır. Karışım üzerine 1 mL 1X Bradford Reagent (Bio-Rad, ABD) eklenerek karıştırılmıştır ve karanlıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile 595 nm’de ölçülmüştür. Örneklerin protein konsantrasyonları BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Her örnek için ölçümler 3 defa tekrarlanmıştır ve bu tekrarların ortalamalarından elde edilen sonuçlar protein örneklerinin konsantrasyonları olarak kabul edilmiştir. Elde edilen protein konsantrasyonları elektroforezde eşit miktarda protein yüklemek amacıyla kullanılmıştır.

3.2.8. SDS-PAGE ve western blotlama

SDS-PAGE

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. SDS-PAGE Tetracell elektroforez (Bio-Rad, ABD)

cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Çizelge 3.2’de verilen kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları

Kullanılan Kimyasallar	Ayırma Jeli (%12)	Yükleme Jeli (%4)
dd H ₂ O	3,3 mL	3 mL
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	1,25 mL
%10 SDS	100 µl	50 µl
%30 Akrilamid/BisAk	4 mL	670 µl
%10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Toplam	10 mL	5 mL

Hazırlanan ayırma jeli 1 mm aralıklı cam plakalar arasına dökülmüş ve üzerine izopropanol (300 µl) konularak jelin yüzeyinin düzleşmesi sağlanmıştır. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra izopropanol dökülerek jelin yüzeyi saf su ile yıkanmıştır. Jel üzerinde cam plakalar arasında kalan su kurutma kâğıdı yardımıyla tamamen uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan yükleme jeli polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine 1 mm genişliğindeki teflon tarak arasına dökülmüştür.

Miktar tayini yapılmış olan proteinler eşit miktarlarda (50 µg) mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 1/1 oranında 6X yükleme tamponu eklenerek 95 °C’deki su banyosunda 4 dk. kaynatılmış ve proteinlerin denatürasyonları sağlanmıştır. Denatüre edilmiş örnekler oda ısısına getirildikten sonra santrifüj edilmiştir. Santrifigasyon sonrasında mikropipet yardımıyla jellerin ikinci kuyusundan itibaren eşit miktarda protein yüklenmiştir. İlk kuyucuğuna ise standart olarak 10-250 kDa aralığındaki PageRuler plus prestained protein belirteci (Bio-Rad, ABD) yüklenmiştir. Hazırlanan jeller vertikal elektroforez sistemine (Bio-Rad Mini-PROTEAN, ABD) yerleştirilerek içerisine uygun düzeye kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu konularak yürümeye hazır hale getirilmiştir. Yükleme jeli için 110 V akımda yaklaşık 30 dakika ve ayırma jelinde ise 180 V akımda yaklaşık 60 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürümesi tamamlanan jeller western blotlama analizi için kullanılmıştır.

Western Blotlama

SDS-PAGE ile ayrılmış protein örnekleri nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef proteine özgü antikorlarla analiz edilmiştir. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanılmıştır.

SDS-PAGE sonunda jel transfer tamponuna alınarak yaklaşık 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme esnasında nitroselüloz membran (Bio Rad, ABD) ve whatman (no 1) kâğıtları transfer tamponunda ıslatılmıştır. Süre sonunda transfer cihazının demir levhaları arasına alttan üste doğru sırasıyla 2 kat whatman kâğıdı, nitroselüloz membran, jel, 2 kat whatman kâğıdı olmak üzere (–) ve (+) kutuplara dikkat edilerek katmanlar halinde yerleştirilmiştir. Katlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek 25 V sabit akımda 30 dakika boyunca transfer gerçekleştirilmiştir. Transferin ardından membran proteinlerini boyayan Ponceau S boyası ile boyanarak western transferinin kalitesi kontrol edilmiştir. Protein bantları gözlemlendikten sonra Ponceau S boyası saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır ve membran %5 TBS-T bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılarak sırasıyla 15, 5, 5 dakika olmak üzere 3 kez TBS-T ile yıkanmıştır. Birncil antikor Çizelge 3.5'te belirtilen dilüsyonda TBS-T içerisinde hazırlanmış ve membran bu tampon içerisinde +4 °C'de gece boyu nazikçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün önceki yapılan TBS-T ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır ve Çizelge 3.5'te belirtildiği gibi ikincil antikor TBS-T içerisinde seyreltilerek membran 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. Görüntülemeye yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Kemilüminesans görüntüleme için Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi 1/1 oranında karıştırılarak membran yüzeyine konulmuş ve yüzeyin tamamının çözelti karışımı ile temas etmesi sağlanmıştır. Membran görüntüleme cihazı ile görüntülenmiş ve western blot bantlarının analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Western blotlama analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorların listesi

Primer Antikor	Sekonder Antikor
β -Aktin Mouse (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP birleşik (Bio-Rad, ABD) (1:20000)
TLR4 ve TLR9, Mouse (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP birleşik (Bio-Rad, ABD) (1:20000)
IRF3 ve IRF7, Mouse (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP birleşik (Bio-Rad, ABD) (1:20000)

3.2.9. Jelatin zimografi

NOB'un TLR'lerin tümör invazyonundaki rolü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için jelatin zimografi yöntemiyle matriks metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) enzim aktivitesindeki değişimler incelenmiştir.

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücreleri 10 mm'lik hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası fenol kırmızısı ve FBS içermeyen besiyerinde her hücre için belirlenen doz ile 6 ve 24 saatlik sürelerde çeşitli ligand ve/veya NOB kombinasyonları uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kültür ortamındaki besiyeri toplanarak MMP-2 (72 kDa) ve MMP-9 (92 kDa) miktarındaki değişimler incelenmiştir. Ayırıcı jel %7,5 olacak şekilde ve paketleyici jel %4 olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.6). İlk olarak ayırıcı jel hazırlanarak yaklaşık 45 dakika polimerleşmesi beklenmiştir. Ardından paketleyici jel hazırlanarak ayırıcı jel üzerine dökülmüş ve yaklaşık 30 dakika polimerleşmesi beklenmiştir.

Çizelge 3.6. Jelatin zimografi jel içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları

Reaktif	%7,5 Ayırcı Jel	%4 Paketleyici Jel
Distile su	7,7 mL	6,10 mL
10 mg/mL Jelatin substratı	2,0 mL	-----
%30 Akrilamid	5,0 mL	1,3 mL
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	5,0 mL	-----
0,5 M Tris-HCl, pH; 6,8	-----	2,5 mL
%10'luk SDS	200 µL	100 µL
%10'luk APS	200 µL	100 µL
TEMED	20 µL	10 µL

Santrifügasyon sonrasında mikropipet yardımıyla jellerin ikinci kuyusundan itibaren her kuyucukta 25 µg protein olacak şekilde homojenat ve 5X örnek yükleme tamponu ile 2X indükleyici ajan karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. İlk kuyucuğuna ise standart olarak 10-250 kDa aralığındaki PageRuler plus prestained protein ladder (Bio-Rad, ABD) yüklenmiştir. Hazırlanan jeller dikey elektroforez sistemine (Bio-Rad Mini-PROTEAN, ABD) yerleştirilerek içerisine uygun düzeye kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu konularak yürümeye hazır hale getirilmiştir. Elektroforez sistemi kapatılarak 60 V sabit voltajda oda sıcaklığında yaklaşık 3 saat elektroforez işlemi uygulanmıştır.

Elektroforezden sonra jeller ikişer defa 30 dakika süreyle %2,5 Triton X-100 renatürasyon tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra jeller, 37 °C'de bir gece boyunca aktivasyon tamponunda (jel inkübasyon tamponu) inkübe edilmiştir. Ertesi gün inkübasyondan alınan jeller, Coomassie Brilliant Blue R-250 boya çözeltisi içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jel üzerindeki fazla boyadan arındırma amacıyla yıkama çözeltisi ile yıkama yapılmıştır. Yıkanan jeller, görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD) ile dijital olarak görüntülenmiş ve elde edilen görüntüler ImageJ (ImageJ 1.46r, National Institutes of Health, ABD) yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.2.10. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 versiyonundaki (SPSS, ABD) yazılım paket programı kullanılarak yapılmıştır. Doza ve zamana bağlı olarak uygulama grupları arasındaki farklılıklar (kontrol, NOB, ligand ve NOB ve ligand uygulama grubu) post-hoc analizi için Duncan testi ile ölçülmüştür. İmageJ programı ile Jelatinaz Zimografi sonucunda elde

edilen bantların yoğunlukları 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Bu veriler SPSS programında gruplar arasındaki farklılıklar karşılaştırmalı olarak T-testi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

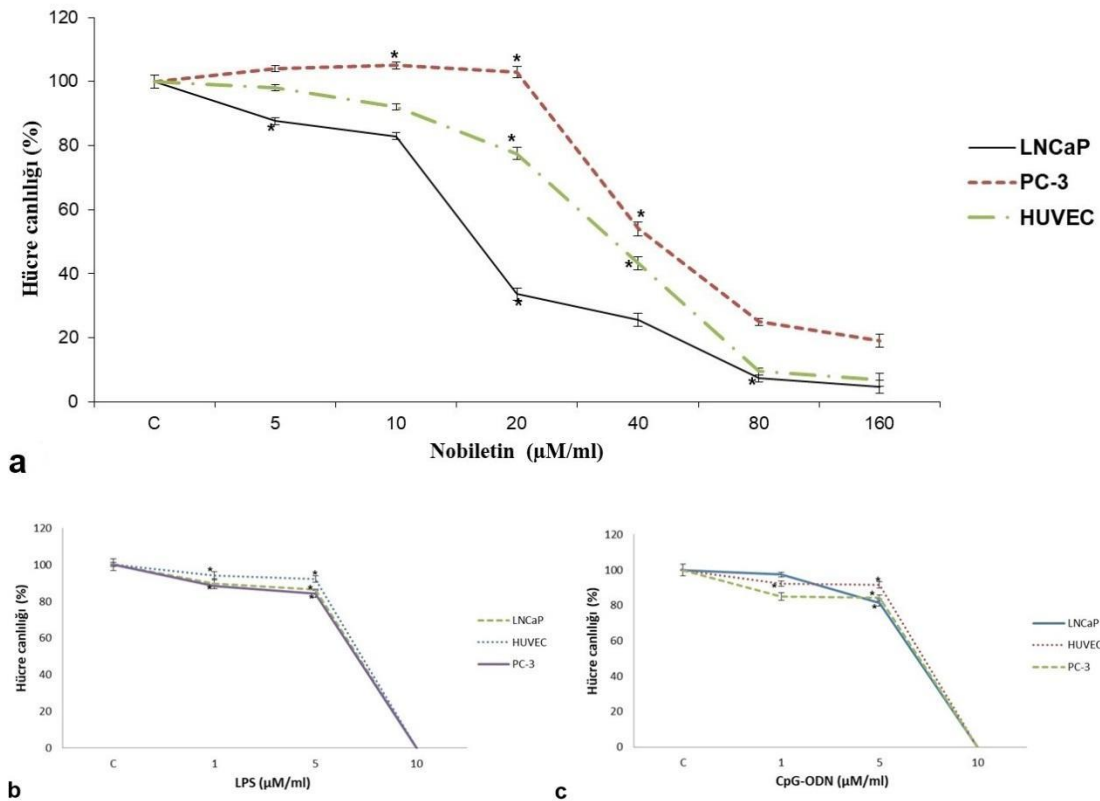




4. BULGULAR

4.1. WST-1 Hücre Canlılık Analizi Bulguları

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB (0-5-10-20-40-80-160 μ M) ve 1-10 μ M LPS ve ODN uygulaması sonrasında NOB için IC_{50} değerleri, LPS ve ODN için optimal doz WST-1 testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücrelerinde NOB'un ve ligandların hücre canlılığı üzerine etkisi. a) NOB'un hücre canlılığı üzerine etkisi, b) LPS'nin hücre canlılığı üzerine etkisi, c) ODN'nin hücre canlılığı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, CpG-ODN: Oligodinükleotid, μ M: mikromolar, ml: mililitre)

Şekil 4.1a'da görüldüğü gibi, PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB uygulaması sonunda elde edilen değerlerin ortalaması alınarak IC_{50} değerleri PC-3 ve HUVEC hücreleri için 40 μ M ve LNCaP hücreleri için 20 μ M olarak tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Şekil 4.1b ve Şekil 4.1.c'de görüldüğü gibi PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerine

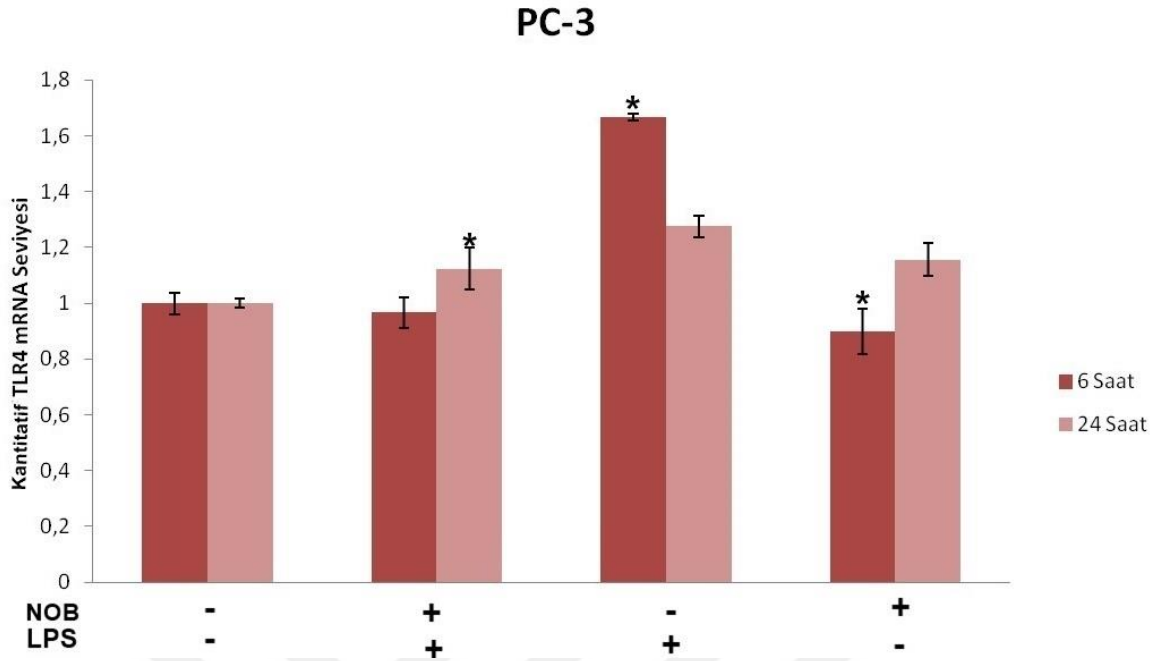
6 ve 24 saat 1-10 μ M LPS ve ODN uygulaması sonrasında optimal doz değerleri WST-1 testi ile 5 μ M olarak belirlenmiştir. 10 μ M konsantrasyonda hücre canlılığı gözlenmemiştir. Elde edilen verilere göre 5 μ M konsantrasyonun tüm hücrelerde her iki ligand için de toksik olmayan optimal doz olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu değerler göz önüne alınarak belirli zaman aralıklarında (6 ve 24 saat) hücrelere NOB (20 ve 40 μ M) ve ligand (5 μ M) uygulaması sonrasında diğer moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

4.2. qPCR Analizi Bulguları

Kontrol ve prostat kanser hücrelerine TLR4 ve TLR9 genlerinin mRNA düzeyindeki değişiklikleri kantitatif olarak belirlenmesi için hücrelere 6 ve 24 saat NOB ve/veya ligand uygulamasının ardından RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonunu takiben her örnek için uygun miktarda RNA ile sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak qPCR gerçekleştirilmiştir.

Her bir örnek üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Her bir örnekte hedef gen ifadenmesi referans gen (GAPDH) ifadenmesine normalize edildikten sonra NOB ve ligand uygulaması olmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen veriler analiz edilerek grafikler çizilmiştir (şekil 4.2-şekil 4.7).

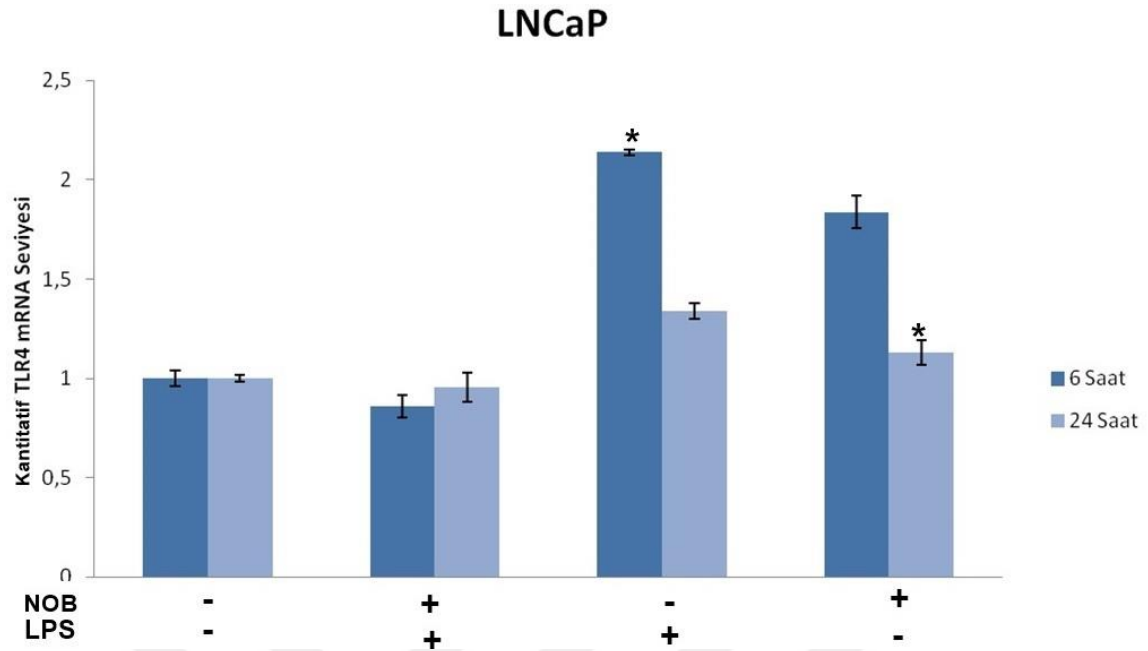
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonrasında TLR4 mRNA gen ifade düzeyi belirlenmiştir (şekil 4.2).



Şekil 4.2. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının kantitatif TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, LPS’nin tek başına 6 ve 24 saat uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 mRNA ifadesi artmış, ancak 6 saatlik uygulama sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). LPS/NOB’un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 mRNA ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). NOB’un tek başına 6 saatlik uygulaması sonucunda TLR4 mRNA ifadesi kontrol grubun göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

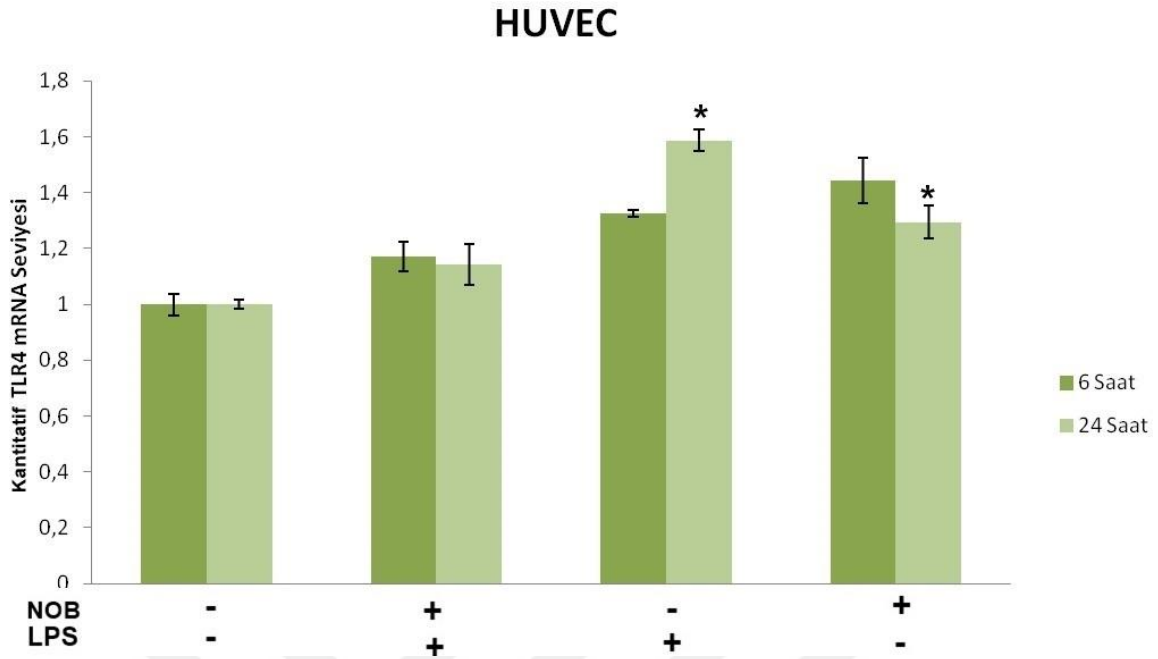
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonrasında TLR4 mRNA ifade düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının kantitatif TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, LPS/NOB'un birlikte uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 mRNA ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. NOB'un tek başına 24 saat boyunca, LPS'nin 6 saat boyunca LNCaP hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen artış anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). NOB'un tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 mRNA ifadesindeki artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

