



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAPSAİSİN UYGULANMIŞ İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRE
HATTINDA (PC3) AgNOR PROTEİN DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Emre Buğrahan ÖZMERDİVENLİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DANIŞMAN
Doç. Dr. Recep ERÖZ

Düzce 2017

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

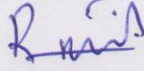
“Kapsaisin Uygulanmış İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattında (PC3)

AgNOR Protein Düzeylerinin Belirlenmesi”

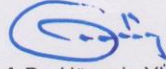
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 01/08/2017

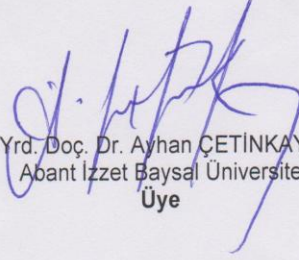
TEZ SINAV JÜRİSİ



Doç Dr. Recep ERÖZ
Düzce Üniversitesi
Başkan



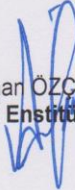
Prof. Dr. Hüseyin YÜCE
Düzce Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 08/08 /2017 tarih ve 2017/sayılı kararı ile kabul edilmiştir.
211

Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu yapılan tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazım aşamasına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak göstererek bunları kaynaklar listesine eklediğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Bu tez Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından 2017.04.03.585 numaralı proje ile desteklenmiştir.

01.08.2017

Emre Buğrahan ÖZMERDİVENLİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan, tez çalışmamda bana yol göstererek ufkumu açan, insani değerleri, hoş görüşü, etik değerleri ve derin tevazusu ile ömür boyu saygıyla anacağım ve hiç unutmayacağım hocam sayın Doç. Dr. Recep ERÖZ' e, Düzce' de geçirdiğim günlerde iyi günde ve kötü günde her zaman yanımda olan, daima minnetle anacağım, misafir perverliği ile birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve tüm nezaketi ile öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Hüseyin YÜCE' ye,

Tezimdeki özverili ve titiz katkılarından dolayı hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Merve ALPAY'a ve Prof. Dr. Recep ÖZMERDİVENLİ'ye, Ders dönemindeki engin öngörüsü ve katkılarından dolayı sayın Yrd. Doç. Dr. Görkem DÜLGER'e teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde en büyük pay sahipleri olan fedakâr anne, babam ve kardeşlerime sevgi, saygı ve minnet duygularımı sunarım.

01 Ağustos 2017, Düzce

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Kapsaisin Tarihçesi.....	8
2.2. Kapsaisin	9
2.2.1. Yan Etkiler, Güvenilirlik ve Önlemler	11
2.2.2. Kapsaisin Etki Mekanizmaları.....	12
2.3. Çekirdekcik.....	14
2.3.1. Hücre Çekirdeği.....	14
2.3.2. Çekirdekte rRNA'ların Sentezi ve İşlenmesi.....	15
2.4. Çekirdekcik Oluşturan Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions; NORs).....	15
2.5. NOR Proteinleri	17
2.5.1. Nukleolin (C23 Proteini)	17
2.5.2. Nükleofosmin (B23 proteini, neumatrin ya da NO38)	17
2.5.3. Nopp 140.....	18
2.5.4. RNA Polimeraz-I Alt Birimleri	18
2.5.5. UBF (Transkripsiyon Faktörü)	19
2.5.6. 135 kDa'luk AgNOR Proteini	19
2.5.7. Tümör Patolojisinde İnterfaz AgNOR'ları	19
2.6. Prostat	24
2.6.1. Prostat Kanseri.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. GEREÇLER.....	26
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	28
3.2.2. Prostat Kanseri Hücre Olan PC-3 Hücre Hattının (ATCC® CRL1435™) Kültüre Edilmesi	29

3.2.2.1. Prostat Kanseri Hücresi Olan PC-3 Hücre Hattı (ATCC® CRL1435™) Hücrelerinden Preperat Hazırlanması ve Fiksasyon Aşaması	30
3.2.3. Gruplara Göre Tiroid Hücrelerindeki İnterfaz NOR Aktivitelerinin Değişiminin Değerlendirilmesi.....	32
3.2.4. Kamera Ataçmanlı Işık Mikroskobu Yardımı ile İnterfaz NOR'larının Analiz İşlemleri	33
3.2.5. Bilgisayarda İnterfaz NOR'larının Ölçüm İşlemleri	33
3.2.5.1. Prostat Kanseri Hücre Görüntülerinin Elde Edilmesi.....	34
3.2.5.2. Elde Edilen Görüntülerin Analiz İşlemi	35
3.2.5.2. 1. NOR Bölgelerinin Belirlenmesi.....	36
3.2.5.2. 2. Prostat Kanseri Hücre Çekirdek Alanının Belirlenmesi	39
3.2.5.2. 3. Ölçütlerin Hesaplanması.....	40
3.3. İstatistiksel Analiz Yöntemi.....	40
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	65