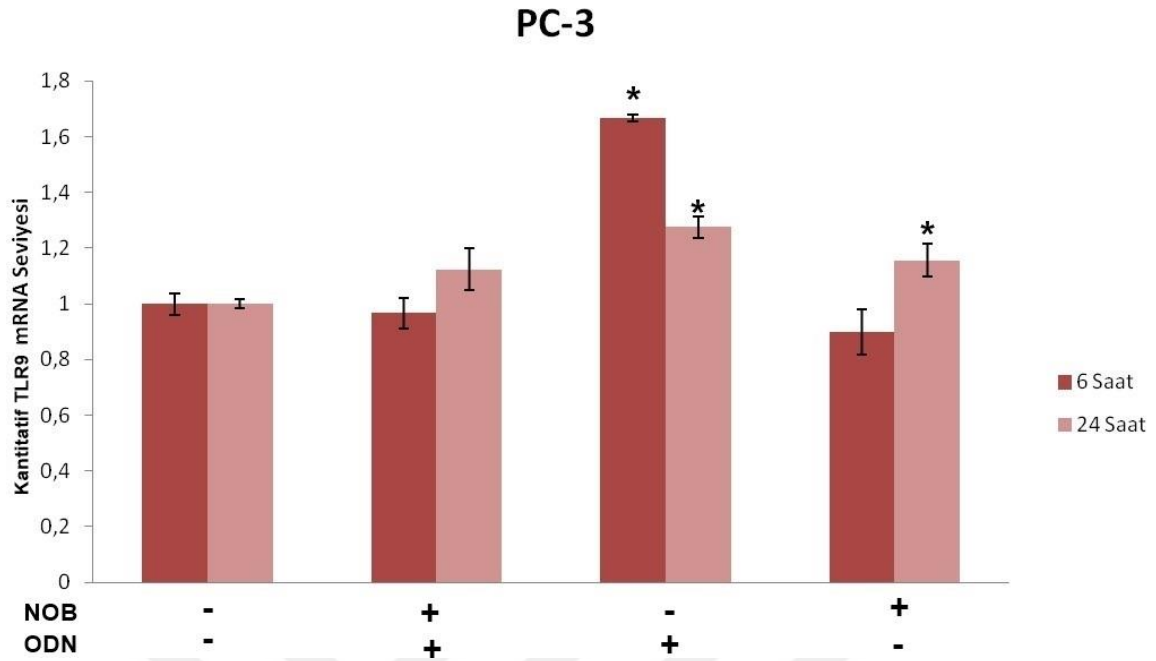
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonrasında kantitatif TLR4 mRNA ifade düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının kantitatif TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, LPS ve NOB'un tek başlarına 24 saat boyunca uygulanmaları sonucu TLR4 mRNA ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). LPS/NOB'un birlikte uygulanması sonucu her iki sürede de belirlenen artış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

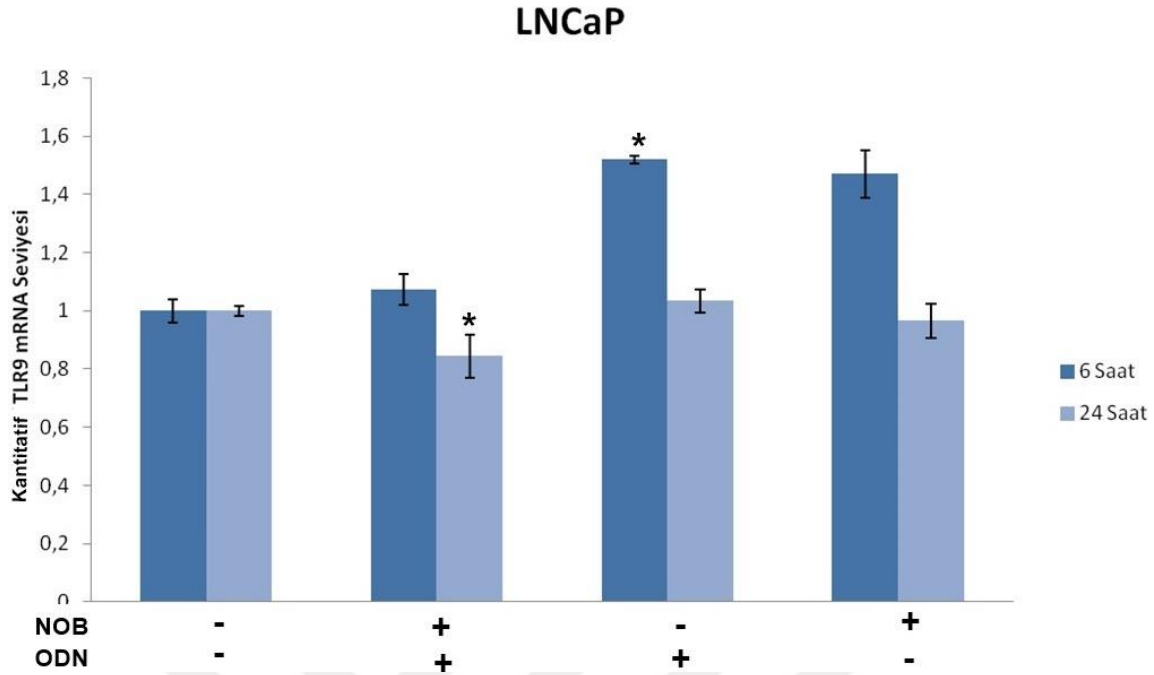
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonrasında kantitatif TLR9 mRNA ifade düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının kantitatif TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, ODN'nin tek başına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). NOB'un tek başına ve her ikisinin birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi azalmıştır, ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). NOB'un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

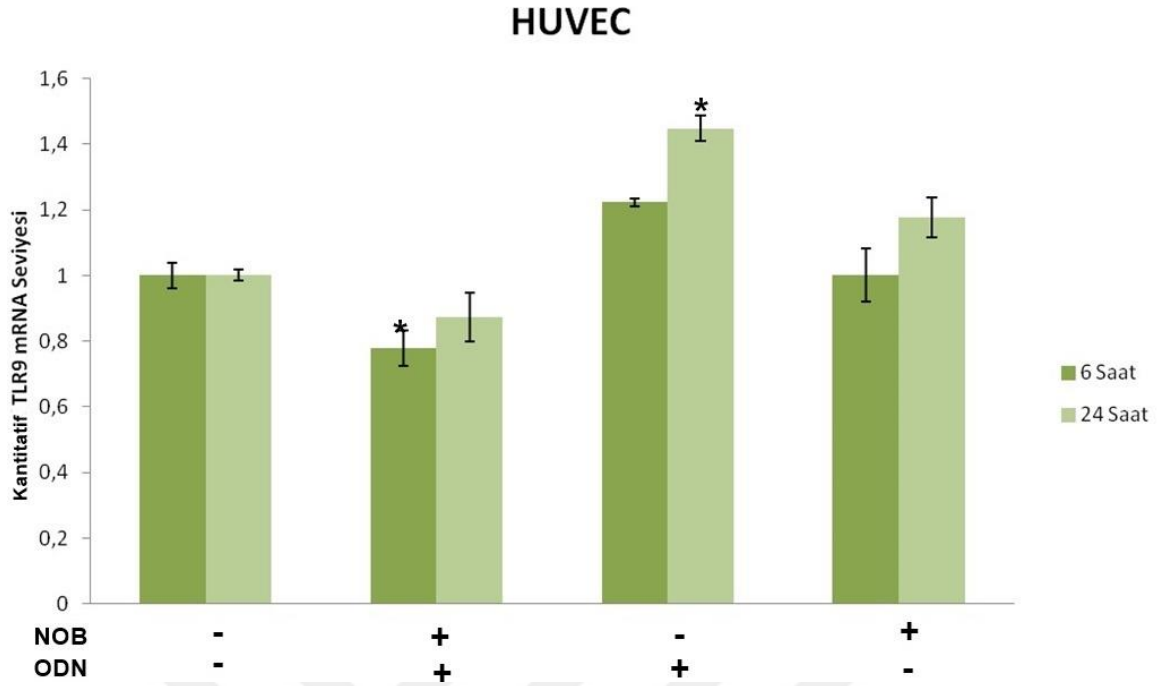
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonrasında kantitatif TLR9 mRNA ifade düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının kantitatif TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, NOB ve ODN’nin tek başlarına ve birlikte 6 saat süresince uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi genel olarak artmıştır. ODN’nin tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesindeki artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). ODN/NOB’un tek başlarına ve birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi genel olarak azalmıştır. ODN/NOB’un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonrasında kantitatif TLR9 mRNA ifade düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.7).

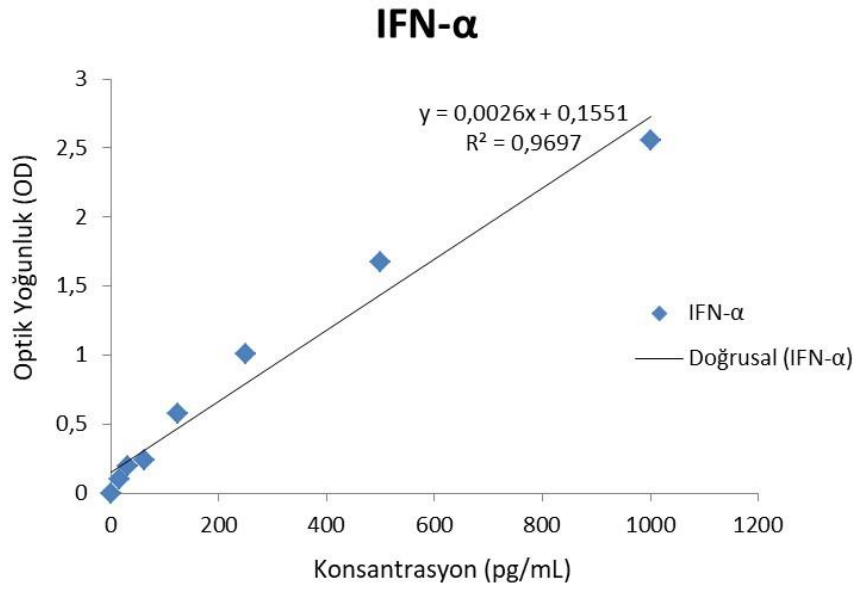


Şekil 4.7. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının kantitatif TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

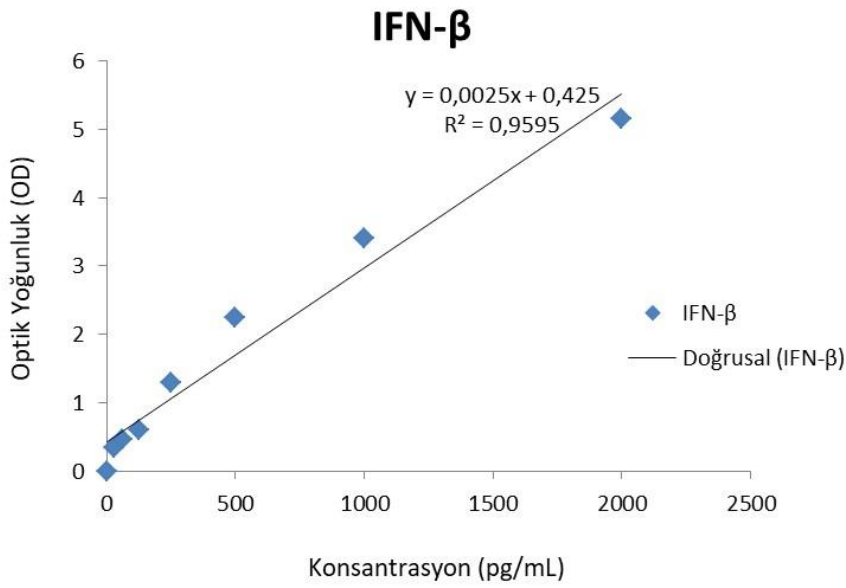
Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, ODN’nin ve NOB’un tek başına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi artarken, ODN’nin tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 mRNA ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). ODN/NOB’un birlikte 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 mRNA ifadesi azalmış, ancak 6 saatlik uygulama sonucunun anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

4.3. Sitokin Analizi Bulguları

İnterferon-alfa (IFN- α) ve interferon-beta (IFN- β) analizi için kullanılan kit Sandwich-ELISA metodunu temel almıştır. Analiz sonucunda optik yoğunluk (OD) spektrofotometre ile 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda ölçülmüştür. IFN- α ve IFN- β miktarlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere standart eğri grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



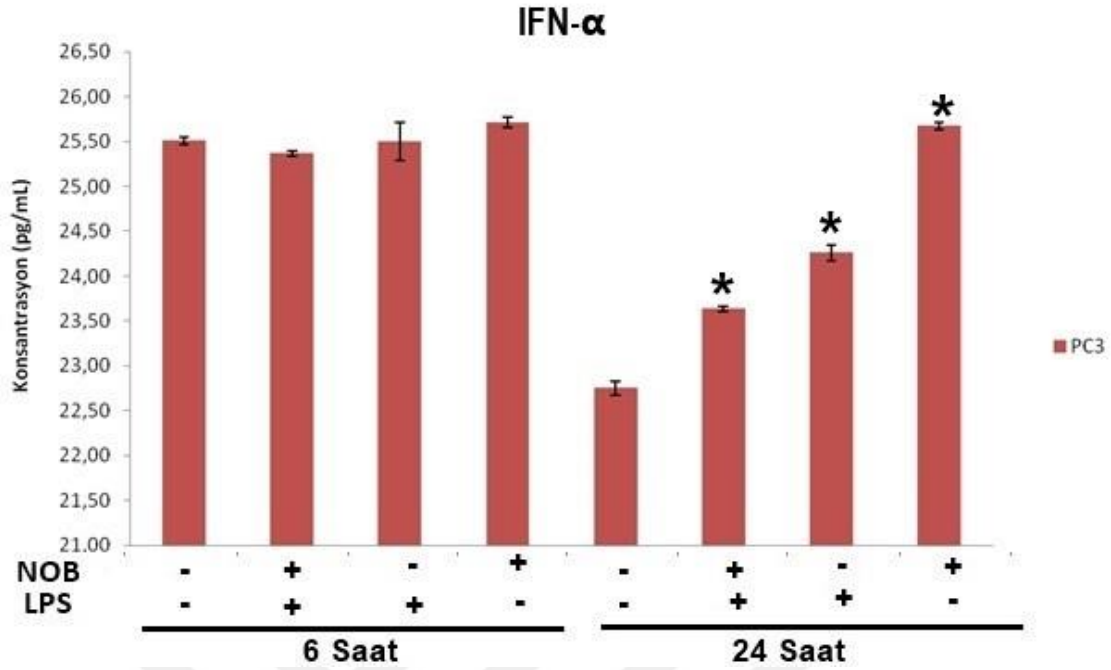
Şekil 4.8. IFN- α miktarı hesaplanan standart eğri grafiği



Şekil 4.9. IFN- β miktarı hesaplanan standart eğri grafiği

Örneklerin OD'si standart eğri ile karşılaştırarak örneklerdeki IFN- α ve IFN- β miktarı hesaplanmıştır (Şekil 4.10 – Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 – Şekil 4.21).

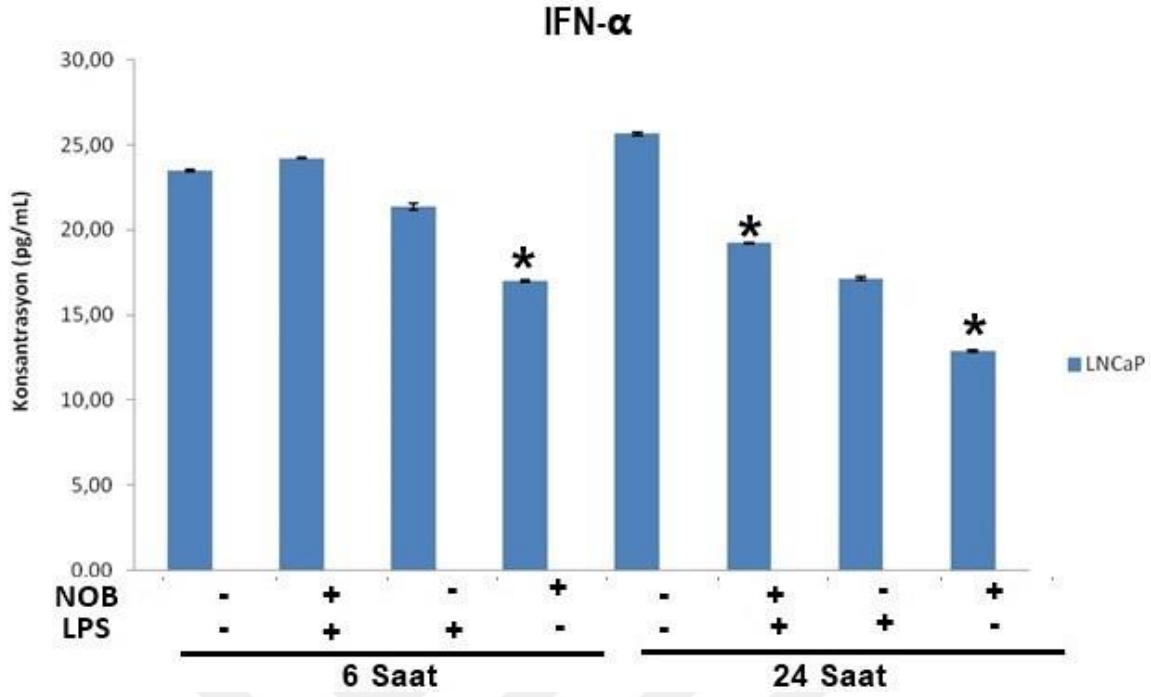
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- α miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.10’da görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine LPS ve NOB’un tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarında anlamlı derecede bir değişiklik gözlenmezken ($p > 0,05$), NOB ve LPS’nin un tek başına ve NOB/LPS’nin birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

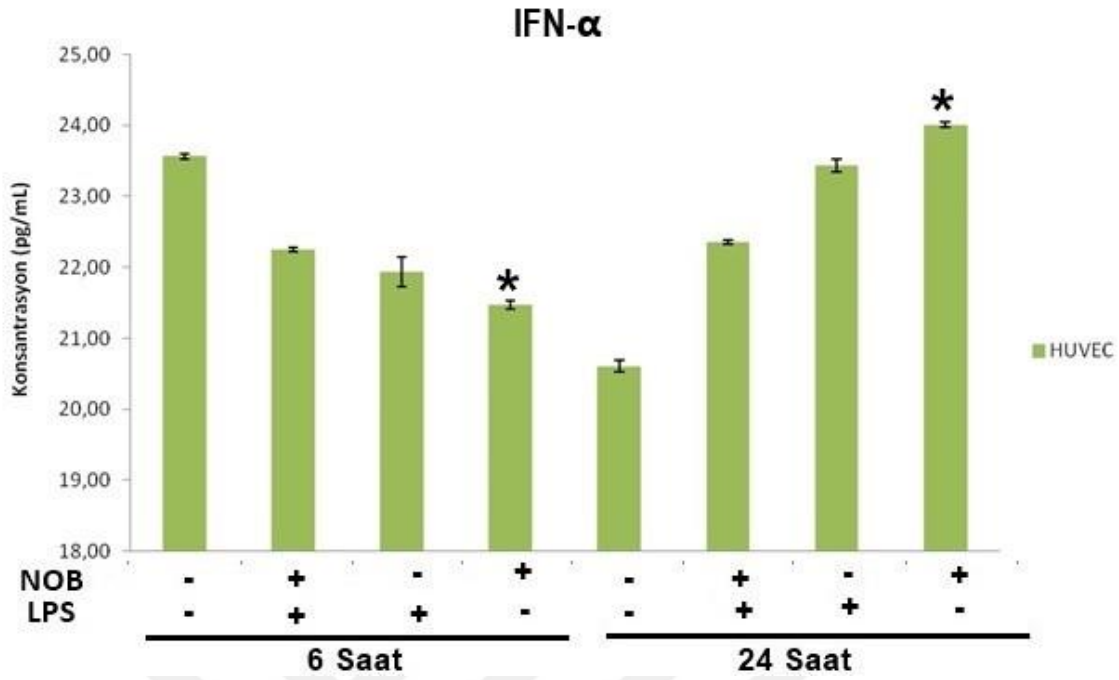
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- α miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, NOB ve LPS’nin tek başlarına ve birlikte 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarında azalma belirlenmiştir. Bu azalışlardan, NOB’un tek başına 6 ve 24 saat süresince, NOB/LPS’nin birlikte 24 saat boyunca uygulanması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

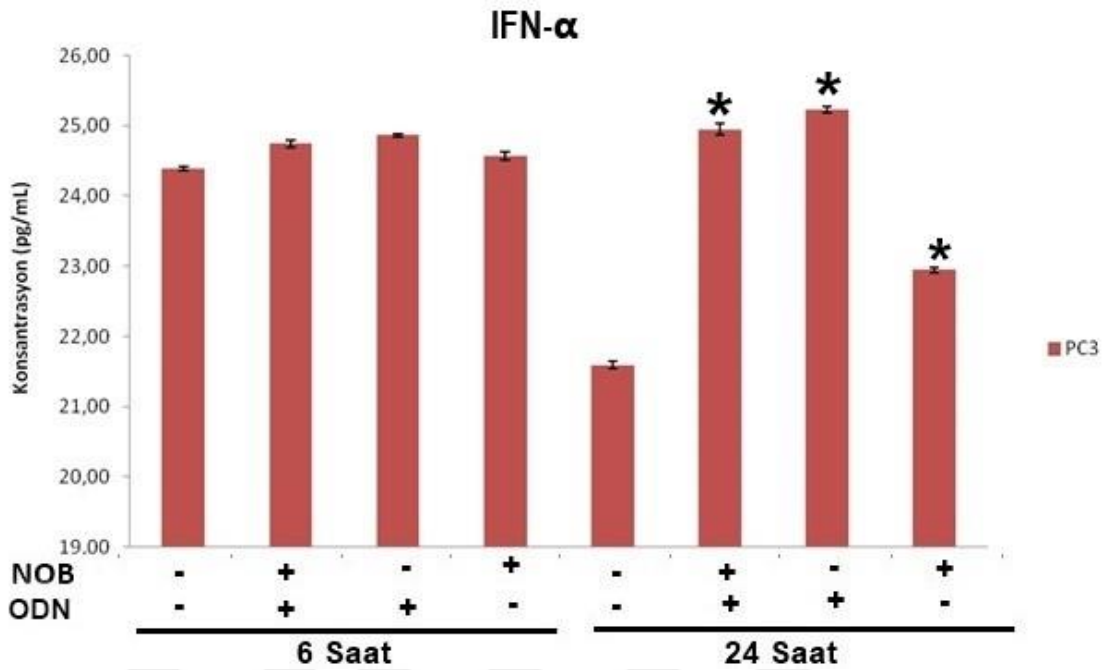
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- α miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, HUVEC hücrelerine NOB ve LPS’nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucu IFN- α miktarı azalırken, 24 saat süresince olan uygulamalarda ise IFN- α miktarlarının arttığı belirlenmiştir. NOB’un tek başına 6 saat uygulanması sonucu olan IFN- α miktarı azalışı ve 24 saat boyunca uygulanmasındaki IFN- α miktarı artışı ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