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AgNO₃	: Gümüş Nitrat
AgNOR	: Argyrophilic Nukleolus Organizer Region
AJCC	: Amerikan Kanser Ortak Komitesi
BPH	: Benign prostatikhiperplasia
CO	: Karbon monoksit
CO₂	: Karbondioksitli
DMSO	: Dimetil sülfoksit
HepG2	: İnsan hepatoma hücreleri
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LC/MS	: Gaz kromatografisi
MS	: Kütle spektrometresi
NOR	: Nukleolus Organizer Region= Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler
PC3	: İnsan Prostat Kanseri Hücre hattında
PKa	: Prostat kanseri
PSA	: Prostat spesifik antijen
rDNAs	: Ribozomal genlerin
RPI	: RNA polimeraz I
rRNA	: ribozomal RNA'lar
SL1	: Promotor seçici faktör
snoRNPs	: Small nucleolar ribonucleoproteinler
snRNPs	: Small nuclear ribonucleoproteinler

SPME : Katı faz mikroekstraksiyon

TAA/ÇA : Total AgNOR Alanı / Çekirdek Alanı

Topo I : DNA topoizomeraz I

UBF : Upstream binding faktör

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2. 1. Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin, kimyasal yapısı, bağıl oranı ve acılık derecesi	10
---	----

Tablo 4. 1. Grupların N, ortalama TAA/ÇA değeri, ortalama AgNOR sayısı, X^2 ve p değerleri	43
---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Kapsaisinın moleküler yapısı.....	10
Şekil 2. 2. Kırmızıbiberin bir görüntüsü	14
Şekil 2. 3. Prostat anotomisi ¹²⁴	24
Şekil 3. 1. AgNOR boyama işlemi yapılmış prostat kanser hücreleri	32
Şekil 3. 2. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu ve bilgisayar düzeneği	34
Şekil 3. 3. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu.....	35
Şekil 3. 4. Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan prostat kanseri hücreleri	36
Şekil 3. 5. Analiz programında freehand selection panelinin aktif hale getirilmesi	37
Şekil 3. 6. NOR bölgeleri belirlenmiş bir prostat kanseri hücre çekirdeği	38
Şekil 3. 7. Çekirdek alanı belirlenmiş bir prostat kanseri hücre çekirdeği	39
Şekil 3. 8. Çekirdek ve NOR bölgelerinin hesaplama sonucu.....	40
Şekil 4. 1. Grupların ortalama TAA/NA değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik.....	43
Şekil 4. 2. Grupların ortalama AgNOR sayısı değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik.....	44

ÖZET

KAPSAİSİN UYGULANMIŞ İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA (PC3) AgNOR PROTEİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Emre Buğrahan ÖZMERDİVENLİ

Düzce Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı; Doç. Dr. Recep ERÖZ

Ağustos, 2017, 75 sayfa

Biz bu çalışmada; kırmızı biberin bir komponenti olan farklı dozlardaki kapsaisinin insan prostat kanser hücresi olan PC-3 hücre hattında (ATCC® CRL1435™) AgNOR proteini sentezi üzerine etkisini tespit etmeyi planladık. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında ticari olarak alınan PC-3 hücre hattı kültüre edilerek, logaritmik üreme fazında olan aktif hücreler 5 gruba ayrıldı. Bu hücrelerden ilk gruba hiçbir madde uygulanmazken, aktif hücrelerin bulunduğu diğer 4 gruba farklı dozlarda (25µm, 50 µm, 100 µm, 200 µm) kapsaisin uygulaması yapılmıştır. Bu grupların her biri için preperatlar hazırlanıp, Ag-NOR boyama işlemi uygulandı. Daha sonra; PC-3 hücre hattındaki hücrelerde ortalama AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı/Çekirdek (TAA/ÇA) alanı değerleri hesaplanmıştır.Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda, hiçbir madde uygulanmamış PC-3 hücre hattı ile farklı konsantrasyonlarda (25µm, 50µm, 100µm ve 200 µm) kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı karşılaştırıldığında, hem TAA/ÇA hemde Ortalama AgNOR sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu (sırasıyla X²: 13,903 , p=0,009 ; X²: 83,716 , p=0,000). Farklı konsantrasyonlarda 25 µm, 50 µm, 100 µm ve 200 µm kapsisin uygulanmış PC-3 hücre hattı gruplarının kendi içerisinde ikili kıyaslaması yapıldığında; 25 µm konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı ile 50 µm ve 100 µm konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı grubu ortalama AgNOR sayısı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık variken, diğer uygulama yapılmış grupların ortalama AgNOR sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Buna ilaveten uygulama yapılmış grupların TAA/ÇA değerleri arasında doz artışına bağlı bir azalma olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Buda bize belli bir miktara kadar

kapsaisinın insan prostat kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu, bunun için doz konsantrasyonunun ve saflık derecesinin önemli olduğunu, aynı zamanda tedavi stratejisi ve hastalığın prognozu hakkında bilgi edinebilmek için AgNOR yönteminin indirek bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: NOR, Kapsaisin, PC-3, Prostat Kanseri