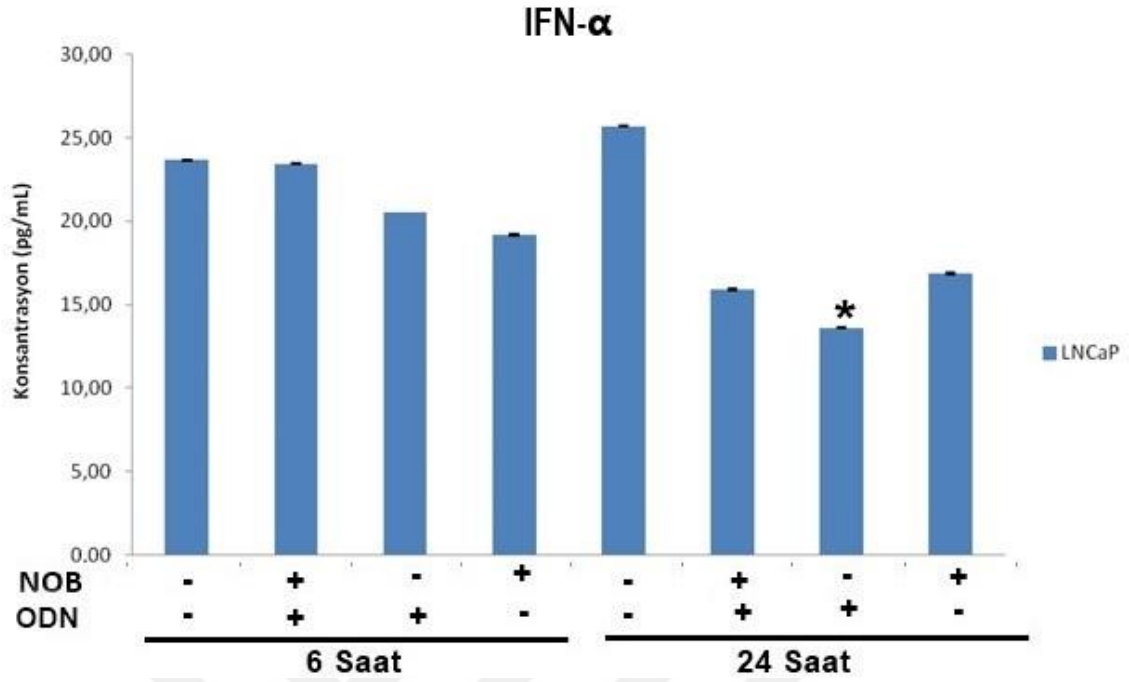
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- α miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, NOB ve ODN'nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede değişmemiştir ($p>0,05$). Ancak, NOB ve ODN'nin tek başlarına ve birlikte 24 saat uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

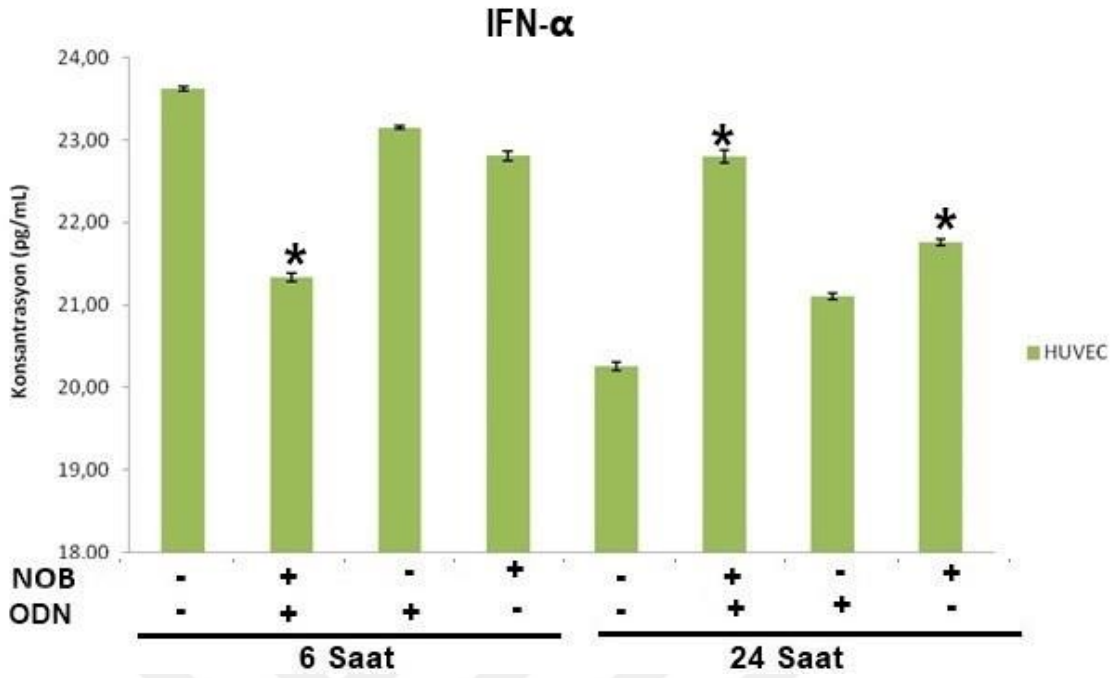
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- α miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. LNCaP hücrelerine NOB (20 µM) ve/veya CpG-ODN (5 µM) uygulamalarının IFN-α miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.14'te görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, NOB ve ODN'nin tek başlarına ve birlikte 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol gruplarına göre IFN-α miktarı genel olarak azalırken, ODN'nin tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN-α miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

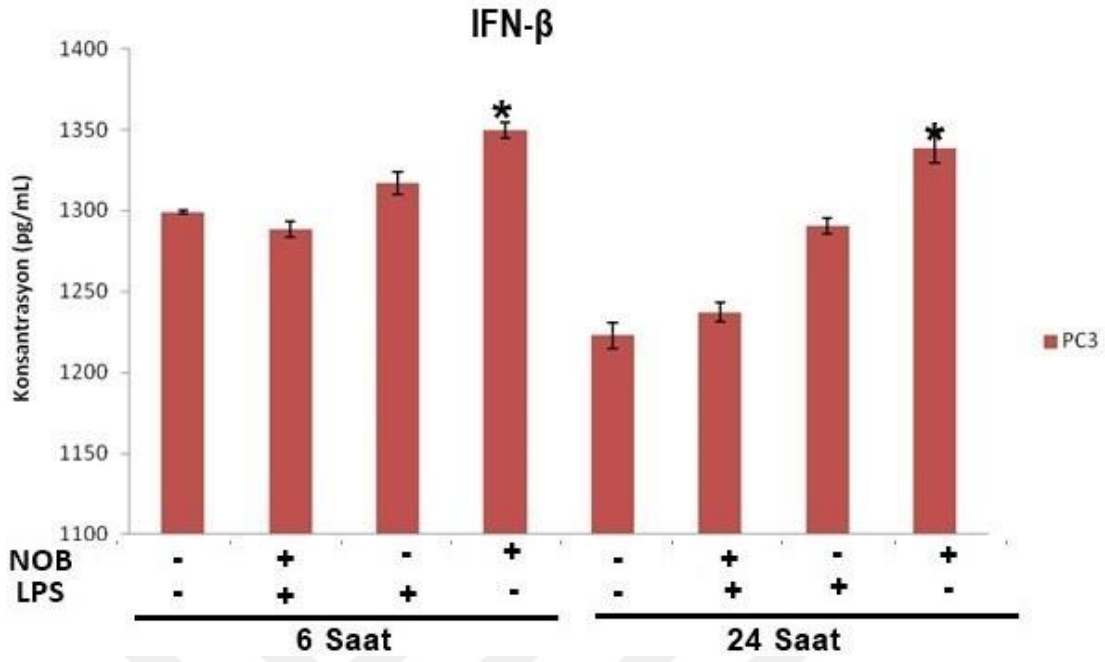
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN-α miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının IFN- α miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine; NOB ve ODN'nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarı genel olarak azalmıştır. Fakat ODN/NOB'un birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). NOB ve ODN'nin tek başlarına ve birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarı genel olarak artmıştır. NOB'un tek başına ve ODN/NOB'un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- α miktarındaki artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

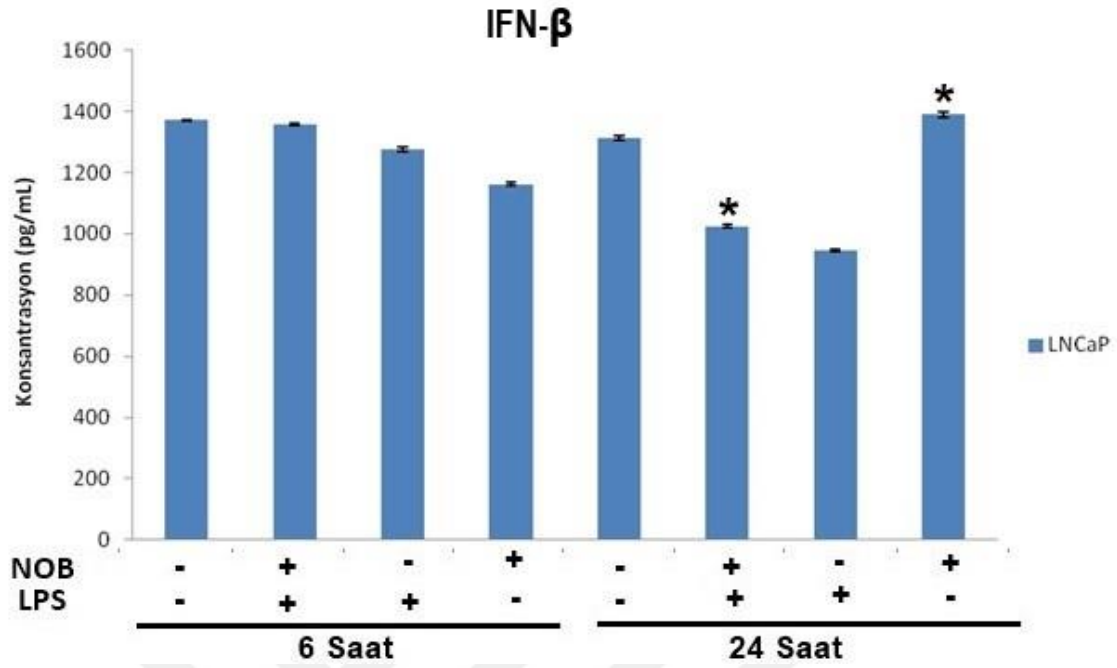
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- β miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, NOB ve LPS’nin tek başlarına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı artarken, NOB’un tek başına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

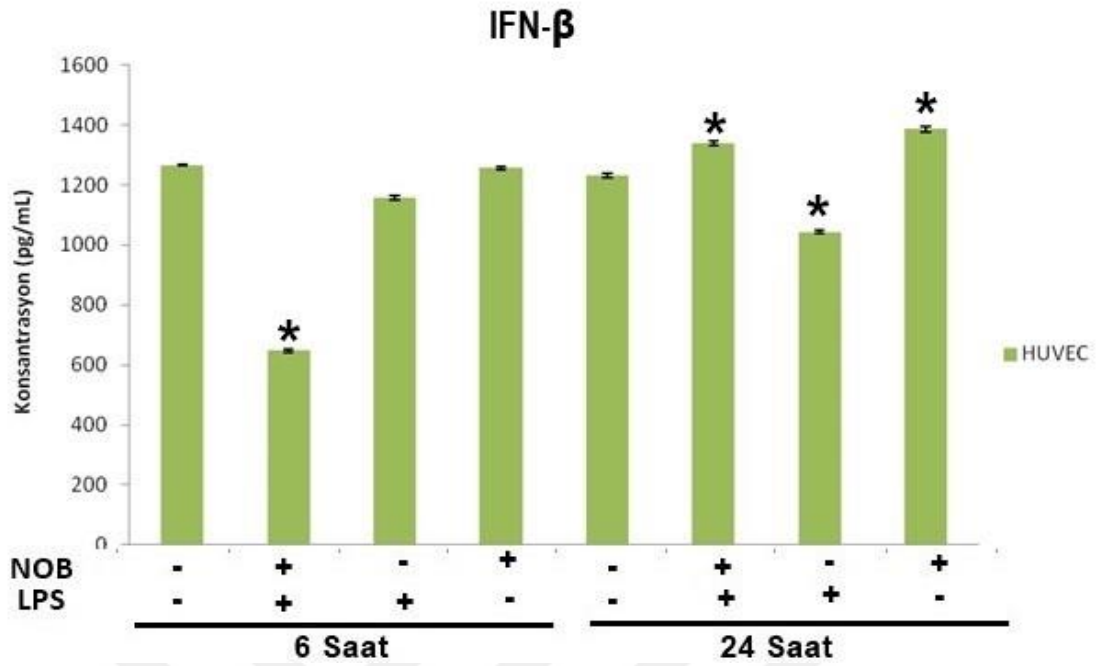
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- β miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine; NOB’un tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede bir değişim olmamıştır ($p > 0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). LPS/NOB’un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

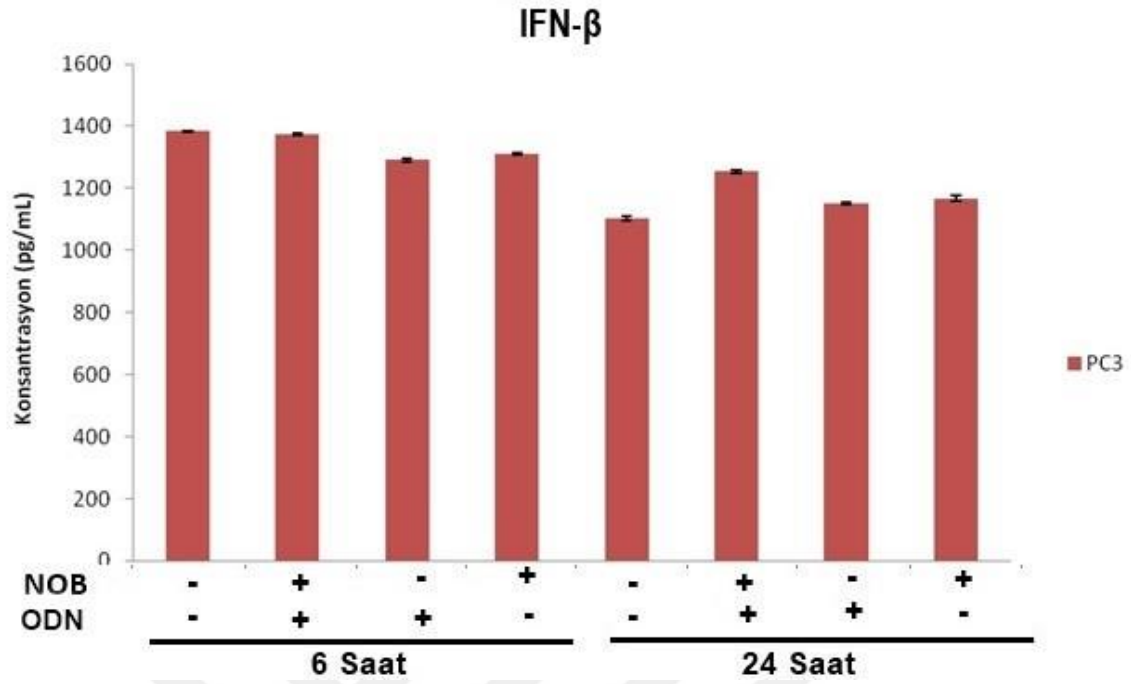
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- β miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.18’de görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, LPS/NOB’un birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). NOB’un tek başına ve LPS/NOB’un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). LPS’nin tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

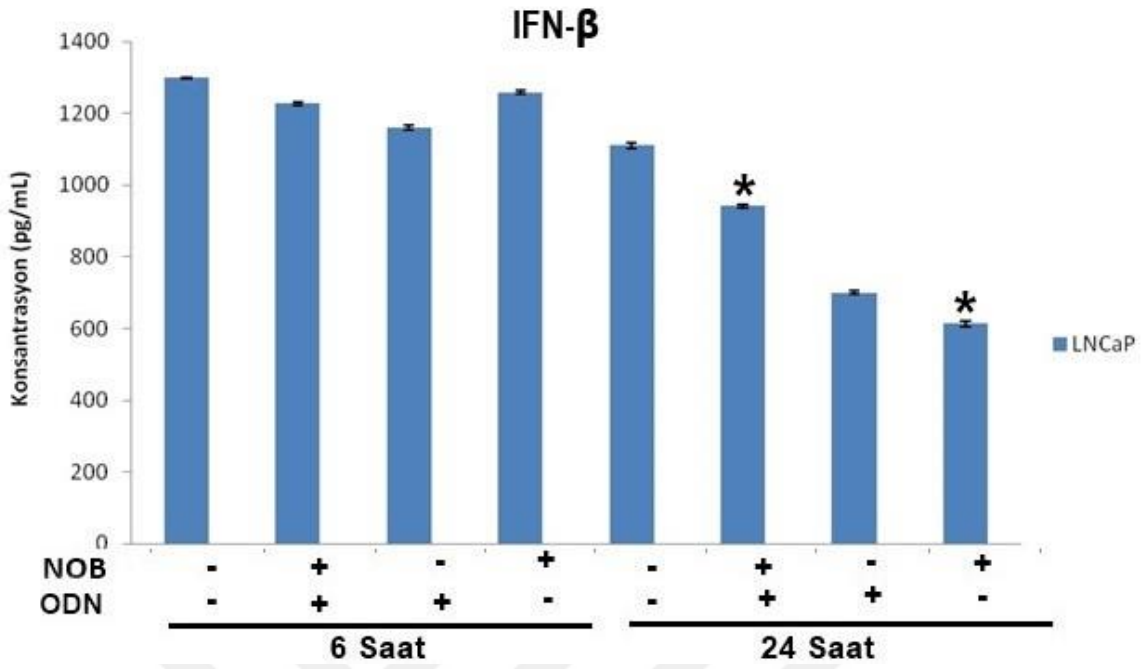
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- β miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi (ODN: oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.19’da görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerinden elde edilen verilere baktığımızda; ODN/NOB’un tek başlarına ve birlikte 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede bir değişim göstermemiştir ($p>0,05$).

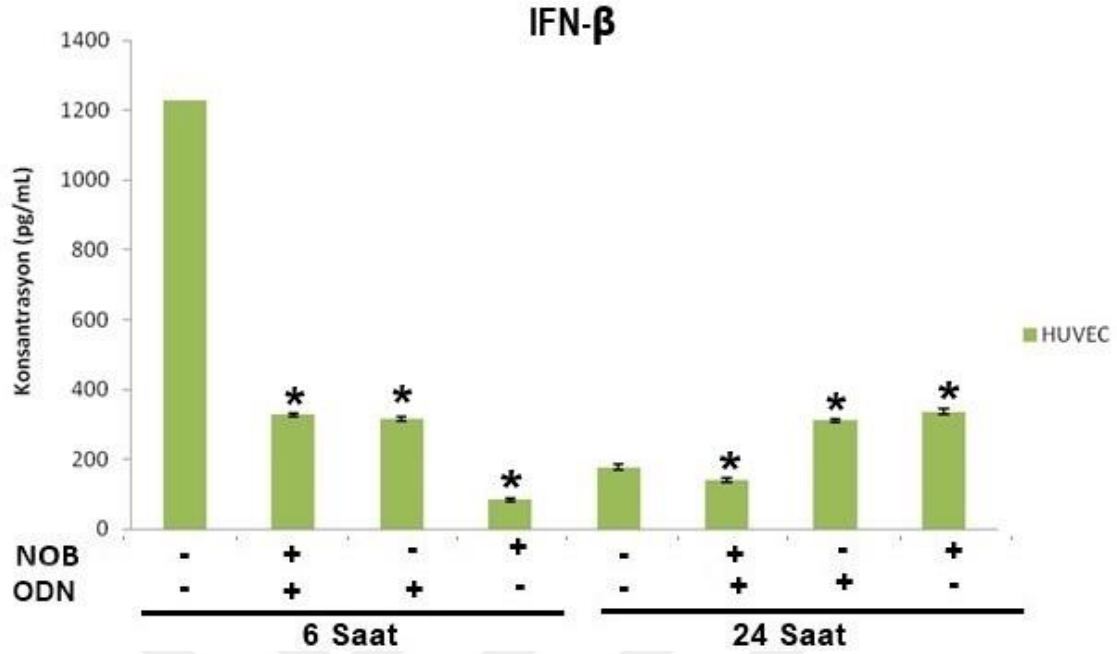
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- β miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.20’de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, ODN ve NOB’un birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarındaki istatistiksel değişiklik anlamlı bulunmazken, 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki IFN- β miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.21).