ABSTRACT

DETERMINATION OF AgNOR PROTEIN LEVELS IN THE HUMAN PROSTAT CANCER CELL LINE (PC3) APPLIED WITH CAPSAICIN

Emre Buğrahan ÖZMERDİVENLİ

Düzce University Department of Medical Biology and Genetics

Thesis advisor; Assoc. Prof. Dr. Recep ERÖZ

August, 2017, 75 pages

In this study; we planned to determine the effect of different doses of capsaicin, a component of red pepper, on AgNOR protein synthesis in the human prostate cancer cell line PC-3 (ATCC® CRL1435™). The PC-3 cell line, which is commercially available, is cultured in the Cell Culture Laboratory of Medical Faculty, Medical Genetics Department in Düzce University and the active cells in the logarithmic growth phase are divided into 5 groups. While no substance was applied to the first group of these cells, the other 4 groups including active cells were exposed with capsaicin at different doses (25µM, 50µM, 100µM ve 200 µM). Slides were prepared for each of these groups and Ag-NOR staining were performed. Then mean AgNOR number and total AgNOR area /nuclear area (TAA/NA) values were calculated in PC-3 cell line. As a result of our study, there was a statistically significant difference between the PC-3 cell line with no agent applied and the PC-3 cell line (25µM, 50µM, 100µM ve 200 µM) applied with capsaicin at different concentrations for both TAA/NA and mean AgNOR number (X^2 : 13,903 , $p=0,009$ and X^2 : 83,716 , $p=0,000$), respectively. When binary comparisons of PC-3 cell line groups that have been applied with capsaicin at different concentrations (25µM, 50µM, 100µM ve 200 µM) are performed, there was a statistically significant difference between the PCN-3 cell line applied with 25 µM concentration and both of 50 µM and 100 µM concentration capsaicin for the mean AgNOR numbers but there was not a statistically significant difference among mean AgNOR numbers of the other treated groups. In addition, although there was a dose-related decrease among TAA/NA values of the administered groups, this increase was not statistically significant. This shows us that a certain amount of capsaicin has a protective effect against human prostate cancer and the dose concentration and degree of purity are important for this, also the AgNOR method can be used as an indirect marker to obtain knowledge about the treatment strategy and the prognosis of the disease.

Key Words: NOR, Capsaicin, PC-3, Prostate Cancer

1. GİRİŞ ve AMAÇ

NOR (Nukleolus Organizer Region= Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler) insan ve diğer ökaryotların kromozomlarındaki çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleridir. Bu bölgeler ribozomal RNA'lar (rRNA) sentezledikleri için ribozomal genlerin (rDNA) olarak da bilinirler. NOR'lar insanda beş çeşit akrosentrik kromozomun (13,14,15,21,22. kromozomlar) ikincil boğumu olarak bilinen satellit köklerinde bulunurlar ve çekirdekçiğin oluşumuna neden olurlar. Çekirdekçiğin aktif zonunda (fibrillar ve yoğun fibrillar merkez) NOR proteinleri bulunmaktadır ve bunlar formik asit varlığında gümüş nitrati metalik gümüşe indirgemektedir¹⁻³.

Hücrenin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi tümörlerin histolojik sınıflandırılmasına yardımcı olması açısından önemlidir¹. Histopatoloji'de, interfaz AgNOR (Argyrophilic Nukleolus Organizer Region) proteinlerinin analizleri preneoplastik ve neoplastik lezyonların ayrılmasında sık olarak kullanılmaktadır⁴. AgNOR proteinleri birçok kanser türünde hücresel proliferasyonun bir indikatörüdür⁵⁻⁷. Bu bölgelerin aktiviteleri direk olarak protein sentezi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktif NOR sayıları, artan hücresel aktiviteyle artar. Burada bahsedilen metodu kullanarak yapmış olduğumuz daha önceki çalışmalarımızda, ortalama AgNOR sayısı ve TAA/ÇA (Total AgNOR Alanı / Çekirdek Alanı) oranının papiller tiroid kanserinde benin tiroid nodüllerine göre anlamlı derecede arttığını tespit ettik⁵. Biz aynı zamanda kullandığımız bu yeni yaklaşımın (TAA/ÇA oranının tespitinin) malin ve benin tiroid lezyonlarda hücrelerin proliferasyon aktivitesinin tespiti için oldukça uygun bir metod olduğunu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceğini belirledik⁵⁻⁸. Yaptığımız diğer bir çalışmada yeni yaklaşımımızla elde ettiğimiz cut-off değerlerinin Foliküler Adenom ve Foliküler

Tiroid Karsinomunun cerrahi öncesi ayırımına yardım edebileceğini ve rutin sitopatolojiye katkı sunabileceğini⁸, buna ilaveten ince iğne aspirasyon biyopsisinde örneğin doğru lokalizasyondan alınıp alınmadığını tespit etmek amacıyla, normal tiroid dokusundan benin nodülleri ayırmak için bir cut-off değeri elde ettik⁷.

Malin ve benin özellikteki çeşitli lezyonların ayırımında kullanılabilecek yeni markır ve yaklaşımların tanımlanması tanı başarısının güçlendirilmesi ve güvenilirliği için oldukça önemlidir. Yapılan diğer çalışmalarda benin ve malin lezyonların ayırımı için çekirdekdeki AgNOR lekelerinin toplam alanı hesaplanırken, bizim kullandığımız metod da her bir hücre için toplam AgNOR alanının toplam çekirdek alanına oranı (TAA/ÇA) hesaplanmaktadır. Kanser hücrelerinde yalnızca gen ekspresyonu değil aynı zamanda genin ürünü ve hücrenin morfolojisi (çekirdeğin hacmi, çekirdekçik vb.) de değişmektedir. Bu nedenle hem çekirdek içerisindeki AgNOR alanının hem de çekirdek alanının hesaplanması her bir hücrenin protein sentez kapasitesi hakkında daha iyi bilgi verir. Biyomoleküllerin sayısı, hücrenin boyutu ve hücre çekirdeği hücresel metabolik aktiviteye bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle TAA/ÇA oranının tespit edilmesi ile hücrelerin metabolik ve proliferatif aktiviteleri hakkında daha kesin bilgiler elde edilebilmektedir. Bizim kullanmış olduğumuz teknik aynı zamanda kolay ve ucuz bir tekniktir.

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi ve ölümcül olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 Kanser Raporuna göre dünyada yılda 12.8 milyon yeni kanser vakası görülmüştür. Kansere yakalanan kişi sayısındaki artış hızı aynı şekilde devam ettiği sürece 2025 yılında kanser vakalarının sayısını dünya çapında 25 milyonu aşacağı görülmektedir. Bundan dolayı günümüzde kanser üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmakta, daha etkin ve daha az yan etkili tedavi arayışları sürmektedir⁹.

Kanser alanında uygulanan tedaviler geçmişten günümüze kadar farklı teknikler kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile gelişme kaydetmiştir. Yalnız hangi metot kullanılırsa kullanılsın ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak bir yerde zorunluluk göstermektedir. Çünkü son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modellerinin kullanımını önemli kılmaktadır. Hayvan modelleri ilaç dozuna bağımlı toksisiteyi belirlemede, ilacın metabolik özelliklerini veya doku ile hücrelerarası dağılımını gözlemede, doz şiddetini ayarlama ve tümör ilerleme durumunu ortaya koymada artan bir öneme sahiptir. Günümüzde tedavide başarılı olmak ve kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek üzere yapılan çalışmalar deney hayvanlarında oluşturulan deneysel hayvan tümörleri üzerinde sürdürülmektedir. Daha önceki yapmış olduğumuz çalışmalarda Ehrlich Ascites Tümörü oluşturulmuş olan farelerde Rhamnetin ve curcumin'in antitümoral etkisini AgNOR proteinlerinin sentezini tespit ederek belirledik^{10,11}.

Prostat kanseri Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de erkeklerde ikinci sıklıkta görülmekte olup, her yıl kanser tanısı konulan üç erkekte biri prostat kanseridir. Prostat kanseri hastanın hem kendi hayatını hem de yakınlarınınkini etkileyen ve baş edilmesi zor bir hastalıktır. Hastalar ailelerini kaybetmekten, iş ve günlük aktivitelerini sürdürememekten korkmaktadırlar. Tedaviler, yan etkiler, hastanede yatma süreleri de bu korku ve endişeye katkıda bulunmaktadır¹².

İnsan hücre hatları, endüstriyel amaçlı üretiminden itibaren pek çok araştırmaya konu olan deneysel çalışmalarda kullanılmaya başlanmış ve halende yoğun bir şekilde kullanımına devam etmektedir. Biz şu anki çalışmada bu hücre hatlarından İnsan Prostat Kanseri Hücre hattında farklı dozlarda kapsaisinin AgNOR proteini sentezi üzerine etkisini tespit etmeyi planladık. Hedeflediğimiz araştırmamızın konusu olan Kapsaisin,

(8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) $((CH_3)_2CHCH=CH(CH_2)_4CONHCH_2C_6H_3-4-(OH)-3-(OCH_3))$, acı biberin acı olmasını sağlayan maddedir. İnsan dilinde bulunan kapsaisin reseptörleri (algılayıcıları), bu maddeden etkilenecek acı veya sıcak hissine neden olur. Kuşlar ve yılanlar gibi bazı hayvanlarda bu algılayıcılar olmadığından acıyı hissetmezler. Kapsaisin maddesi sağlık alanında hem lokal bir analjezik olarak kullanılmakta hem de Türkiye'de Yakı adı verilen ve tüm dünyada sıklıkla kullanılan eski bir tedavi yöntemi olan ve ağrıları gidermeye yarayan, sıcak flasterler alanında etken madde olarak kullanılmaktadır. Sadece bu alanlarda kullanımı ile sınırlı kalmayan medikal kapsaisin kullanımı özellikle romatizmal hastalıklar alanında da sıklıkla etken madde olarak kullanılmaktadır¹³. Kırmızı biberin bir komponenti olan kapsaisinin prostatıda içeren çeşitli malignitelerde anti karsinojenik etkisi olduğu in vitro olarak gösterilmiştir¹⁴.