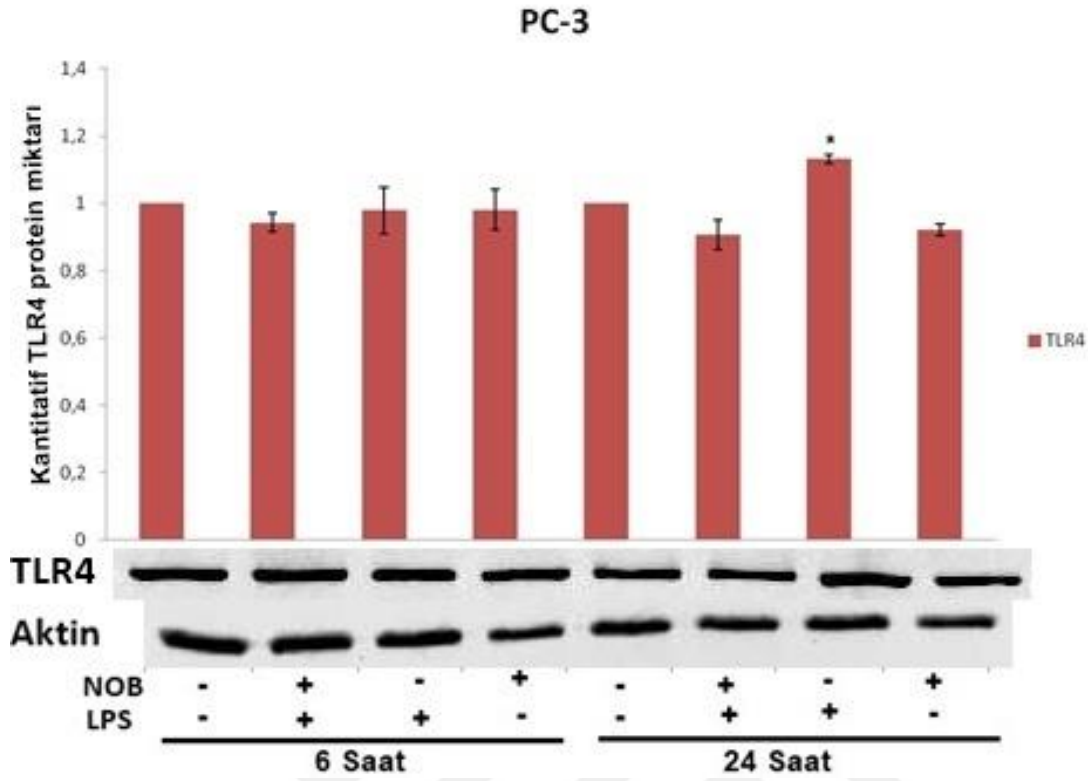
Şekil 4.21. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının IFN- β miktarı üzerine etkisi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.21’de görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, ODN ve NOB’un tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). ODN ve NOB’un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IFN- β miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Ancak NOB ve ODN’nin tek başına 24 saat uygulanması sonucunda IFN- β miktarı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

4.4. Western Blotlama Analizi Bulguları

Protein düzeylerinde meydana gelen değişimleri karşılaştırabilmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve sonrasında da western blotting uygulamaları yapılmıştır (Şekil 4.22 - Şekil 4.33).

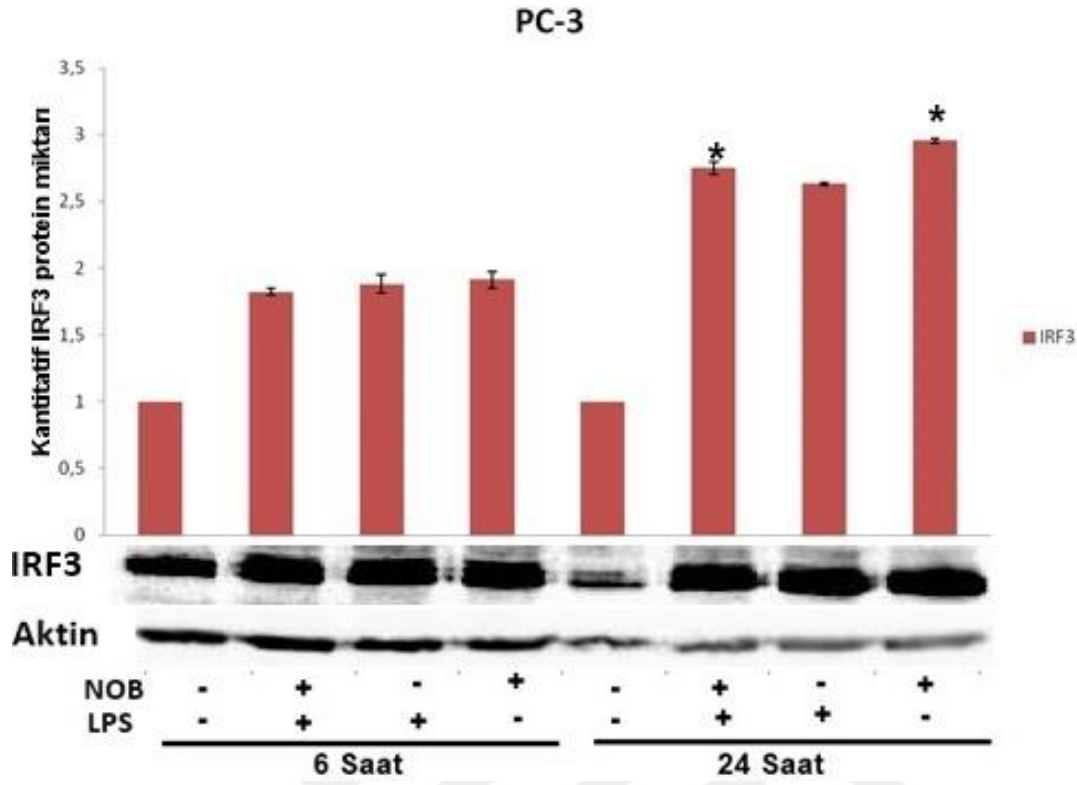
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda hücrelerdeki kantitatif TLR4 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif TLR4 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.22’de görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, NOB ve LPS’nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede değişmezken ($p > 0,05$), LPS’nin tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

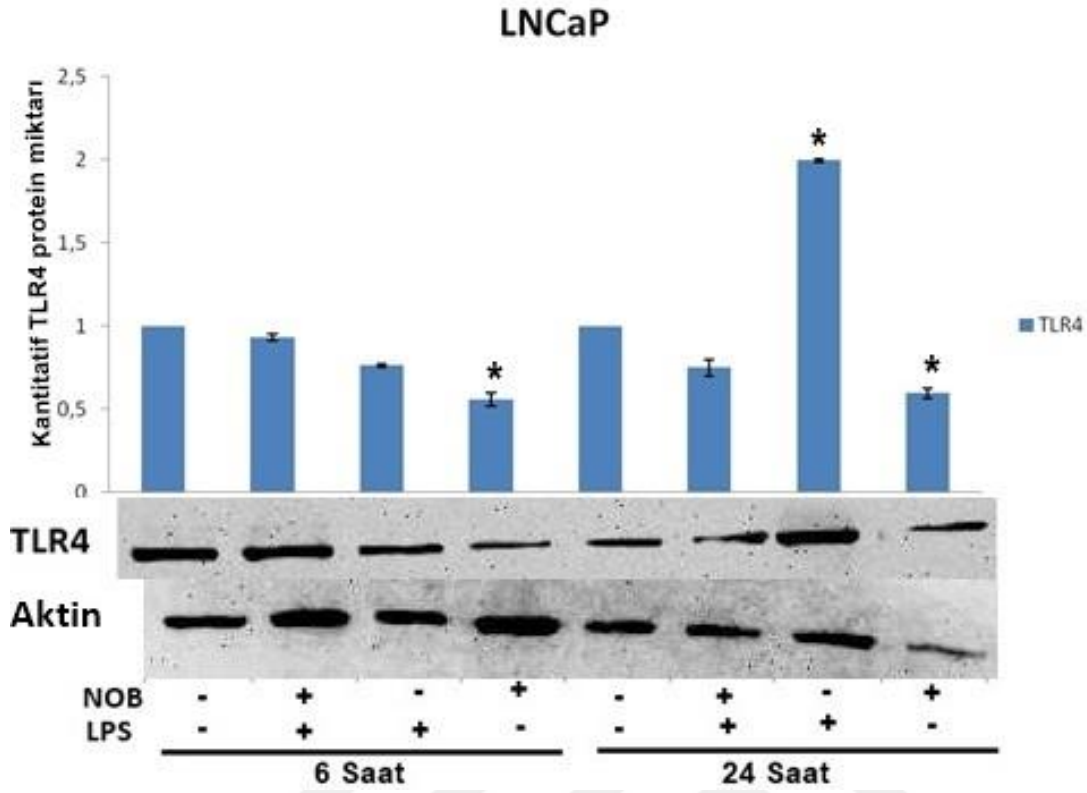
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda hücrelerdeki kantitatif IRF3 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif IRF3 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine NOB ve LPS'nin tek başlarına ve birlikte 6 ve uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF3 protein miktarının arttığı belirlenmiştir, ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). NOB'un tek başına ve LPS ile birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF3 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

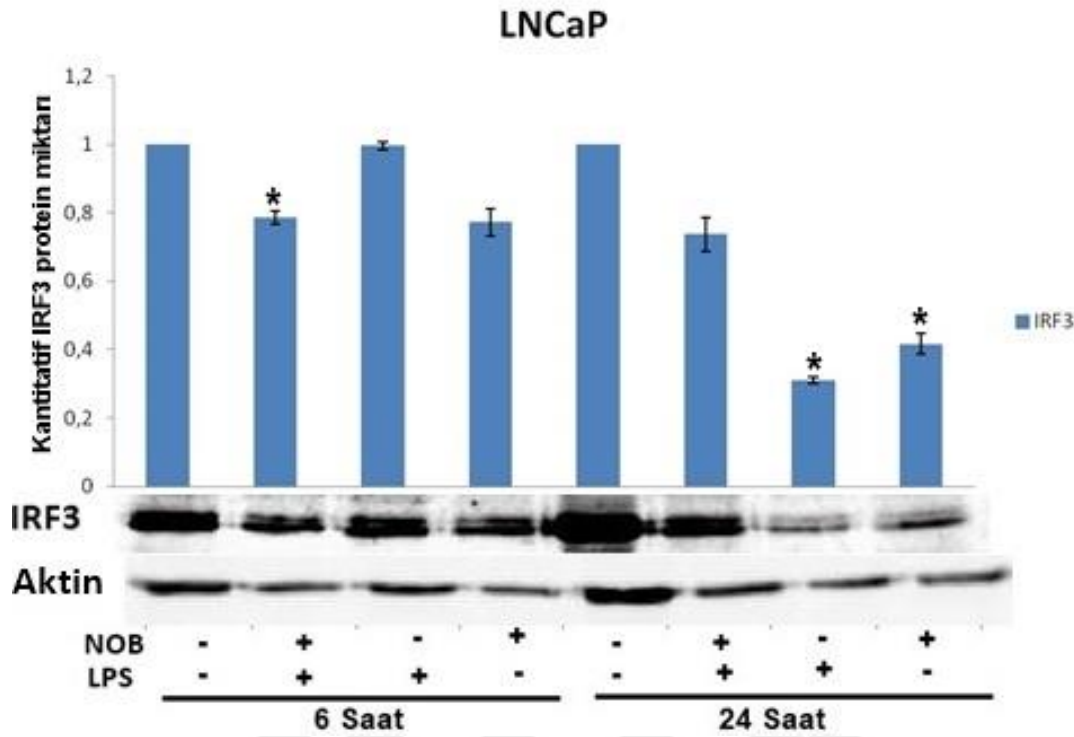
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif TLR4 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif TLR4 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok (NOB ve LPS olmayan grup kontrol grubudur), *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.24'te görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, NOB ve LPS'nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 protein miktarı genel olarak azalırken, NOB'un tek başına uygulanmasının anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca LPS'nin tek başına uygulanması TLR4 protein miktarını attırmış, NOB'un tek başına uygulanması ise TLR4 protein miktarını azaltmıştır. Bu uygulamaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. ($p<0,05$).

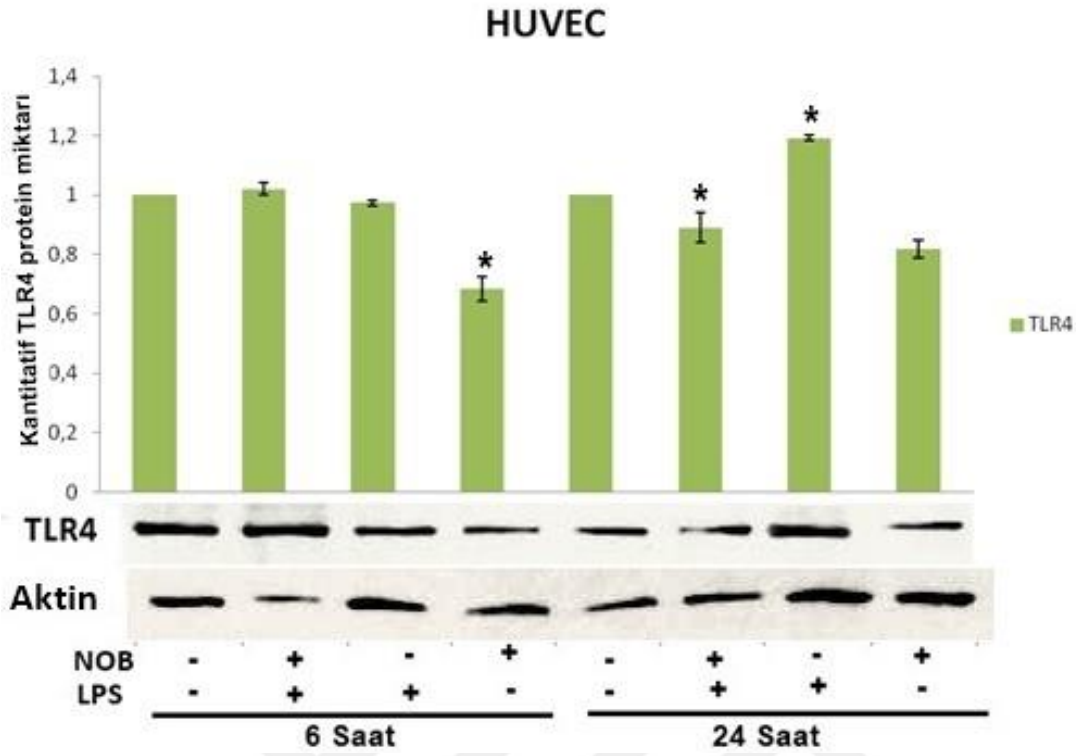
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif IRF3 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif IRF3 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok (NOB ve LPS olmayan grup kontrol grubudur), *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.25'te görüldüğü gibi, LNCaP hücre hattında, NOB ve LPS'in birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF3 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca NOB ve LPS'in tek başlarına uygulanmaları sonucunda TLR4 protein miktarının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$).

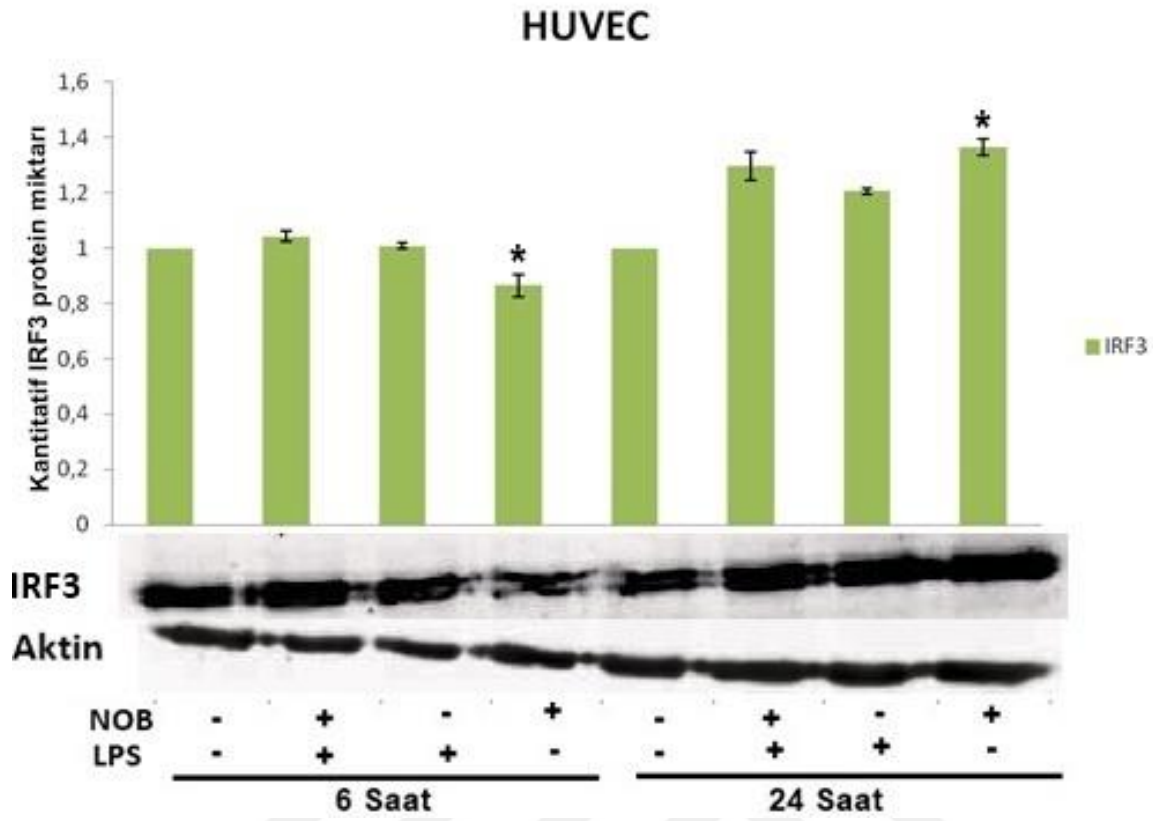
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif TLR4 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif TLR4 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.26’da görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, NOB’un tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR4 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca LPS’nin tek başına uygulanması TLR4 protein miktarını azaltmış, NOB ile birlikte uygulandığında ise TLR4 protein miktarını arttırmıştır. Bu uygulamaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. ($p < 0,05$).

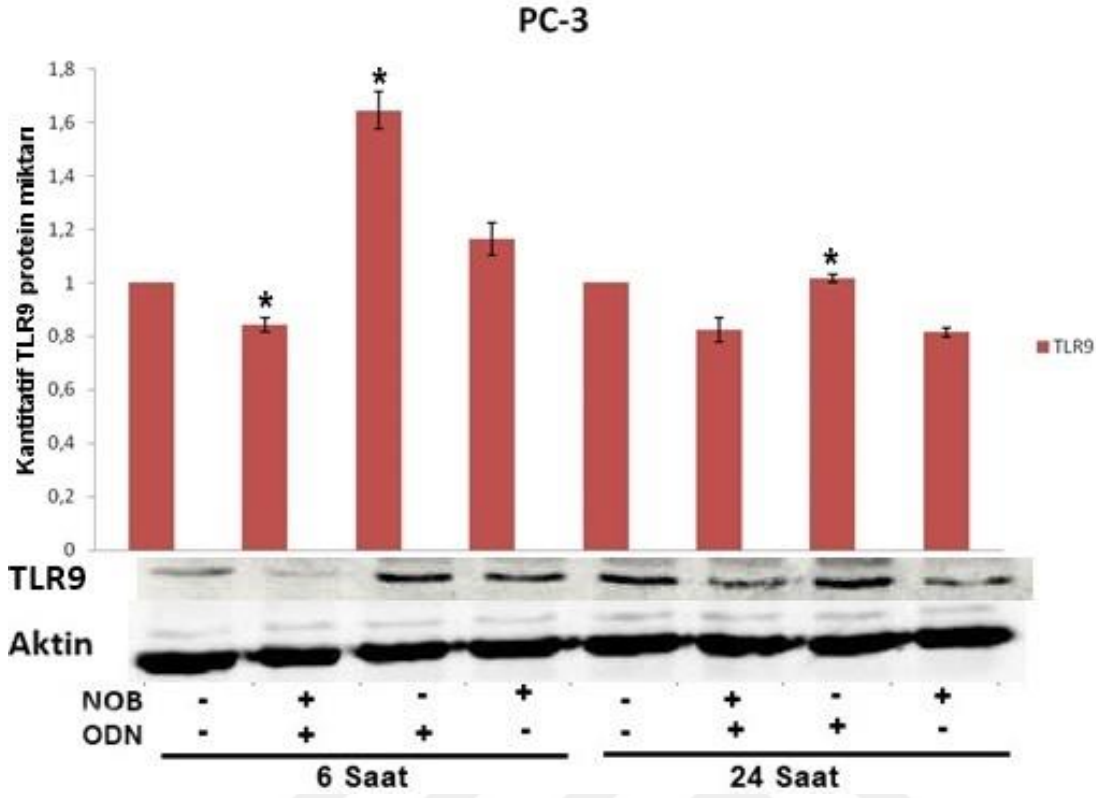
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif IRF3 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif IRF3 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.27’de görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, NOB’un tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF3 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca LPS ve NOB’un tek başlarına ve birlikte uygulanması sonucunda IRF3 protein miktarı genel olarak artmıştır, NOB’un tek başına uygulanması sonucunda ise IRF3 protein miktarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

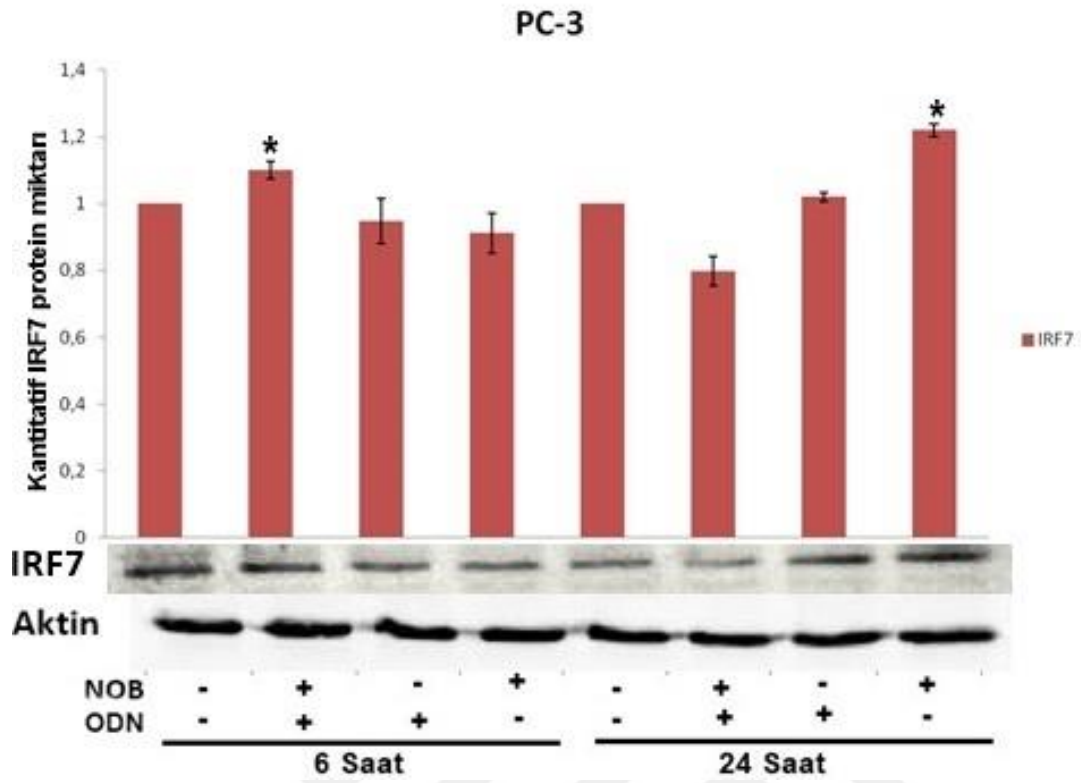
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif TLR4 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif TLR9 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.28’de görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, ODN’nin tek başına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). NOB/ODN’nin 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 protein miktarı azalmıştır ($p < 0,05$).