Benin ve malin tiroid dokusu^{5-8,15}, alopesili ve sağlıklı insanların saç kökü hücreleri^{16,17}, Down sendromlu infantların ve sağlıklı bireylerin ağız epitel hücreleri^{18,19} ve Karbon monoksit (CO) maruziyetinin kalp ve akciğer hücrelerindeki NOR proteinleri üzerine etkisi ile ilgili olan AgNOR proteinlerinin önemi hakkında birçok çalışma yapılmıştır^{20,21}. Bununla beraber bildiğimiz kadarıyla literatürde kapsaisin uygulanmış İnsan Prostat Kanseri Hücre hattında (PC3), AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı / Çekirdek alanı değerlerinin (TAA/ÇA) araştırıldığı hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle biz bu çalışmayı yapmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kapsaisin Tarihçesi

Amerika keşfedilmeden önce diğer coğrafik kıtalarda bilinmeyen biber, Amerika'yı keşfeden Christopher Colombus tarafından Avrupa'ya getirilerek popüler olmuştur. Yerliler tarafından “axi” veya “aji” olarak ifade edilen kırmızı renkli bu meyve “red pepper” yani “kırmızıbiber” olarak isimlendirilmiştir²². Biber tarihsel kronolojiyle bakıldığında 1493'de İspanya'ya, 1548'de İngiltere'ye, 1585'de ise Orta Avrupa'ya girmiştir²³. Biberin 17. yy.'da Portekizliler tarafından Avrupa'dan Hindistan'a götürüldüğü düşünülmektedir. 16. yy.'da Osmanlı İmparatorluğu döneminde, Orta Avrupa ülkeleri ile kurulan yoğun işbirliği nedeniyle, biber önce İstanbul'a getirilmiş daha sonra ise İstanbul'dan Anadolu'nun diğer yerlerine yayılmıştır²⁴. İlerleyen zamana bağlı olarak biber; zamanla Dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde hızla yayılım göstermiştir²⁵.

Salanaceae familyasından *capsicum* Türü bir meyva olan kırmızı acı biberde bulunan Kapsaisin veya *kapsikum*, bilinen en acı maddelerden biri olan aktif acı bir anahtar bileşiktir²⁶. Kapsaisinin biyosentezi açıltransferaz enzimini kodladığı varsayılan AT3 genine bağlı olarak gerçekleşmektedir^{27,28}.

Acı biberin yapısında bulunan kapsaisinoidler kapsaisin, homodihidro-kapsaisin, dihidro-kapsaisin, nordihidro-kapsaisin ve homokapsaisin kapsaisinoidlerdir (Tablo 2.1). Temel kapsaisinoidlerin (kapsaisin ve dihidro-kapsaisinin) sinirler ve tat üzerine olan etkisi minör kapsaisinoidlere (nordihidro-kapsaisin, homodihidro-kapsaisin ve homokapsaisine) göre iki kat daha fazladır. Farklı biber türlerinin (*Capsicum frutescens*, *annuum* ve *chinese*) kapsaisinoid içeriğinin 0.22-20 mg/g olduğu belirtilmiştir²⁹.

Kapsaisinoidlerin bağıl oranları, kimyasal yapıları ve acı tatlarının derecesini ifade eden Scoville dereceleri Tablo I’de verilmiştir³⁰.

(E)-8-Metil-N-vanilil-6-nonenamid olarak da adlandırılan kapsaisin ($C_{18}H_{27}NO_3$; Molekül Ağırlığı: 305.41 g) renksiz ve kokusuz bir tozdur (Şekil 2.1). Erime derecesi 57-66 °C aralığında olup, kloroform, alkol ve benzende iyi çözünüp, karbon disülfitte az çözünmesine rağmen soğuk suda neredeyse hiç çözünmez (25°C’de 10.3 mg/L). Oktanol- su dağılım katsayısı (log Kos) 3.04’tür³¹.

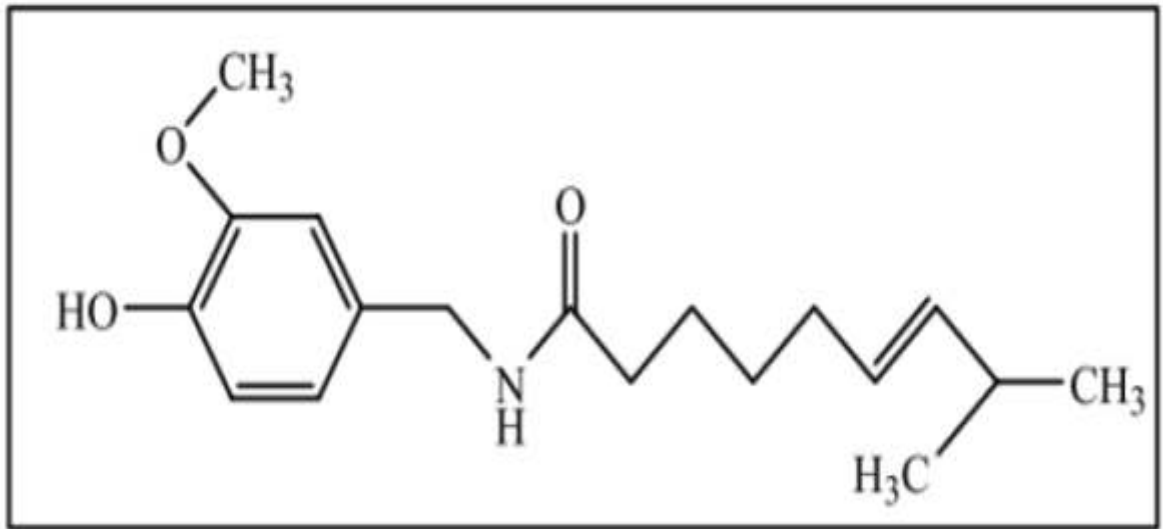
Pişirme, Bekletme ve dondurmaya karşı kapsaisin orijinal potensini korur. Kapsaisinin miktarını belirlemek için; yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi, LC/MS metodlarının, katı faz mikroekstraksiyon (SPME)-gaz kromatografisi (GC)- kütle spektrometresi (MS) yöntemleri kullanılmış olup, ölçüm (LOQ) ve dedeksiyon limiti (LOD) sırasıyla 0.022 ve 0.014 µg/ mL olarak belirlenmiştir^{13,32}.

2.2. Kapsaisin

Uzun yıllardır hem besin maddesi, hem de ilaç olarak kullanılan süs biberi (*Capsicum* sp.) bitkisi önemi giderek artan bitkilerdendir. *Dünya’da* tropik ve subtropik bölgelerde yayılım gösteren yaklaşık olarak 30 türü kapsamaktadır. *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* ve *Capsicum pubescens*, kültüre edilebilen ekonomik öneme sahip türlerindendir. Kapsaisin kırmızı taze biberde (Şekil 2.2) yeşil bibere oranla iki üç kat daha fazla bulunmakta olup, besin değeri yüksek, özellikle C vitamini açısından oldukça zengin (103 mg/100 g) bir sebze türüdür³³.

Kapsaisinoid	Bağıl oran	Scoville acı derecesi	Kimyasal Yapı
Kapsaisin	69%	16.000.000	
Dihidro-kapsaisin	22%	15.000.000	
Nordihidro-kapsaisin	7%	9.100.000	
Homodihidro-kapsaisin	1%	8.600.000	
Homokapsaisin	1%	8.600.000	
Nonivamid			

Tablo 2. 1. Doğal ve sentetik kapsaisinoidlerin, kimyasal yapısı, bağıl oranı ve acılık derecesi



Şekil 2. 1. Kapsaisin molekül yapısı

2.2.1. Yan Etkiler, Güvenilirlik ve Önlemler

Kapsaisin en çok karşılaşılan yan etkisi uygulanan bölgede hissedilen batma ve yanma hissi olmasına rağmen bu his daha sonraki dönemlerde yapılan uygulamalarda azalmaktadır. Kapsaisin uygulama bölgesinde kaşıntı ve kızarıklığa neden olabilir. Buna ilaveten kan basıncında artışa neden olup, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olarak rol alan ilaçlarla da etkileşime girebilmektedir³⁴.

Kapsaisin mutajenik etkisini belirlemek amacıyla bakteriyal ve memeli hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir. Kapsaisin göz çevresi ve vücutta yer alan açık yaralarda kullanımı tavsiye edilmemektedir. 18 yaş altı çocuklarda ve saçlı deride kullanılmaması tavsiye edilmektedir³⁴.

Yüksek dozlarda Kapsaisin alımının akut eroziv gastrit ve hepatik Nekroza neden olabileceği bildirilmiştir. Kapsaisin dönüşümsüz olarak karaciğer mikrozomal proteinleriyle etkileşimi hepatotoksisiteye yol açabileceğinden, hepatik ilaç metabolizmasından sorumlu enzimleri etkileyen ilaçlarla birlikte kullanımında dikkatli olunmalıdır³⁴.

Fito-kimyasal ajanların kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar kadar kanser önleyici ve antioksidan özelliğede vardır. Bu ajanların çoğu tümörlü hücrelerin apoptozise gitmesini uyararak ve hücre bölünme siklusunun ilerlemesini durdurarak anti-kansorejen etkilerini gösterirler³⁵.