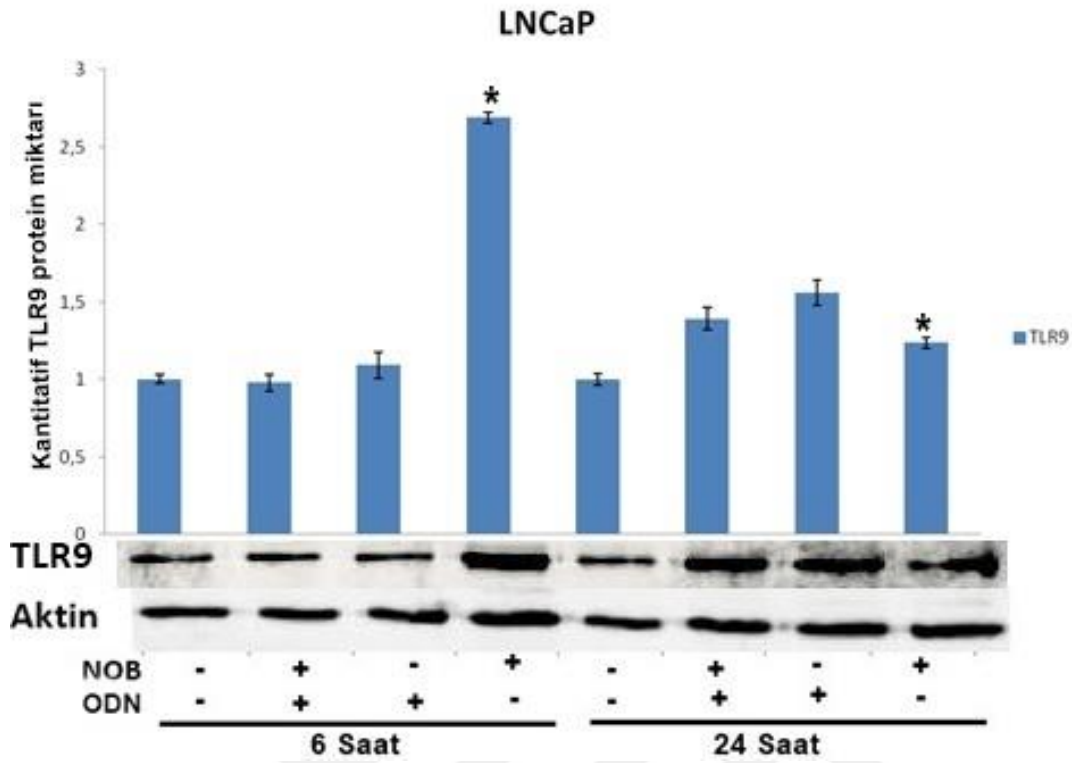
PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif IRF7 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif IRF7 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.29’da görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine NOB/ODN’nin birlikte 6 saat boyunca uygulanması sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IRF7 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF7 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

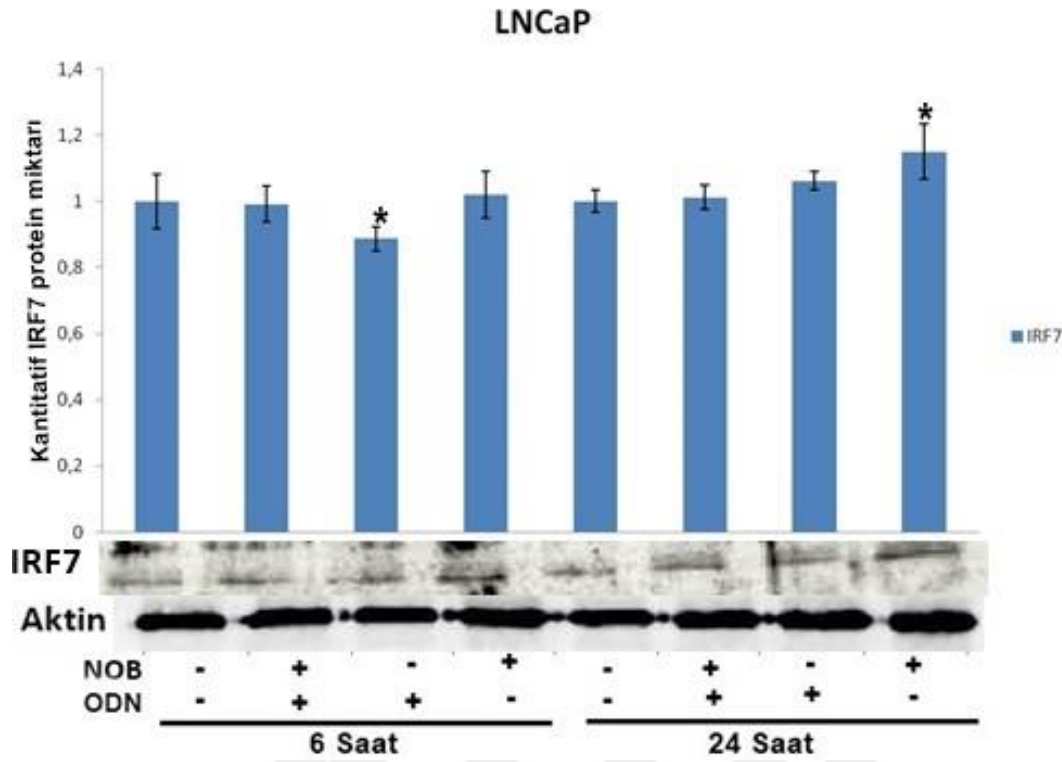
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif TLR9 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif TLR9 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.30’da görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, NOB’un tek başına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca ODN’nin tek başına ve NOB ile birlikte uygulanması sonucunda TLR9 protein miktarı artmıştır, ancak bu uygulamaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$).

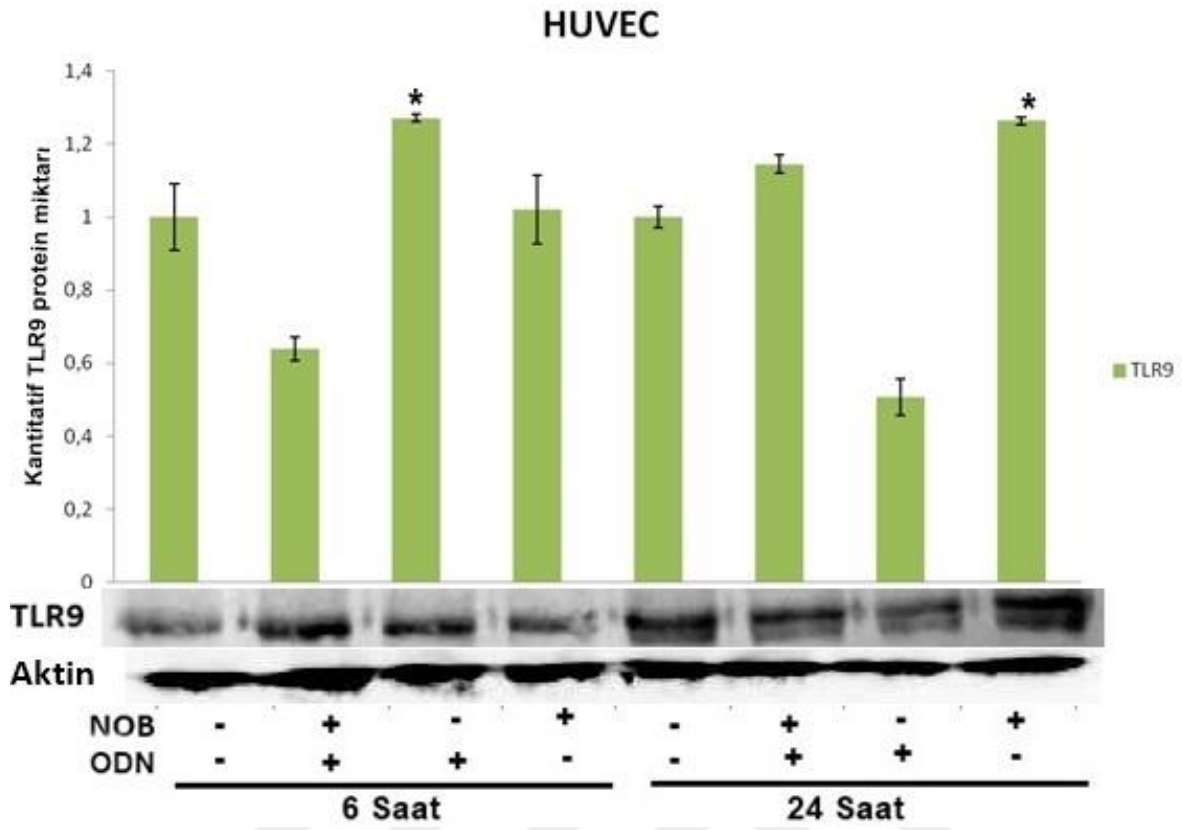
LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonucunda hücrelerdeki kantitatif IRF7 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif IRF7 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.31’de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, ODN’nin tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF7 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p < 0,05$), NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF7 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

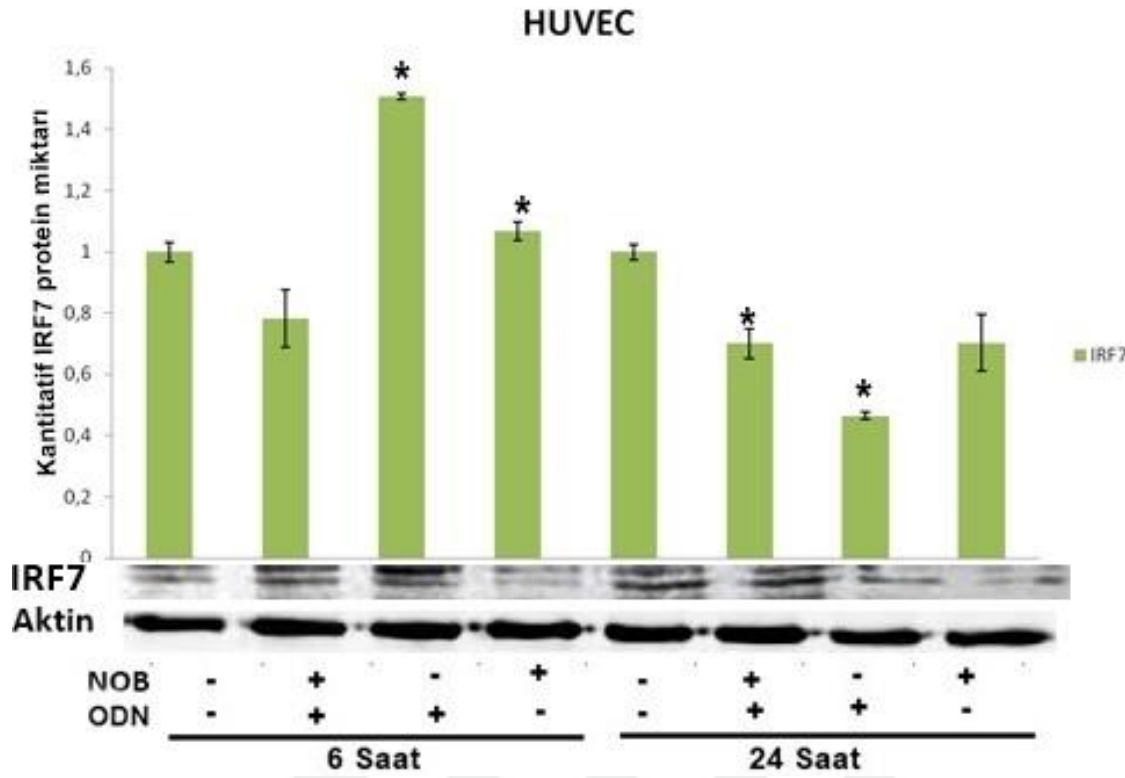
HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonrasında hücrelerdeki TLR9 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif TLR9 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.32’de görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, ODN’nin tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken ($p < 0,05$), 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 protein miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre TLR9 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulaması sonrasında hücrelerdeki IRF7 protein düzeyi belirlenmiştir (Şekil 4.33).



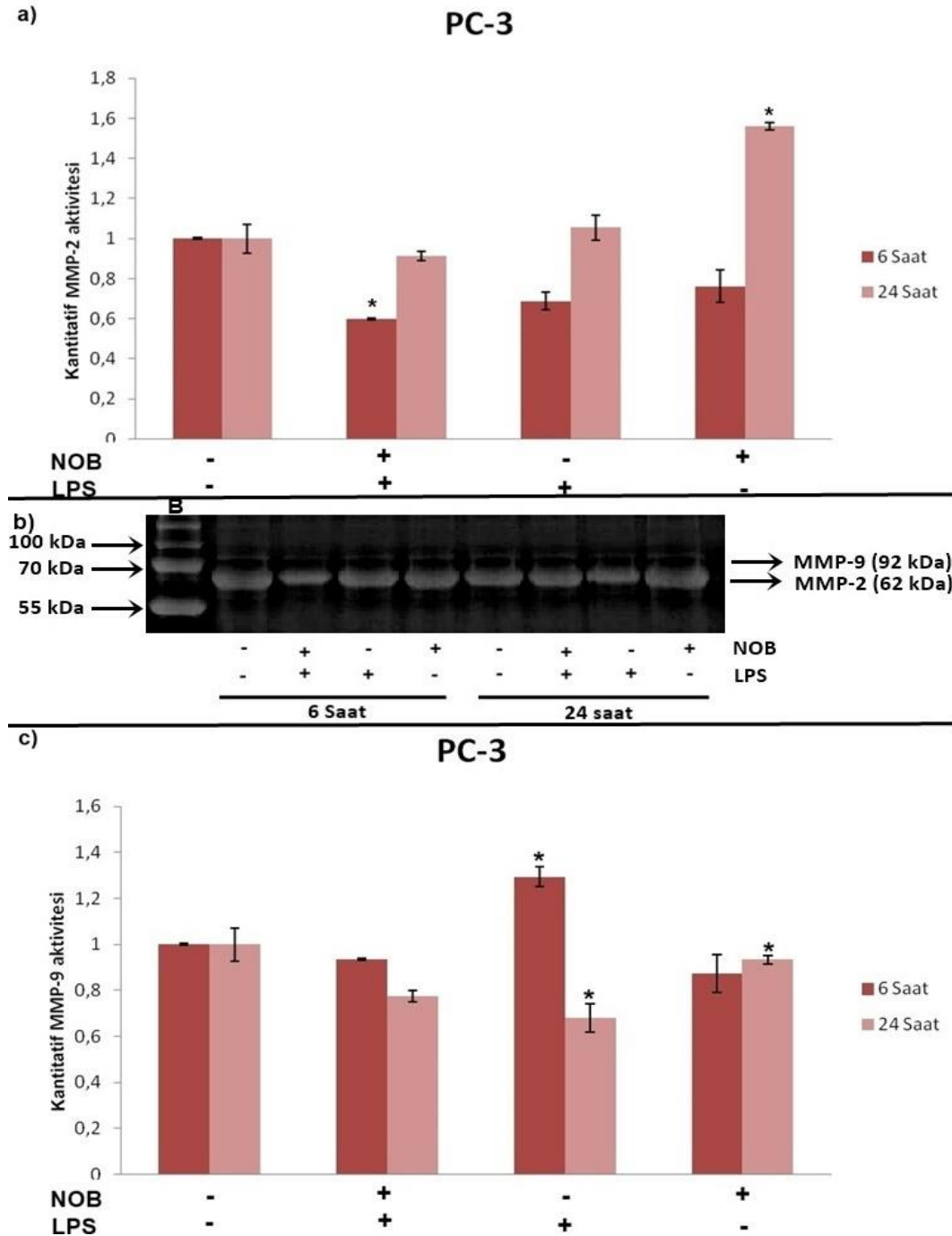
Şekil 4.33. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulanması sonucunda kantitatif IRF7 protein miktarı ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.33'te görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, ODN ve NOB'un 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF7 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken ($p < 0,05$), birlikte uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre IRF7 protein miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca ODN'nin tek başına ve NOB ile birlikte uygulanması sonucunda IRF7 protein miktarının azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

4.5. Jelatin Zimografi Bulguları

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerine NOB ve/veya ligand 6 ve 24 saat olmak üzere uygulanmış ve sonrasında hücrelerin kültür üst sıvısında belirlenen matriks metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) jelatinaz aktiviteleri jelatin zimografi yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 4.34–Şekil 4.49).

PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.34)

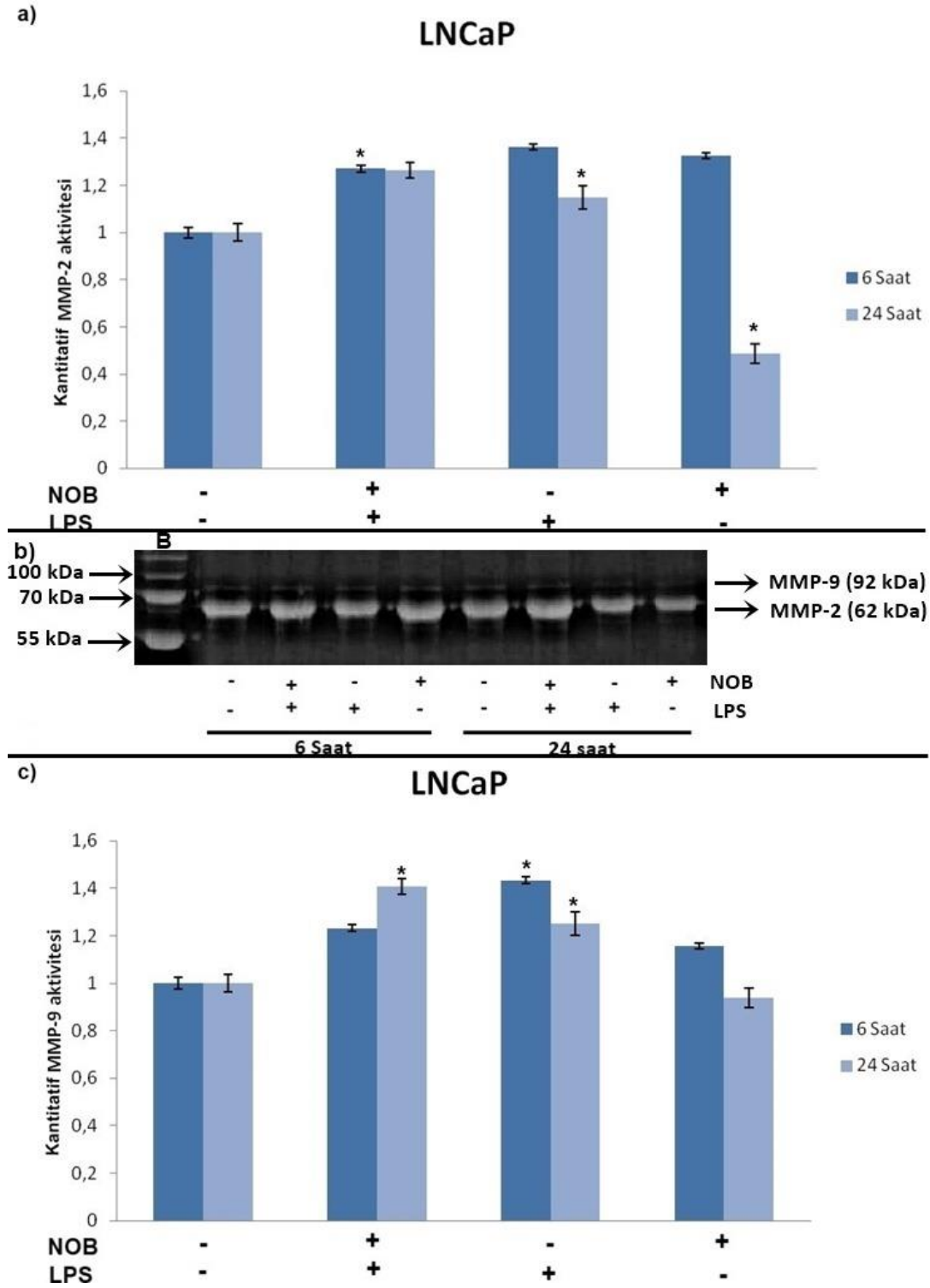


Şekil 4.34. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri ve zimografi jel görüntüleri a) Kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi, b) Jelatin zimografi jel görüntüsü, c) Kantitatif MMP-9 enzim aktivitesi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, B: Belirteç, kDa; kilodalton, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.34a’da görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, LPS/NOB’un birlikte 6 saat uygulanması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesindeki artış anlamlı bulunurken ($p<0,05$), 6 saat uygulanması sonucu MMP-2 enzim aktivitesinde gerçekleşen azalma anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Şekil 4.34c’de görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, LPS’nin tek başına 6 saat uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken ($p<0,05$), 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesindeki azalma anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulaması kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,05$).

LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.35).

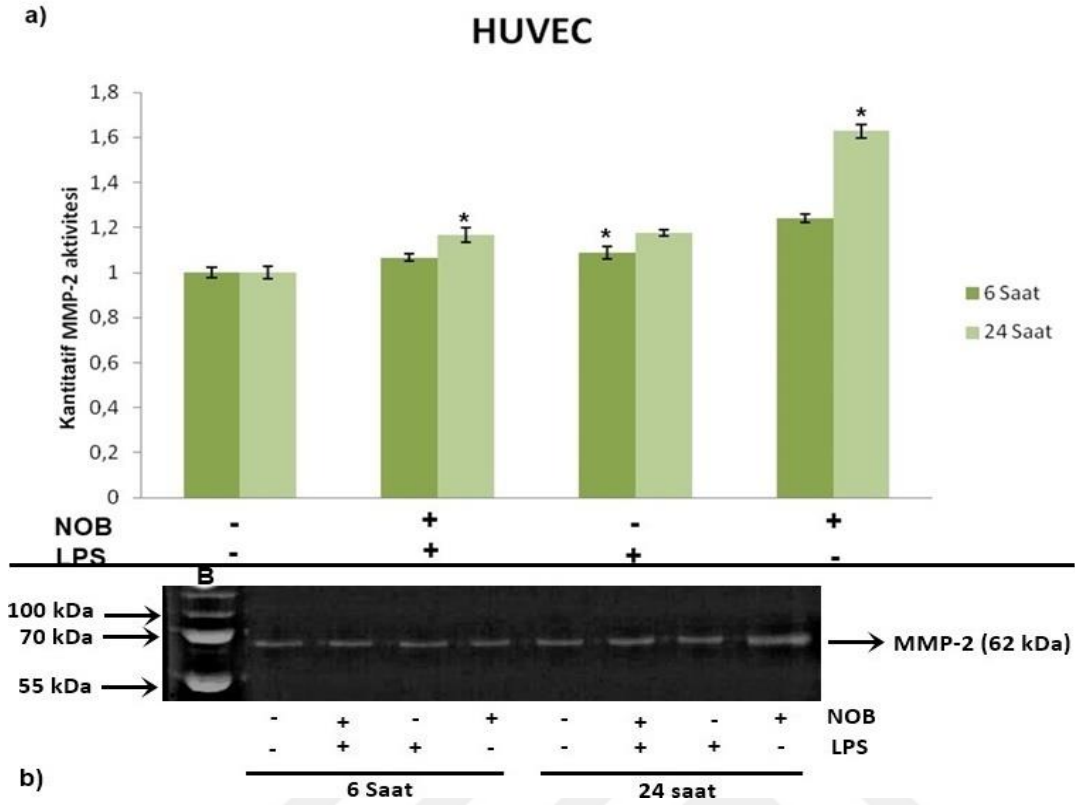


Şekil 4.35. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri ve zimografi jel görüntüleri a) Kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi, b) Jelatin zimografi jel görüntüsü, c) Kantitatif MMP-9 enzim aktivitesi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, B: Belirteç, kDa; kilodalton, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.35a'da görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, NOB ve LPS'nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre genel olarak artmış, ancak sadece NOB/LPS birlikte uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca LPS ve NOB'un tek başlarına olan uygulamasında MMP-2 enzim aktivitesi anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).

Şekil 4.35c'de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, LPS'nin tek başına 6 ve 24 saat uygulanması ile NOB/LPS'nin birlikte 24 saat uygulanması sonucunda MMP-9 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya LPS uygulanması sonucunda kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.36).

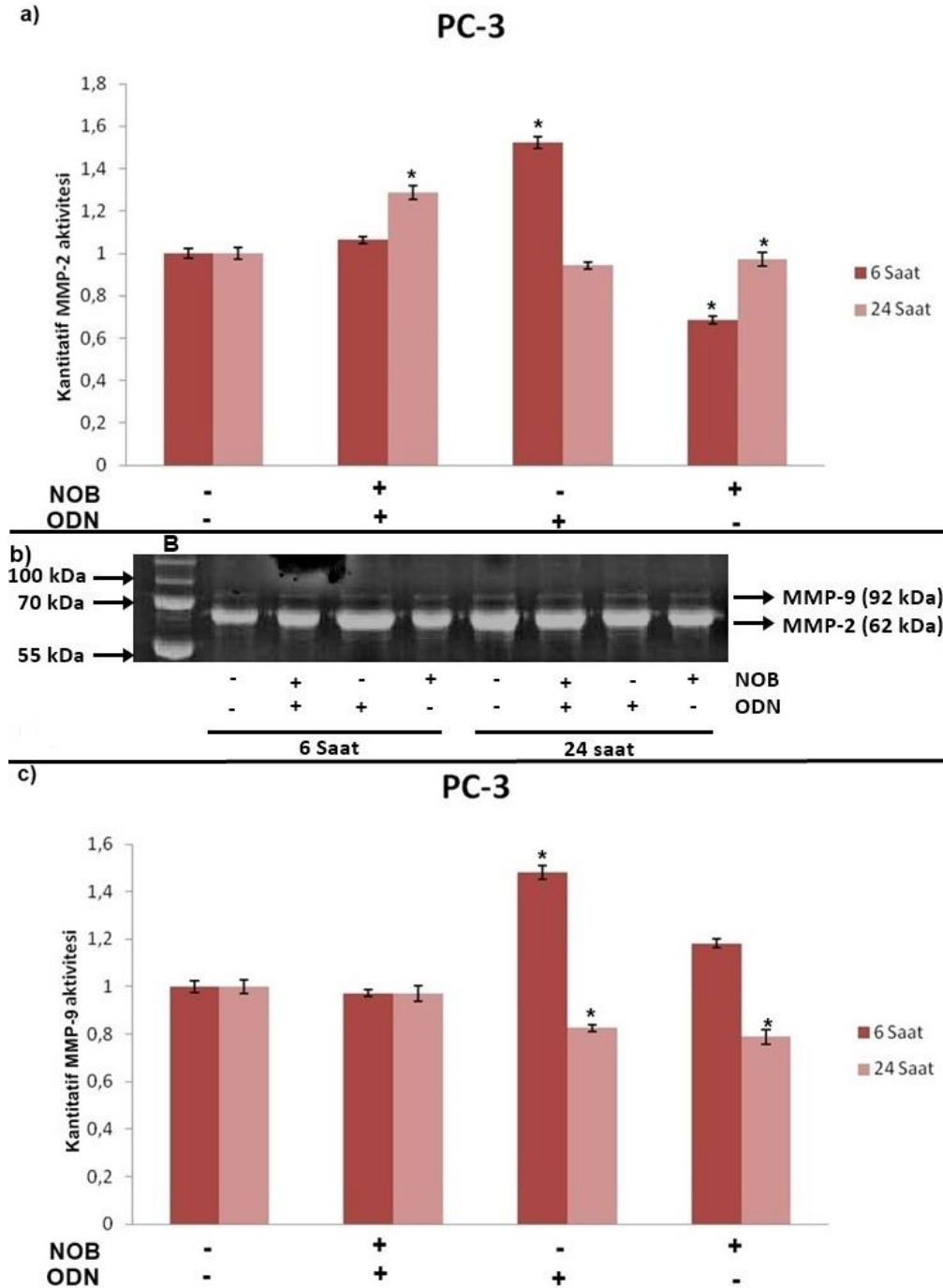


Şekil 4.36. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya LPS (5 μ M) uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkisi ve zimografi jel görüntüsü a) Kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi, b) Jelatin zimografi jel görüntüsü c) Kantitatif MMP-9 enzim aktivitesi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, B: Belirteç, kDa; kilodalton, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve LPS – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.36a’da görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, NOB ve LPS’nin tek başlarına ve birlikte 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre genel olarak artarken, NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesindeki artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca LPS/NOB’un birlikte 24 saat uygulanması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,05$). Bununla birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 saat süresince LPS’nin tek başına uygulanması sonucunda da MMP-2 enzim aktivitesindeki artış anlamlıdır ($p < 0,05$).

HUVEC hücrelerine NOB ve LPS tek başlarına ve birlikte uygulandığında, MMP-9 enzim aktivitesi gözlenmemiştir, ayrıca kontrol grubunda da MMP-9 enzim aktivitesi gözlenmemiştir.

PC-3 hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.37).

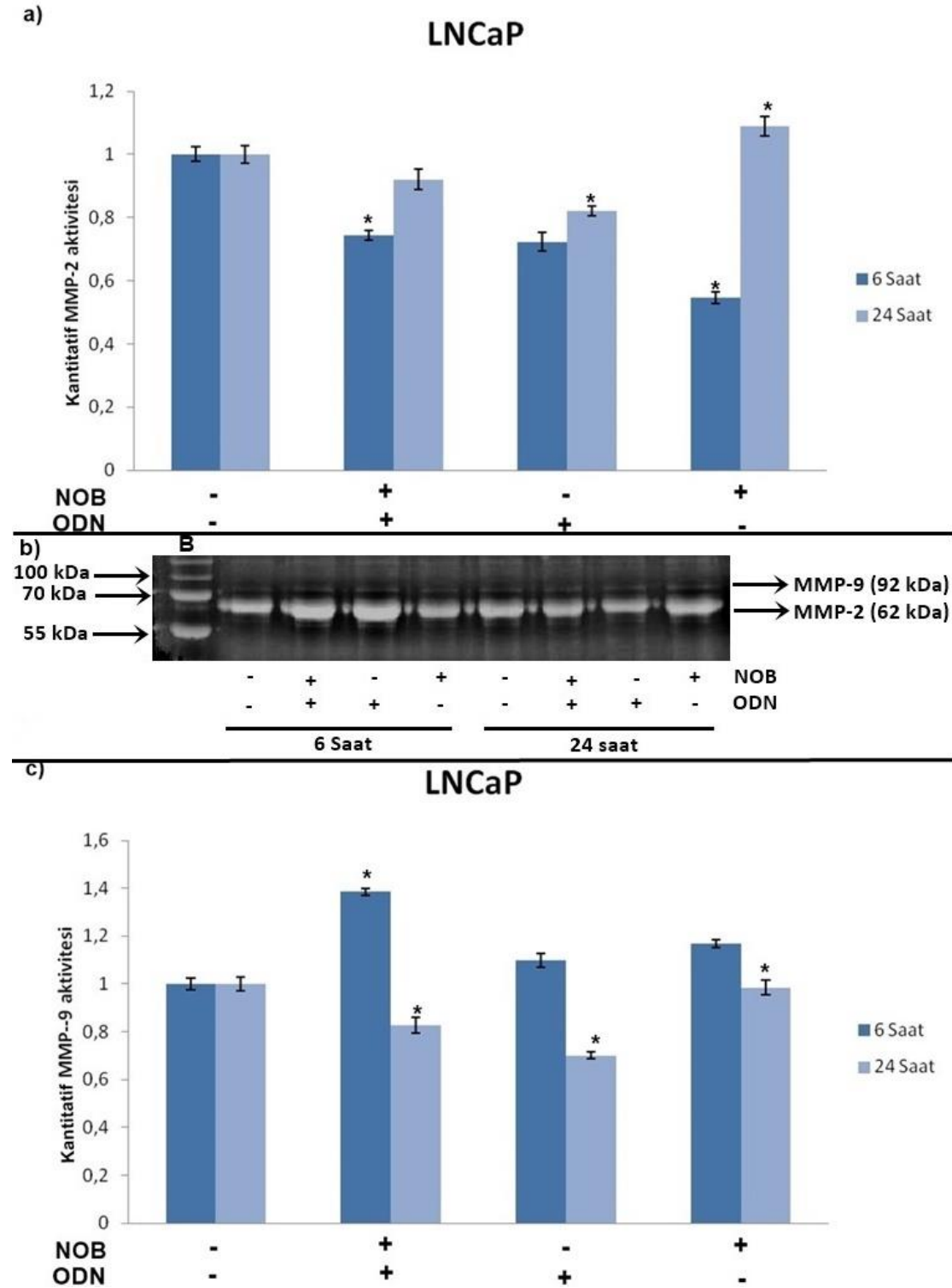


Şekil 4.37. PC-3 hücrelerine NOB (40 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri üzerine etkisi ve zimografi jel görüntüleri a) Kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi, b) Jelatin zimografi jel görüntüsü c) Kantitatif MMP-9 enzim aktivitesi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, B: Belirteç, kDa; kilodalton, NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.37a'da görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, NOB'un tek başına 6 ve 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p<0,05$), ODN'nin tek başına 6 saat uygulanması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesindeki artış anlamlıdır ($p<0,05$). NOB ve ODN'nin birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

Şekil 4.37c'de görüldüğü gibi, PC-3 hücrelerine, ODN'nin tek başına 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken ($p<0,05$), 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesi anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). NOB'un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

LNCaP hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.38).

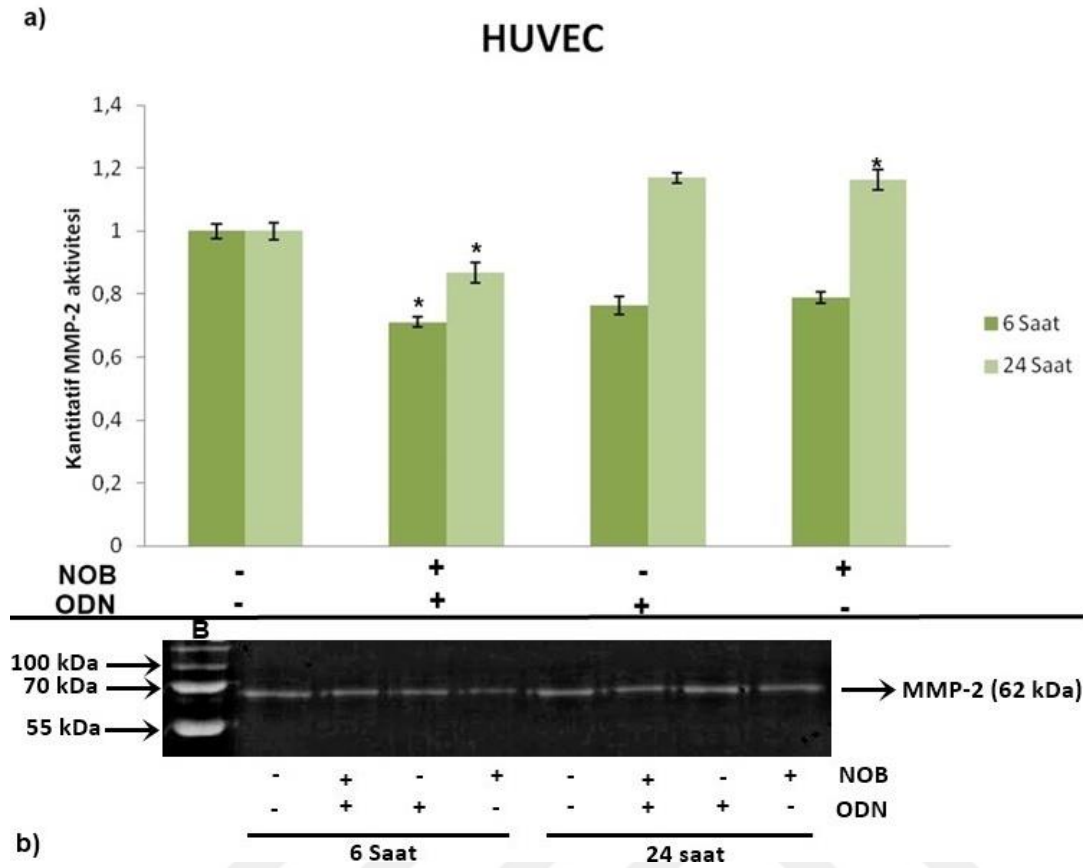


Şekil 4.38. LNCaP hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının MMP-2 ve MMP-9 enzim aktiviteleri üzerine etkisi ve zimografi jel görüntüleri a) Kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi, b) Jelatin zimografi jel görüntüsü c) Kantitatif MMP-9 enzim aktivitesi (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, B: Belirteç, kDa; kilodalton, NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.38a’da görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, ODN’nin tek başına 24 saat süresince uygulanması ve NOB ile ODN’nin birlikte ve tek başına 6 saat uygulanmaları sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesi anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

Şekil 4.38c’de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerine, ODN ve NOB’un tek başlarına ve birlikte 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). NOB/ODN’nin birlikte 6 saat uygulanması sonucunda ise kontrol grubuna göre MMP-9 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

HUVEC hücrelerine 6 ve 24 saat NOB ve/veya ODN uygulanması sonucunda kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. HUVEC hücrelerine NOB (20 μ M) ve/veya CpG-ODN (5 μ M) uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi üzerine etkisi ve zimografi jel görüntüsü a) Kantitatif MMP-2 enzim aktivitesi, b) Jelatin zimografi jel görüntüsü (*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, B: Belirteç, kDa; kilodalton, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, NOB – ve ODN – olan grup kontrol grubudur)

Şekil 4.39a’da görüldüğü gibi, HUVEC hücrelerine, NOB ve ODN’nin tek başlarına ve birlikte 6 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesi genel olarak azalmıştır ancak sadece NOB/ODN’nin birlikte uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). NOB’un tek başına 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre MMP-2 enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$). Ancak, aynı sürede NOB/ODN’nin birlikte uygulama sonucunda ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MMP-2 enzim aktivitesi anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$).

HUVEC hücrelerine NOB ve ODN tek başlarına ve birlikte uygulandığında, MMP-9 enzim aktivitesi gözlenmemiştir, ayrıca kontrol grubunda da MMP-9 enzim aktivitesi gözlenmemiştir.



5. TARTIŞMA

Çalışmamızda prostat kanseri üzerinde NOB'un etkisini araştırmak üzere, prostat kanseri hücreleri olarak LNCaP (p53 işlevsel, AR-bağımlı), PC-3 (p53 null, AR-bağımsız) ve kontrol hücresi olarak HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücreleri) kullanılmıştır. Androjen Reseptörü (AR) prostat kanserinin bütün süreçlerinde merkezi rol oynamaktadır. Özellikle birkaç sinyal iletim yolağı ve bu yolakların AR sinyal iletim yolu ile etkileşimlerinin prostat kanserinin ileri aşamalarında önemli rol oynadığı belirtilmiştir. (Heinlein ve Chang, 2004; Kaarbø ve diğerleri, 2007). Bu nedenle deneylerimizde kullanılacak olan prostat kanseri hücreleri seçilirken AR-bağımlı ve AR-bağımsız olması dikkate alınmış ve böylelikle NOB'un prostat kanseri hücreleri üzerine etkisinde AR'nin rolünün de değerlendirilmesine olanak sağlanmıştır. Ayrıca NOB'un etkisinin kanser hücrelerine özel olup olmadığını değerlendirebilmek için normal hücreler kullanılmış, böylelikle kanser olmayan hücreler üzerinde NOB'un nasıl bir etki gösterdiği belirlenebilmiştir.

TLR'ler kanseri de içine alan pek çok organda kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (El-Omar ve diğerleri, 2008). Yapılan son çalışmalarda prostat kanserini de içeren insan tümörlerinde TLR'lerin ifade edildiği belirlenmiş ve işlevsel rolleri ile ilgili karşıt görüşler öne sürülmüştür (Droemann ve diğerleri, 2005; Xie ve diğerleri, 2009; Schmausser ve diğerleri, 2005). Yapılan çalışmalar NOB'un anti-inflamatuar etkiye ve tümör invazyonunu, çoğalmasını ve metastazını engelleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Knekt ve diğerleri, 1997; Li ve diğerleri, 2006). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar TLR'ler üzerinde bulunan bu karşıt görüşün netleşmesine ve NOB'un kanser hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesine katkı sağlamıştır.

TLR'ler ligandlarına özgüdürler (Zhao ve diğerleri, 2014) ve bu özellikleri çalışmamızda ortama sadece o reseptöre özgü ligandı koyduğumuzda, sadece istediğimiz reseptörü uyararak, bu reseptörün başlattığı sinyal yolundaki değişiklikleri analiz etmemize olanak sağlamıştır. Analizlerde uygulama grupları oluşturulmuştur. TLR4 ve TLR9 ligandları (LPS ve ODN) tek başlarına uygulanmıştır. Anti-tümöral etkisi bilinen NOB'un nasıl bir etkisi olduğunu anlayabilmek için ligand ile birlikte NOB uygulaması da yapılmıştır. Ayrıca ligand uygulaması yapılmadan sadece NOB uygulanarak, NOB'un anti-tümöral etkisi belirlenmiştir.

NOB'un IC_{50} değeri belirlenirken, Chen ve diğerleri (2014) tarafından daha önce etkisi araştırılmış olan dozlar (0-5-10-20-40-80-160 μM) kullanılmıştır. Bu çalışma ile benzer sonuçlar elde edilerek prostat kanseri hücreleri için PC-3 hücreleri için 40 μM , LNCaP ve HUVEC hücreleri için 20 μM 'lık dozlar IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1a). HUVEC hücreleri üzerinde NOB'un IC_{50} değerini belirleme yönünde henüz herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle prostat kanseri hücreleri için kullanılan aynı doz aralığı bu hücreler için de denenmiş ve IC_{50} değerinin 40 μM olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.1a).

LPS ve ODN'nin hücre canlılığına etkisini görebilmek için aynı şekilde WST-1 testi ile Mukherjee ve diğerleri (2014) tarafından daha önce etkisi araştırılmış olan dozlar (1-5 μM) kullanılmıştır. Etkisi belirlenen bu dozlar içinden hücre canlılığına 5 μM 'lık dozun en az etkiyi gösteren optimal doz olduğu WST-1 testi ile belirlenmiş ve analizlerde ligand uygulaması LPS ve ODN'nin ikisi için de 5 μM olarak hücrelere uygulanmıştır (Bkz. Şekil 4.1b, Şekil 4.1c).