Kapsaisin karsinogenik etkisini belirlemek amacıyla yapılmış olan in – vitro ve in – vivo çalışmaların sonuçları değişkenlik gösterdiğinden bu molekül “iki yüzü keskin bıçak” olarak tanımlanmasına rağmen, 2000 yılı itibariyle kapsaisin karsinogenik yönünün oldukça zayıf olduğu ve saflık düzeyinin önemli olduğu standardize edilmiş olan protokollerle gösterilmeye başlanmıştır. Kapsaisin ksenograft fare modelleri ve

kanser hücre hatları üzerinde, hücre siklusunu G0/G1 fazlarında durdurarak ve özellikle tümör hücre apoptozunu indükleyerek anti-proliferatif etki göstermesi onu önemli bir teröpotik ajan sınıfına sokmaktadır^{36,37}.

2.2.2. Kapsaisinin Etki Mekanizmaları

Tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu bitkilerden biri, botanikte *Capsicum annuum* olarak adlandırılan kırmızı acı biberdir³⁸. Kapsaisinin en temel etki mekanizmalarından birisi sinir uçlarındaki norotransmitter uyarımı engelleyerek ağrının giderilmesinde rol almasıdır. Kapsaisin kaşıntılı osteoartrit, psoriasis ve diyabet ile zona başta olmak üzere ağrı oluşumuna neden olabilen postmastektomi ağrı sendromu, kronik postherpetik nevralji, diyabetik nöropati, postoperatif ağrılar, çeşitli kaşıntı tipleri ve apokrin kromhidrozda tedavi amacıyla lokal olarak kullanılabilir³⁹⁻⁴¹.

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda kapsaisinin antiinflamatuvar, analjezik, antimikrobiyal, antitümoral, antioksidan, ve immünmodülatör gibi etkileri olduğu gösterilmiştir⁴². Yine yapılmış olan diğer çalışmalarda kapsaisinin karaciğer yıldız hücre oluşumunu ve karaciğer fibrozisini inhibe ettiği⁴³, serum kolesterol düzeyi üzerine etkili olduğu⁴⁴; kan serum kolesterolü ve trigliserid değerlerini düşürerek, ateroskleroz gelişme riskini azalttığı gösterilmiştir⁴⁵.

Salmonella enteritis ile enfekte kanatlılarda kapsaisinin iyileştirici etkisi olduğu⁴⁶, safra taşları oluşumunun önlenmesindeki potansiyel bir ajan olduğu⁴⁷, intragastik olarak uygulanan kapsaisinin, deneysel modellerle oluşturulan gastrik hasara karşı koruyucu bir etkinliğinin olduğu¹³ tespit edilmiştir.

Biber; sinir, mide ve salgı bezlerini uyararak, onların iyi çalışmasını sağlar, idrar söktürür. Dahili olarak iştah açıcı, haricen kızartıcı ve kan toplayıcı etkileri bulunmaktadır³⁸.

Kapsaisinin bağırsak kanalındaki bazı elektrolitlerin taşınması ve peristaltik aktivite üzerine etkili olduğu bildirilmiştir⁴⁸. Doğal kapsaisinin, apoptozu indükleyerek akciğer kanser hücreleri, myeloid lökemia, insan hepatoma (HepG2) hücreleri, prostat kanser hücreleri ve kolon kanser hücrelerinde büyümeyi baskıladığı gösterilmiştir⁴⁹⁻⁵¹. Diğer taraftan kapsaisinin mide kanseri gibi bazı türler için risk olduğu da bildirilmiştir. Bu nedenle Kapsaisinin kansere karşı koruyucu etkisinin yanı sıra kanser predisposal bir faktör olabileceği tartışılmakta olup, bu iki yönlü etkileri doğrultusunda doz, süre ve hücre tipi kapsaisin kullanımında önemli etkenlerdendir⁵²⁻⁵⁵. Kapsaisinin, antikarsinojenik, antimutajenik ve antigenotoksik etkileri dışında antianjiyogenik aktivitesi olduğu in vitro ve in vivo çalışmalarla bildirilmiştir. Yapılan çalışmada, kapsaisin endotel hücrelerinde G1 hücre siklusunu durdurup, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) kaynaklı anjiyogenez sinyal yollarını inhibe ettiği, böylece hücrelerdeki morfolojik değişikliği, malignant hücrelerin migrasyonunu ve kan damarlarındaki antiproliferatif etkisiyle metastaz oluşumunu engellediği gösterilmiştir⁵⁶. Parasetamol zehirlenmesi oluşturulan ratların karaciğerinde kapsaisinin, inflamasyonu önleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Kapsaisinin toksik etkiyi önleyici özelliği ile ilgili sınırlı sayıda araştırma mevcuttur⁵⁷.



Şekil 2. 2. Kırmızı biberin bir görüntüsü

2.3. Çekirdekçik

2.3.1. Hücre Çekirdeği

Canlıların hücre çekirdeği; bunların sahip oldukları genom ve bu genetik materyallerle ilişkili bir şekilde işlev gösteren DNA ve RNA onarım mekanizmaları, DNA duplikasyonu, RNA'ların sentezinden itibaren, işlenmesi ve taşınması gibi fonksiyonların gerçekleştiği yerdir. Yapılmış olan çalışmaların büyük çoğunluğu canlı hücrelerde bulunan çekirdeğin o hücre içerisinde yer alan en önemli ve kompleks organellerden olduğunu göstermiştir⁵⁸⁻⁶².