Çalışmamızda ligandları aracılığıyla aktifleşen reseptörlerin başlattığı sinyal yolunda en son basamakta bulunan IRF3, IRF7 ve reseptör proteinlerin (TLR4 ve TLR9) miktarları analiz edilerek sinyal yolağının aktif olup olmadığı belirlenmiştir. Sinyal yolağının son basamağında sentezi gerçekleşen interferonların ($IFN-\alpha$ ve $IFN-\beta$) miktar analizi gerçekleştirilerek NOB'un bu sitokinlerin miktarı üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca TLR4 ve TLR9 reseptör proteinlerini kodlayan genlerin ifade edilme düzeyleri belirlenmiştir. TLR4 ve TLR9 sinyal yolağının en son basamağında görevli IRF3 ve IRF7 transkripsiyon faktörlerinin yanında TLR4 ve TLR9 reseptör proteinlerinin miktarı analiz edilerek NOB'un bu sinyal yolları üzerine olan etkisi belirlenmiştir. Prostat kanseri metastazında ve invazyonunda önemli rol oynadığı düşünülen MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin miktarı belirlenerek NOB'un prostat kanseri metastazındaki rolü belirlenmiştir.

Çalışmamızda NOB'un TLR4 ve TLR9 sinyal yolları üzerindeki etkisi ilk defa değerlendirilmiştir. Literatürde sadece ligandın ya da anti-kanser etkisi olduğu düşünülen farklı maddelerin bu yollar üzerine olan etkileri ya da NOB'un farklı kanserler ile ilgili farklı sinyal yollarına olan etkisi araştırılmıştır. Ancak hem ligand hem de NOB'un aynı anda etkisinin ya da TLR4 ve TLR9 sinyal yolağı üzerine olan etkisinin araştırıldığı literatürde herhangi bir çalışma mevcut değildir. NOB ile yapılan çalışmalara

baktığımızda, Chen ve diğerleri (2014) prostat kanseri hücreleri olan PC-3 ve DU-145 hücrelerini kullanarak NOB'un AKT sinyal yolağı üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Ayrıca Chen ve diğerleri (2015), ovaryum kanseri hücreleri olan OVCAR-3 ve A2780/CP70 hücrelerini kullanarak NOB'un AKT sinyal yolağı üzerine olan etkisini de araştırmışlardır. Mukherjee ve diğerleri (2014)'nin yaptıkları çalışmada prostat kanseri hücreleri olan DU145, PC-3 ve LNCaP hücreleri üzerine yeşil çaydan elde edilen epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maddesinin çeşitli sitokin ve kemokinlerin ve matriks metalloproteinazlar üzerine olan etkisini araştırılmıştır. Miyata ve diğerleri (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, NOB'un HT-1080 hücrelerinde MEK aktivitesini direk olarak baskılayarak ERK'nin fosforilasyonunu düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca MMP ifdesini baskılayarak anti-tümöral metastatik aktivite gösterdiği ve natsudaidain ve heptamethoxyflavone gibi diğer limon flavoniodlerinin de HT-1080 hücrelerinde direkt olarak MEK aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir.

TLR4 ve TLR9'un LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde ifade edilmesinin tümör büyümesini durdurduğu bildirilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda TLR4 ifadesi PC-3 hücrelerinde NOB'un tek başına uygulanması sonucunda 6 saat uygulama sonucunda azalırken, LPS'nin tek başına uygulanması sonucunda artış göstermiştir (Bkz. Şekil 4.2 ve Şekil 4.5). Sellami ve diğerleri (2014)'nin yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. PC-3 hücrelerine ligandı ile uyarıldıktan sonra TLR4 gen ifade edilmesi araştırılmış ve TLR4 gen ifadesinin ve inflamasyon ile ilişkili genlerin ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Sellami ve diğerleri, 2014). AR-bağımlı LNCaP hücreleri üzerinde NOB ve LPS'nin tek başına uygulamasının TLR4 ifadesini arttırması (Bkz. Şekil 4.3 ve Şekil 4.6) NOB'un etkisinin AR ile ilişkili olabileceği fikrini öne sürmektedir. Luo ve diğerleri (2015)'nin yaptıkları çalışmada, TLR9'un ifade edilmesini PC-3 hücrelerinde susturduklarında migrasyon ve invazyonun baskılandığını, TLR9'un ifade edilmesinin kanser hücrelerindeki invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğunu ve TLR9'un ifade edilmesindeki artışın lenf nodu metastazı olasılığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda kontrol hücreleri olan HUVEC hücrelerinde LPS ve ODN'nin TLR9 ifade edilmesini arttırdığı, NOB'un TLR4 ifadesini anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.4 ve Şekil 4.7). Bu sonuçlar, NOB'un AR-bağımsız PC-3 hücreleri üzerinde TLR4 ifadesini baskılayıcı bir etki gösterdiğini ve böylelikle NOB'un tümör büyümesini, metastaz ve invazyonu baskılayıcı etkisinin TLR4 sinyali ilişkili olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

TLR4'ün LPS ile uyarılması MyD88-bağımlı yolak aracılığıyla pro-inflamatuar sitokinlerin yapımıyla sonuçlanan NF-kB sinyal yolağını aktifleştirmektedir. Ancak MyD88-bağımsız ya da TRIF-bağımlı yolu izlediğinde aktifleşen sinyal yolu sonunda Tip 1 interferonların (IFN- α ve IFN- β gibi) transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Gatti ve diğerleri, 2009). Buna ek olarak PC-3 hücrelerinde TLR4 aktivasyonu tümör gelişmesini gelişmesinde rolü olduğu bilinen VEGF ve TGF- β 'nın ifadelerini arttırmaktadır (Pei ve diğerleri, 2008). MyD88-bağımlı yolak literatürde çok fazla incelenmiştir ancak TRIF-bağımlı yol üzerine yapılan böyle bir araştırma çalışması henüz yoktur. Çalışmamızda TLR4 için daha az çalışılmış olan TRIF-bağımlı yol üzerinde analizler gerçekleştirilmiş ve literatürde bulunan bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlanmıştır.

İnterferonlar klinik olarak kanser hastalarında ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Üç çeşit interferonun kullanılması FDA tarafından onaylanmıştır. IFN- α 'nın tüylü hücreli lösemi ve AIDS'e bağlı kaposi sarkom tedavisi için, IFN- β 'nin multiple skleroz (MS) tedavisi için ve interferon gamma (IFN- γ)'nin kronik granülomatoz hastalıkları tedavisi için kullanılmasına FDA onay vermiştir (Marrs, 2004). Prostat kanserinde TLR4 ve TLR9 sinyal yolağının son basamağında ifade edilmesi artan IFN- α ve IFN- β miktarını belirlemeye yönelik *in vitro* bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla literatür ile herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır. İlerlemiş ve hormona dayanıklı prostat kanserine sahip erkeklerle yapılan çalışmalarda, IL-6, IL-8, IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin, tümör nekroz faktör a (TNF- α)'nın ve IFN- γ 'nin yüksek plazma düzeyi rapor edilmektedir (Maggio ve diğerleri, 2006; Wise ve diğerleri, 2000). Ayrıca enfeksiyon ya da yaralanmaya bağlı inflamasyonun tümörögenezi desteklediği, bir yandan da apoptozu uyarıp tümör gelişimini baskıladığı rapor edilmiştir (Colotta ve diğerleri, 2009). IFN- α ve IFN- β 'nin anti-tümöral etkisi bilindiğinden, elde ettiğimiz sonuçlarda NOB'un kanser hücreleri üzerinde anti-tümöral etkisinin varlığını gösterebilmemiz için, IFN- α ve IFN- β miktarını hücrelerde arttırması yönünde bir beklentimiz olmuştur.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, IFN- α miktarı NOB uygulaması ile TLR4 ve TLR9 sinyal yolaklarının ikisi için de, AR-bağımsız PC-3 ve HUVEC hücrelerinde 24 saat sonucunda artarken (Bkz. Şekil 4.10, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.15), AR-bağımlı LNCaP hücrelerinde 24 saat sonucunda azalmıştır (Bkz Şekil 4.11 ve Şekil 4.14). Bu sonuçlar bize NOB'un IFN- α miktarı üzerine olan anti-tümöral etkisinin AR ile ilişkili

olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, IFN- β miktarı, TLR4 sinyal yolağı aktif olduğunda NOB uygulaması ile AR-bağımsız PC-3 ve HUVEC hücrelerinde artarken (Bkz. Şekil 4.10 ve Şekil 4.12), AR-bağımlı LNCaP hücrelerine 6 saat uygulanması sonucunda azalmış, ancak 24 saat uygulanması sonucunda artmıştır (Bkz. Şekil 4.11). Bu sonuçlar bize NOB'un IFN- β miktarı üzerine olan anti-tümöral etkisinin AR ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Ayrıca LNCaP hücrelerine ligand ile birlikte NOB uygulandığında IFN- β miktarının azalması ligand ve NOB arasında antagonist bir ilişki olduğunu göstermiştir. TLR9 sinyal yolağı aktif olduğunda NOB uygulaması ile AR-bağımsız PC-3 hücrelerinde IFN- β miktarı için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Bkz. Şekil 4.19). AR-bağımlı LNCaP hücrelerine NOB uygulaması ile IFN- β miktarı azalmış (Bkz. Şekil 4.20), HUVEC hücrelerine 24 saat NOB uygulanması sonucunda IFN- β miktarı artmıştır (Bkz. Şekil 4.21). Elde edilen bu sonuçlara göre TLR9 sinyal yolağında NOB'un kanser hücreleri üzerindeki anti-tümöral etkisinin AR-bağımsız olma ihtimali yüksektir.

TLR4 bakteriyel lipopolisakkaritleri (LPS), TLR9 DNA'daki metillenmemiş CpG'leri (CpG-ODN) tanımaktadır (Politorak ve diğerleri, 1998). Ligandı ile aktifleşen TLR4 ve TLR9 reseptörü bir dizi proteinin aşağı yönlü aktifleşmesiyle gerçekleşen sinyal iletimini başlatır ve bu yolak interferon düzenleyici faktör-3 (IRF3)'ün ve interferon düzenleyici faktör-7 (IRF7)'nin aktive olmasıyla sonuçlanır (Kawai ve diğerleri 2006). Bu nedenle TLR4 ve TLR9'un başlattığı sinyal yollarında IRF3 ve IRF9 proteinlerinin ve reseptör proteinlerin (TLR4 ve TLR9) miktarı analiz edilerek NOB'un bu yollar üzerine etkisi belirlenmiştir.

Rezania ve diğerleri (2014)'nin yaptıkları çalışmada, LPS ve LTA (lipoteikoik asit)'nin farklı konsantrasyonlarını farklı zamanlarda prostat kanseri hücrelerine uygulayarak, hücre çoğalmasını, invazyon, adhezyon ve sitokin yapımını analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre LPS ile uygulama sonrasında LNCaP hücrelerinde TLR4 protein miktarının artmasıyla invazivlik artarken, PC-3 hücrelerinde TLR4 protein miktarı azalmış ve invazivlik de baskılanmıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz benzer sonuçların yanında, NOB uygulamasına baktığımızda, LNCaP ve HUVEC hücrelerinde TLR4 miktarının azaldığı ve hücre invazivliğinin baskılandığı gözlenmiştir (Şekil 4.24 ve Şekil 4.26). Bu

sonuçlar NOB'un TLR4 sinyal yolağı için bir anti-metastatik faktör olabileceğı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca NOB uygulaması TLR4 proteini üzerine olan etkisinden farklı olarak IRF3 protein miktarını AR-bağımsız PC-3 hücrelerinde arttırıp (Bkz. Şekil 4.23), AR-bağımlı LNCaP ve kontrol hücreleri olan HUVEC hücrelerinde azaltmıştır (Bkz. Şekil 4.25 ve Şekil 4.27). Bu durum NOB'un IRF3 protein miktarı üzerine olan etkisinin AR-bağımlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Ilvesaro ve diğerleri (2007)'nin yaptıkları çalışmada ODN uygulaması ile prostat kanseri hücrelerinde TLR9'un metastatik rolü incelenmiş ve TLR9 reseptörü ifadesinin hücrelerde invazyon ve metastazı arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmamızda TLR9 proteininin miktarını NOB uygulaması LNCaP ve HUVEC hücrelerinde arttırmıştır (Bkz. Şekil 4.30 ve Bkz. Şekil 4.32). Bu durum bize NOB'un anti-metastatik etkisini AR-ilişkili göstermediğini, bu etkinin kanser hücrelerine özgü olduğunu düşündürmektedir. Zhao ve diğerleri (2017)'nin yaptıkları bir çalışmada, *in vitro* şartlarda IRF7'nin aşırı ifadesinin hücre çoğalması, apoptoz, migrasyon ve invazyon dâhil olmak üzere prostat kanseri hücrelerinin malignant fenotipi üzerinde çok az etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca IRF7'yi aşırı ifade eden prostat kanseri hücrelerinin, NK hücrelerinin aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını göstererek, IRF7'nin IFN- β aracılı NK aktivitesi ile prostat kanserinin kemik metastazını azaltmada rol oynadığını göstermişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz benzer sonuçlara baktığımızda, IRF7 protein miktarı NOB uygulanması sonucunda AR-bağımsız PC-3 hücrelerinde artmıştır (Bkz. Şekil 4.29). AR-bağımlı LNCaP hücrelerinde 24 saat uygulama ile IRF7 protein miktarı artmıştır (Bkz. Şekil 4.31). NOB'un IRF7 protein miktarı üzerindeki arttırıcı etkisi PC-3 ve LNCaP hücrelerinde gözlenmiştir. Dolayısıyla NOB'un anti-tümöral etkisinin AR ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde, TLR9 miktarının artması tümör metastazına katkı sağlarken, IRF7'nin artması tümör baskılanmasında rol oynamaktadır. Aynı yolak üzerinde rol alan bu proteinlerin miktarı üzerine ligand ile birlikte NOB uygulanması sonucunda NOB'un tümör progresyonunu belirleyici bir rol oynayacağı açıkça görülmektedir.

MMP'ler elastin, kollajen ve proteoglikanlar gibi ECM proteinlerini yıkıma uğratan, 24 farklı endopeptidazdan oluşan bir enzim ailesidir (Reel ve diğerleri, 2011). Jelatinaz A'nın (MMP-2) latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa molekül ağırlığındadır (Sethi ve diğerleri, 2000). MMP-2 ifadesinin kolon (Sundov ve diğerleri, 2008), pankreas (Evans ve diğerleri, 1997), meme (Talvensaari ve diğerleri, 1998), over (Perigny ve diğerleri, 2008),

prostat (Trudel ve diğerkleri 2008) ve akciğerk (Leinonen ve diğerkleri, 2008) tñmör dokusunda arttığı saptanmış ve söz konusu MMP kötü prognoz faktörü olarak değerklendirilmiştir. Jelatinaz B (MMP-9) latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa molekül ağırlığındadır (Evans ve diğerkleri, 1997).

TLR9'un ODN ile uyarılması prostat kanseri invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Di ve diğerkleri, 2010). Prostat kanseri hücrelerinde TLR9 ifadesine benzer olarak invazivliği MMP-9'u indükleme yoluyla arttırdığı *in vitro* olarak da gösterilmektedir (Ilvesaro ve diğerkleri, 2007). Çalışmamızda bu bulguları destekleyici nitelikte, kontrol hücreleri olan HUVEC hücrelerinde, TLR4 ve TLR9 sinyal yolağının aktifleştirilmesini takiben ya da NOB uygulanması sonucunda MMP-9 enzim aktivitesi belirlenmemiştir ve NOB'un MMP-9 enzim aktivitesini artırıcı herhangi bir etkisine rastlanmamıştır (Bkz. Şekil 4.36 ve Şekil 4.39).

PC-3 hücrelerinde siRNA kullanılarak TLR4'ün inaktifleştirilmesi tñmör hücrelerinin göçünü ve invazyonunu azaltmaktadır (Hua ve diğerkleri, 2009). TLR4 yolağının aktifleşmesiyle kontrol hücrelerinde MMP-9 enzim aktivitesine rastlanmaması, prostat kanserinde TLR4 sinyal yolağının da hücre invazyonuyla ilgili olabileceğı fikrini desteklemektedir (Bkz. Şekil 4.36).

Prostat kanserli hastalarla yapılan çalışmalarda MMP-9'un prognostik belirteç özelliğı taşıyacak kadar yüksek miktarda ifadesi gösterilmiştir (Boxler ve diğerkleri, 2010). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre TLR4 sinyal yolağı aktifleştirilen AR-bağımsız PC-3 hücrelerinde, NOB uygulanması sonucunda MMP-9 enzim aktivitesi azalırken (Bkz. Şekil 4.34), AR-bağımlı LNCaP hücrelerinde LPS uygulaması sonucunda artmıştır (Bkz. Şekil 4.35) Bu durum bize NOB'un anti-metastatik etkisinin AR-bağımsız olduğunu ve TLR4 sinyal yolağının aktifleşmesinin kanser hücrelerinin metastazına katkı sağladığını göstermiştir.

Prostat kanseri hücreleri invaziv karaktere sahip olduğunda artık bazal membranı ve matriksi parçalayabilen MMP'ler üretebilmektedir. Özellikle MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifade edilmesi, invaziv özellikte olan prostat kanseri hücrelerinde artmaktadır (Chiang ve Massague, 2008). Benzer olarak prostat kanserli dokularda inflamasyon sürecinde rol oynayan enzimlerin rolüyle ilgili bir çalışmada, bu dokulardan izole edilen

proteinlerde MMP-2 ve MMP-9'un ifade edilmesinin belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (König ve diğerleri, 2004). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara baktığımızda, TLR9 sinyal yolağı aktive edildiğinde AR-bağımlı PC-3 hücrelerinde NOB uygulanması sonucunda MMP-2 enzim aktivitesi azalırken (Bkz. Şekil 4.37), LNCaP ve HUVEC hücrelerinde artmıştır (Bkz. Şekil 4.38 ve Şekil 4.39). Bu durum bize NOB'un anti-metastatik etkisini AR-bağımlı olarak gösterdiğini ortaya koymuştur.

Mukherjee ve diğerleri (2014)'nin yaptıkları çalışmada TLR9 sinyal yolağı aktive edilen PC-3 ve LNCaP hücrelerinde EGCG uygulanması sonucunda MMP-2 ve MMP-9 enzim aktivitesinin azaldığını ve ligand uygulanması sonucunda MMP-2 ve MMP-9 enzim aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara baktığımızda, benzer olarak iki ligandın da uygulanması sonucunda MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi PC-3 hücrelerinde artarken (Bkz. Şekil 4.34 ve Şekil 4.37), farklı olarak LNCaP hücrelerinde sadece ODN uygulaması sonucunda azalmıştır (Bkz. Şekil 4.38). Bu durum bize TLR9 sinyal yolağının aktive olması ile TLR9 sinyalinin yalnızca AR-bağımsız hücrelerde metastazda rol oynadığını ortaya koymuştur. Elde ettiğimiz verilere göre, NOB'un anti-metastatik özelliği AR-bağımsız PC-3 hücrelerinde belirlenirken, AR-bağımlı LNCaP hücrelerinde NOB'un metastaza katkı sağlayan bir rol oynadığı belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İmmünoterapinin kanser gelişiminin önlenmesi ve iyileştirilmesi için kullanılabilecek umut vadeden bir tedavi olabileceği düşünülmektedir. Kanser hücreleri çok çeşitli mekanizmalar yoluyla bağışıklık sistemi hücrelerinin saldırısından kaçabilmektedir. Tehlikede olan bir immün sistem ve kronik inflamasyon kanser gelişim insidansını arttırmaktadır. İnflamasyon kanserin yedinci ayırt edici özelliği olarak önerilmektedir. Kanserle mücadele için konakçının immün sistemini kullanan immünoterapi, özgüllüğü, daha az yan etkisinin bulunması ve daha az direnç oluşturması gibi bazı avantajlarıyla son zamanlarda ortaya çıkmıştır. İmmünoterapi yönteminde; kanser hücrelerine saldırmak için immün sistemi uyarma ya da kanserde immün sistemin inhibitör araçlarını uzaklaştırmak hedeflenmektedir.

TLR'ler tümör progresyonunda iki zıt görev görebilirler. Bir yandan tümör büyümesini ve epitel hücrelerin malignant dönüşümünü tetiklerken, diğer yandan apoptozu indükleyip tümör gelişimini baskılamaktadırlar. Bu durum TLR'lerin aktivasyonu ve tümör mikroçevresiyle tetiklenen karmaşık sinyal yollarına bağlı olabilmektedir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlarda da gördüğümüz gibi TLR4 ve TLR9 sinyalleri AR-duyarlılığı ile bağlantılı olarak ya tümör gelişimine ya da tümör baskılanmasına katkı sağlamaktadırlar. Tümör gelişimindeki TLR'lerin bu zıt görevlerini netleştirecek veriler çalışmamızdan elde edilememiştir. Bu noktada daha ileri analizleri içeren araştırmaların gerekliliğini önermekteyiz.

TLR'ler aynı zamanda tümör metastazını da arttırırlar. Bu nedenle, TLR'ler kanser tedavisinde önemli hedefler olarak görülmektedirler. Ayrıca immün yanıtı arttırabilmesi ama daha az yan etkisinin olması TLR'leri kanser tedavisi için iyi bir hedef yapmaktadır. Bu durum bize TLR'leri hedef olarak kullanan terapötik müdahalelerin çoğaltılması gerektiği, gen düzeyinde meydana gelen bu etkinin farklı durumlardan kaynaklanabileceği fikrine açıklık getirmek için daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği sonucunu ortaya koymuştur.

AR prostat kanserinin bütün süreçlerinde merkezi rol oynamaktadır. Özellikle birkaç sinyal iletim yolağı ve bu yolakların AR sinyal iletim yolu ile etkileşimlerinin prostat kanserinin ileri aşamalarında önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Çalışmamızda AR-

duyarlılığının rolü açısından kanser hücrelerinde farklı sonuçlar elde etmemiz daha ileri analizler yaparak AR-duyarlılığı, TLR'ler ve NOB arasındaki ilişkinin araştırılması gerektiğini önermekteyiz.

Sonuç olarak, NOB'un anti-tümöral ve anti-metastatik etkisinin varlığı hem TLR4 hem TLR9 sinyal iletim yolu için gösterilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinden AR-duyarlı LNCaP'in NOB'a karşı daha duyarlı olması, AR sinyal iletim yolunun TLR4 ve TLR9 sinyal iletim yolağı ile etkileşimde olduğunu ve AR-duyarlılığının prostat kanserinde teröpatik moleküllere karşı yanıtta önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu bulgulara ek olarak NOB'un reseptör gen ifadesini baskılaması NOB'un terapötik molekül olarak gen düzeyinde etkili olduğunu göstermiştir. Kontrol hücrelerinde ise NOB'un böyle bir etkisinin gözlenmemesi kanser hücrelerinde bu yolağın aktivitesine duyarlılığının fazla olduğunu ve daha kolay düzenlenebileceği fikrini öne sürmektedir. Ancak NOB'un TLR4 ve TLR9 sinyal yolları üzerindeki bu etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala belirsizdir. NOB'un tez çalışmamızda belirlenen anti-tümöral, anti-metastatik ve gen düzeyindeki baskılayıcı etkilerinin altında yatan mekanizmaların neler olduğunun belirlenmesi için daha ileri moleküler teknikler kullanılarak geliştirilmesi gerekliliği bu tez çalışmasının önerileri olarak öne çıkmaktadır.

Tez çalışmamız NOB'un insanlarda prostat kanserinde immünoterapötik tedavi için iyi bir aday olduğunu ve prostat kanseri hücre canlılığını ve metastazını baskılamada etkili bir aday molekül olabileceğini göstermiştir. NOB, TLR4 ve TLR9 sinyal yolları aracılığıyla, hücre canlılığını birden fazla yolla baskılayabilmekte ve böylece tümör büyümesini engelleyen belirgin bir yeteneğe sahiptir.

Pre-klinik doktora tez çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, *in vitro* olarak diğer çalışmalara ait sonuçlar ve *in vivo* olarak deney hayvanı kanser modelleriyle yapılacak olan araştırma verileriyle desteklenirse, NOB'un prostat kanseri gelişimi, progresyonu ve metastazı üzerine olan rolü kesin olarak belirlenebilecektir. Elde edilen sonuçların faz çalışmalarıyla desteklenmesi durumunda, NOB'un prostat kanserinin immünoterapötik tedavisi için aday bir molekül olarak değerlendirilebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Akdoğan, M., ve Yöntem, M. (2018). Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 36-45.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-8
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., and Radolf, J. D. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285(5428), 736-739.
- Amano, S., Akutsu, N., Matsunaga, Y., Kadoya, K., Nishiyama, T., and Champlaud, M. F. (2001). Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Experimental cell research*, 271(2), 249-262.
- Banerjee, S., and Kaviani, A. (2016). Worldwide Prostate Cancer Epidemiology: Differences Between Regions, Races, and Awareness Programs. *International Journal of Clinical and Experimental Medical Sciences*, 2(1), 1-6.
- Bernini, R., Crisante, F., and Ginnasi, M. C. (2011). A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC). *Molecules*, 16(2), 1418-1425.
- Bien, E., and Balcerska, A. (2008). Serum soluble interleukin 2 receptor α in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers*, 13(1), 1-26.
- Bosland, M. C. (2000). Chapter 2: the role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, (27), 39-66.
- Boxler, S., Djonov, V., Kessler, T. M., Hlushchuk, R., Bachmann, L. M., and Held, U. (2010). Matrix metalloproteinases and angiogenic factors: predictors of survival after radical prostatectomy for clinically organ-confined prostate cancer?. *The American journal of pathology*, 177(5), 2216-2224.
- Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., and Willi, N. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Human pathology*, 31(5), 578-583.
- Durak, I., Biri, H., Devrim, E., Sözen, S., and Avcı, A. (2004). Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer biology & therapy*, 3(9), 855-857.
- Chen, J., Chen, A. Y., Huang, H., Ye, X., Rollyson, W. D., and Perry, H. E. (2015). The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancers via the Akt pathway. *International journal of oncology*, 46(6), 2629-2638.

- Chen, J., Creed, A., Chen, A. Y., Huang, H., Li, Z., and Rankin, G. O. (2014). Nobiletin suppresses cell viability through AKT pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15(1), 59.
- Chen, J. H., Lin, H. H., Chiang, T. A., Hsu, J. D., Ho, H. H., and Lee, Y. C. (2008). Gaseous nitrogen oxide promotes human lung cancer cell line A549 migration, invasion, and metastasis via iNOS-mediated MMP-2 production. *Toxicological sciences*, 106(2), 364-375.
- Cheng, L., Nagabhushan, M., Pretlow, T. P., Amini, S. B., and Pretlow, T. G. (1996). Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. *The American journal of pathology*, 148(5), 1375.
- Chirpaz, E., Colonna, M., Menegoz, F., Grosclaude, P., Schaffer, P., and Arveux, P. (2002). Incidence and mortality trends for prostate cancer in 5 French areas from 1982 to 1996. *International journal of cancer*, 97(3), 372-376.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081.
- Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860.
- Crawford, E. D. (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology*, 62(6), 3-12.
- De Marzo, A. M., Marchi, V. L., Epstein, J. I., and Nelson, W. G. (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *The American journal of pathology*, 155(6), 1985-1992.
- De Souza, R. R. (2002). Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*, 3(6), 325-335.
- Dennis, L. K., and Dawson, D. V. (2002). Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology*, 13(1), 72-79.
- Dennis, L. K., Lynch, C. F., and Torner, J. C. (2002). Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*, 60(1), 78-83.
- Di, J. M., Pang, J., Sun, Q. P., Zhang, Y., Fang, Y. Q., and Liu, X. P. (2010). Toll-like receptor 9 agonists up-regulates the expression of cyclooxygenase-2 via activation of NF- κ B in prostate cancer cells. *Molecular biology reports*, 37(4), 1849-1855.
- Droemann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A. J., Branscheid, D., and Vollmer, E. (2005). Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respiratory research*, 6(1), 1.
- El-Omar, E. M., Ng, M. T., and Hold, G. L. (2008). Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*, 27(2), 244.

- Evans, J. D., Ghaneh, P., Kawesha, A., and Neoptolemos, J. P. (1997). Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion*, 58(6), 520-528.
- Fasciana, C., van der Made, A. C., Faber, P. W., and Trapman, J. (1996). Androgen regulation of the rat keratinocyte growth factor (KGF/FGF7) promoter. *Biochemical and biophysical research communications*, 220(3), 858-863.
- Fernández, L., Galán, Y., Jiménez, R., Gutiérrez, Á., Guerra, M., and Pereda, C. (2004). Sexual behaviour, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba. *International journal of epidemiology*, 34(1), 193-197.
- Frankel, E. N., German, J. B., Kinsella, J. E., Parks, E., and Kanner, J. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341(8843), 454-457.
- Gates, M. A., Vitonis, A. F., Tworoger, S. S., Rosner, B., Titus-Ernstoff, L., and Hankinson, S. E. (2009). Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *International journal of cancer*, 124(8), 1918-1925.
- Gatti, G., Quintar, A. A., Andreani, V., Nicola, J. P., Maldonado, C. A., and Masini-Repiso, A. M. (2009). Expression of Toll-like receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer. *The Prostate*, 69(13), 1387-1397.
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 3001-3015.
- Gioeli, D. (2005). Signal transduction in prostate cancer progression. *Clinical science*, 108(4), 293-308.
- Grönberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, 361(9360), 859-864.
- Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., and Aggarwal, B. B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), 405-434.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Eugene, C. Y., and Goodlett, D. R. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099.
- Heikkilä, K., Ebrahim, S., and Lawlor, D. A. (2007). A systematic review of the association between circulating concentrations of C reactive protein and cancer. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 61(9), 824-833.

- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., and Akira, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663), 1526-1529.
- Heinlein, C. A., and Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews*, 25(2), 276-308.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., and Sanjo, H. (2001). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 409(6820), 646.
- Hertog, M. G. L., Fesrens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The zupthen elderly study. *Lancet*, 342, 1007-11.
- Hua, D., Liu, M. Y., Qin, X. J., Zhang, H. M., Chen, Y., and Qin, G. J. (2009). Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. *Molecular immunology*, 46(15), 2876-2884.
- Humphrey, P. A., and Schuz, J. (2014). Cancers of the male reproductive organs. *World Cancer Report. Lyon: World Health Organization*, 453-64.
- Ilvesaro, J. M., Merrell, M. A., Swain, T. M., Davidson, J., Zayzafoon, M., and Harris, K. W. (2007). Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *The Prostate*, 67(7), 774-781.
- Isaacs, J. T., Furuya, Y., and Berges, R. (1994). The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. In *Seminars in cancer biology*, 5(5), 391-400.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), 987.
- Internet: NCI. New Treatment Target Identified for Key Prostate Cancer Driver. *NIH*. URL:<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.cancer.gov%2Fnews-events%2Fcancer-currents-blog%2F2016%2Fprostate-ror-gamma-inhibitor&date=2018-05-30>, Son Erişim Tarihi: 30.05.2018.
- Jinushi, M. (2012). The role of innate immune signals in antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 1(2), 189-194.
- Kaarbø, M., Klok, T. I., and Saatcioglu, F. (2007). Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *Bioessays*, 29(12), 1227-1238.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*, 7(2), 131.

- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., and Pukkala, E. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American journal of epidemiology*, 146(3), 223-230.
- Konat, G. W. (Ed.). (2008). *Signaling by toll-like receptors*. CRC Press.
- König, J. E., Senge, T., Allhoff, E. P., and König, W. (2004). Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *The Prostate*, 58(2), 121-129.
- Kunimasa, K., Ikekita, M., Sato, M., Ohta, T., Yamori, Y., and Ikeda, M. (2010). Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. *Cancer science*, 101(11), 2462-2469.
- Lattouf, J. B., Srinivasan, R., Pinto, P. A., Linehan, W. M., and Neckers, L. (2006). Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy. *Nature Reviews Urology*, 3(11), 590.
- Leinonen, T., Pirinen, R., Bohm, J., Johansson, R., and Kosma, V. M. (2008). Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. *Histology and histopathology*, 23(4-6), 693-700.
- Li, C., Hansen, R. A., Chou, C., Calderón, A. I., and Qian, J. (2018). Trends in botanical dietary supplement use among US adults by cancer status: The National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2014. *Cancer*, 124(6), 1207-1215.
- Li, S., Yu, H., and Ho, C. T. (2006). Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomedical Chromatography*, 20(1), 133-138.
- Luo, Y., Jiang, Q. W., Wu, J. Y., Qiu, J. G., Zhang, W. J., and Mei, X. L. (2015). Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(26), 22564.
- Maggio, M., Blackford, A., Taub, D., Carducci, M., Ble, A., and Metter, E. J. (2006). Circulating inflammatory cytokine expression in men with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy. *Journal of andrology*, 27(6), 725-728.
- Maiorov, E. G., Keskin, O., Gursoy, A., and Nussinov, R. (2013). The structural network of inflammation and cancer: merits and challenges. *Seminars in cancer biology*, 23(4), 243-251.
- Majeed, F. A., and Burgess, N. A. (1994). Trends in death rates and registration rates for prostate cancer in England and Wales. *BJU International*, 73(4), 377-381.
- Marrs, J. (2004). The use of monoclonal antibodies in oncology. *Clin J Oncol Nurs*, 8(3), 311-3.

- McCann, S. E., Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., and Graham, S. (2003). Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *The Journal of nutrition*, 133(6), 1937-1942.
- McEwan, I. J. (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocrine-related cancer*, 11(2), 281-293.
- Meagher, C., Sharif, S., Hussain, S., Cameron, M. J., Arreaza, G. A., and Delovitch, T. L. (2003). Cytokines and chemokines in the pathogenesis of murine type 1 diabetes. *Cytokines and Chemokines in Autoimmune Disease*, 133-158.
- Meiyanto, E., Hermawan, A., and Anindyajati, A. (2012). Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(2), 427-436.
- Mishina, T., Watanabe, H., Araki, H., and Nakao, M. (1985). Epidemiological study of prostatic cancer by matched-pair analysis. *The Prostate*, 6(4), 423-436.
- Miyata, Y., Sato, T., Imada, K., Dobashi, A., Yano, M., and Ito, A. (2008). A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 366(1), 168-173.
- Mukherjee, S., Siddiqui, M. A., Dayal, S., Ayoub, Y. Z., and Malathi, K. (2014). Epigallocatechin-3-gallate suppresses proinflammatory cytokines and chemokines induced by Toll-like receptor 9 agonists in prostate cancer cells. *Journal of inflammation research*, 7, 89.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiba, T., and Koshimizu, K., (2000). Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer research*, 60(18), 5059-5066.
- Murphy, G., and Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine*, 29(5), 290-308.
- Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(4), 273-300.
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., and Jones, P. P. (2013). Kuby immunology. 7th. New York: WH Freeman, 27(692), 109.
- Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., and Masure, S. (2001). Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *Journal of leukocyte biology*, 69(6), 851-859.
- Patel, D. A., Bock, C. H., Schwartz, K., Wenzlaff, A. S., Demers, R. Y., and Severson, R. K. (2005). Sexually transmitted diseases and other urogenital conditions as risk factors for prostate cancer: a case-control study in Wayne County, Michigan. *Cancer Causes & Control*, 16(3), 263-273.

- Pei, Z., Lin, D., Song, X., Li, H., and Yao, H. (2008). TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGF β 1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. *Cellular immunology*, 254(1), 20-27.
- Périgny, M., Bairati, I., Harvey, I., Beauchemin, M., Harel, F., and Plante, M. (2008). Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. *American journal of clinical pathology*, 129(2), 226-231.
- Perry, J. E., Grossmann, M. E., and Tindall, D. J. (1996). Androgen regulation of gene expression. *The Prostate*, 29(S6), 79-81.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Platz, E. A., and De Marzo, A. M. (2004). Epidemiology of inflammation and prostate cancer. *The Journal of urology*, 171(2), 36-40.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., and Du, X. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088.
- Potosky, A. L., Miller, B. A., Albertsen, P. C., and Kramer, B. S. (1995). The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *Jama*, 273(7), 548-552.
- Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., and Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science translational medicine*, 4(127), 127rv3-127rv3.
- Putzi, M. J., and De Marzo, A. M. (2000). Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, 56(5), 828-832.
- Reel, B., Sala-Newby, G. B., Huang, W. C., and Newby, A. C. (2011). Diverse patterns of cyclooxygenase-independent metalloproteinase gene regulation in human monocytes. *British journal of pharmacology*, 163(8), 1679-1690.
- Renaud, S. D., and De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Rezania, S., Amirmozaffari, N., Rashidi, N., Mirzadegan, E., Zarei, S., and Ghasemi, J. (2014). The same and not the same: heterogeneous functional activation of prostate tumor cells by TLR ligation. *Cancer cell international*, 14(1), 54.
- Ridnour, L., Cheng, R., Christopher, H., Heinecke, J., Ambs, S., Glynn, S., Howard, A., Trinchieri, G., and Wink, D. (2013). Molecular Pathways: Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment-Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. *Clinical Cancer Research*, 19(6).

- Roberts, R. O., Bergstralh, E. J., Bass, S. E., Lieber, M. M., and Jacobsen, S. J. (2004). Prostatitis as a risk factor for prostate cancer. *Epidemiology*, 15(1), 93-99.
- Rowan, S., Rachet, B., Alexe, D. M., Cooper, N., & Coleman, M. P. (2008). Survival from prostate cancer in England and Wales up to 2001. *British journal of cancer*, 99(1), 75-77.
- Ruch, R. J., Cheng, S. J., and Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.
- Saha, B., Arase, A., Imam, S. S., Tsao-Wei, D., Naritoku, W. Y., and Groshen, S. (2008). Overexpression of E-cadherin and β -Catenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. *The Prostate*, 68(1), 78-84.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., and Hoon, D. S. (2009). Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer microenvironment*, 2(1), 205-214.
- Schmaußer, B., Andrulis, M., Endrich, S., Müller-Hermelink, H. K., and Eck, M. (2005). Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(3), 179-185.
- Sellami, H., Said-Sadier, N., Znazen, A., Gdoura, R., Ojcius, D. M., and Hammami, A. (2014). Chlamydia trachomatis infection increases the expression of inflammatory tumorigenic cytokines and chemokines as well as components of the Toll-like receptor and NF- κ B pathways in human prostate epithelial cells. *Molecular and cellular probes*, 28(4), 147-154.
- Sethi, C. S., Bailey, T. A., Luthert, P. J., and Chong, N. H. V. (2000). Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *British Journal of Ophthalmology*, 84(6), 654-666.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics. *CA Cancer Journal of Clinical*, 68(1), 7-30.
- Shelke, A. R., and Mohile, S. G. (2011). Treating prostate cancer in elderly men: how does aging affect the outcome?. *Current treatment options in oncology*, 12(3), 263-275.
- Šundov, Ž., Tomić, S., Vilović, K., Kunac, N., Kalebić, M., and Bezić, J. (2008). Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Duke's B colon cancer. *Croatian medical journal*, 49(5), 636-642.
- Surichana, S., Arrooa R. R., Rupareliaa K., Tsatsakisb, A.M., Androustopoulosb V.P. (2018). Nobiletin bioactivation in MDA-MB-468 breast cancer cells by cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Food and Chemical Toxicology*. 113, 228–235.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, 21(1), 335-376.

- Talvensaari-Mattila, A., Pääkkö, P., Höyhtyä, M., Blanco-Sequeiros, G., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (1998). Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein. *Cancer*, 83(6), 1153-1162.
- Taplin, M. E., and Ho, S. M. (2001). The endocrinology of prostate cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(8), 3467-3477.
- Thorpe, A., and Neal, D. (2003). Benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*, 361(9366), 1359-1367.
- Tisi, E., Lissoni, P., Angeli, M., Arrigoni, C., Corno, E., and Cassina, E. (1992). Postoperative increase in soluble interleukin-2 receptor serum levels as predictor for early recurrence in non-small cell lung carcinoma. *Cancer*, 69(10), 2458-2462.
- Trudel, D., Fradet, Y., Meyer, F., Harel, F., and Têtu, B. (2008). Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. *Human pathology*, 39(5), 731-739.
- Vander Griend, D. J., D'antonio, J., Gurel, B., Antony, L., DeMarzo, A. M., and Isaacs, J. T. (2010). Cell-autonomous intracellular androgen receptor signaling drives the growth of human prostate cancer initiating cells. *The Prostate*, 70(1), 90-99.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.
- Vu, T. H., and Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development*, 14(17), 2123-2133.
- Wallerand, H., Robert, G., Pasticier, G., Ravaud, A., Ballanger, P., and Reiter, R. E. (2010). The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28(5), 473-479.
- Whittemore, A. S., Kolonel, L. N., Wu, A. H., John, E. M., Gallagher, R. P., and Howe, G. R. (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(9), 652-661.
- Willenborg, D. O., and Staykova, M. A. (2003). Cytokines in the pathogenesis and therapy of autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Cytokines and Chemokines in Autoimmune Disease*, 96-119.
- Wise, G. J., Marella, V. K., Talluri, G., and Shirazian, D. (2000). Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *The Journal of urology*, 164(3), 722-725.
- Woessner Jr, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*, 5(8), 2145-2154.

- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., and Miron, A. (2016). Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(1), 29-45.
- Xie, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, H., Wang, J., and Hu, Z. (2009). Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF- κ B in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(4), 1027-1032.
- Young, C. Y., Andrews, P. E., Montgomery, B. T., and Tindall, D. J. (1992). Tissue-specific and hormonal regulations of human prostate-specific glandular kallikrein. *Biochemistry*, 31(3), 818-824.
- Zhao, Y., Chen, W., Zhu, W., Meng, H., Chen, J., and Zhang, J. (2017). Overexpression of interferon regulatory factor 7 (IRF7) reduces bone metastasis of prostate cancer cells in mice. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25(4), 511-522.
- Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., and Zhang, D. (2014). Toll-like receptors and prostate cancer. *Frontiers in immunology*, 5, 352.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DEVECİ ÖZKAN, Asuman
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 23/10/1985, Sakarya
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (506) 236 55 28
 Faks : 0 (506) 236 55 28
 e-posta : asumandevoci@gmail.com



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet yılı

Doktora	Gazi Üniversitesi/ Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü	Devam Ediyor
Yüksek lisans	Kocaeli Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Sakarya Anadolu İmam Hatip Lisesi	2003

İş Deneyimi, Yıl

Çalıştığı Yer

Görev

2015- devam ediyor	Sakarya Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2013- 2015	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar (YÖKSİS)

Kaleli, S., Deveci, A., and Eskiler, G.G. (2018). Which environment makes cancer?, Oncology Research and Reviews, 1(3), 1-4.

- Deveci, A., Aksoy, Ö., and Al, G. (2017). Investigation of the effects of quizalofop-P-ethyl on pollen germination of *Hyacinthus orientalis* L.. *Caryologia*, 70(1), 1-5. (Yayın No: 4150514)
- Aksoy, Ö., Deveci, A., and Tütünoğlu, B. (2015). Genotoxic effects of the fungicide sportak on *Zea mays*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(2), 552-559. (Yayın No: 2985007)
- Güçlü S., Albayrak G., Deveci A., and Ekmekçi A., (2014). Evrimin moleküler izleri ve kanıtları. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 77(2), 31-36. (Yayın No: 2985085)
- Aksoy, Ö., Deveci, A., and Al, G. (2013). The Effects of Some Pesticides on Pollen Germination of *Begonia semperflorens*. *Journal of Functional and Environmental Botany*, 3(2), 114-119. (Yayın No: 639083)
- Erbulucu, T., Aksoy, Ö., Özen, F., and Deveci, A. (2013). Genetic variation in critically endangered plant *Amsonia orientalis* Decne. *Journal of Biodiversity and Environmental Science*, 3(1), 44-53. (Yayın No: 639419)
- Aksoy, Ö., Deveci, A., Kızılırmak, S., and Akdeniz, G. B. (2013). Phytotoxic Effect of Quizalofop P Ethyl on Soybean *Glycine max* L. *Journal of Biological and Environmental Science*, 7(19), 49-55. (Yayın No: 639335)
- Aksoy, Ö., and Deveci, A. (2012). The investigation of the cytotoxic effects of some pesticides on soybean *Glycine max* L. *Cytologia*, 4(77), 1-9. (Yayın No: 638923)

Hobiler

Kitap, Müzik, Yürüyüş, Seyahat.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