Tümör hücrelerinin sahip olduğu çekirdek yapısında meydana gelen birçok değişiklik, patolojiler için önemli teşhis ve prognostik faktörler olarak kullanılmaktadır⁶³⁻⁶⁵.

Çekirdekte meydana gelen modifikasyonlar ve kanser mekanizması arasındaki ilişki uzun yıllardır araştırılmış ve elde edilen bilgilerle her geçen gün bu ilişki hakkında ki bilgi dağarcığımızın artmasına rağmen bu ilişki tamamen anlaşılamamış ve hala bu konu ile ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır^{61,66,67}.

2.3.2. Çekirdekçikte rRNA'ların Sentezi ve İşlenmesi

Çekirdekçik pre-ribozomal RNA'ların sentezinin yapılarak bunların işlendiği çekirdek bölgesidir⁶⁸. Çekirdekçik de; İpliksi bölge, yoğun ipliksi bölge, granüler bölge ve peri-intra nukleolar kromatin olmak üzere dört alt kısım tanımlanabilir. Çekirdekçik hücrelerde bulunan tüm RNA'ların yarısından fazlasının sentezi ve işlenmesinden sorumludur⁶⁹. Çekirdekçiğin 1978 yılında Fontana tarafından çekirdek içerisindeki oval şekilli dört bölge olarak tanımlanmasından bu yana çekirdekçik, birçok incelemenin konusu olmuştur. İçinde bulunduğumuz periyot, çekirdeğin fonksiyonlarının ve organizasyonlarının anlaşılması ve bilim adamları tarafından onun öneminin tanımlanması açısından çekirdekçiğin altın çağıdır. McClintock, 1934 yılında çekirdekçiğin, çekirdekçik organize edici bölgenin (NOR) aktivasyon süresince telofazda organize olduğunu öne sürmüştür⁷⁰. Yapılan çalışmalarda NOR'ların, Zea mays'ın 6. kromozomunun spesifik bir bölgesine uyum gösterdiğinin belirlenmesi, çekirdekçiğin gen aktivitesiyle ilişkisinin olduğunun ilk olarak düşünülmesine yol açmıştır. 1950'lerde çekirdekçikte RNA'ların varlığı gösterilmiş ve 1960'larda in situ hibridizasyon teknikleri çekirdekçik organize edici bölgedeki ribozomal genlerin (rDNAs) belirlenmesine olanak sağlamıştır^{71,72}. Yine çekirdekçiğin küme halinde izolasyonu çekirdekçik komponentlerinin biyokimyasal karakterizasyonuna öncülük etmiş ve elde edilen bu bulgulara dayanılarak ribozom biyogenezisinin çekirdekçikte gerçekleştiği ileri sürülmüştür⁷³.

2.4. Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions; NORs)

Çekirdekçik oluşturan bölgeler (NORs), ilk kez Heitz (1931) ve McClintock (1934) tarafından yaptıkları çalışmalar sonucunda tanımlanmışlardır⁷⁴. Başlangıçta NOR'lar mitozun sonunda oluşan çekirdekçiğin etrafındaki morfolojik bölgeler olarak ifade edilmiştir⁷⁰. NOR'lar, 45S(18S + 5.8S + 28S) pre-ribozomal RNA gen kodlarının bir

biri ardına tekrarlanan ardışık kopyalarını içerir⁷⁵. İnsan haploid genomu, ortalama olarak 43.3 kb uzunluğunda 400 ribozomal gen ünitesi birimi içermekte olup⁷⁶ her bir ünite 13.3 kb transkribe edilebilen (18S + 5.8S + 28S) ve 30 kb transkribe edilemeyen bölgelerden oluşmaktadır⁷⁷. Akrosentrik kromozomlardaki rDNA kümelerinin heterojenitesi ve hücre tipleri klasik moleküler yaklaşımlara engel olmaktadır⁷⁸.

Sakai ve ark. (1995), rDNA genlerinin ardışık tekrar sayısının yaklaşık olarak her bir kümede 70 olduğunu belirlemişlerdir. Bu rDNA genleri, DNA topoizomeras I (Topo I), upstream binding faktör (UBF), RNA polimeraz I (RPI), ve promotor seçici faktör (SL1) gibi transkripsiyonel proteinler ile ilişki içerisinde bulunmaktadır^{79,82}. Çekirdekçik ve NOR'ların iyi bilinen Gümüş sevme (Argirofili) özelliği, AgNOR bantlama tekniğinin temelini oluşturmaktadır⁸³⁻⁸⁴.

Nonhiston proteinlerden dolayı gümüşle boyanan bu bölgeler, Ag-NOR proteinleri olarak adlandırılmaktadır³. Bunlar metafazda rDNA genlerinin etrafında ve esas olarak da interfazda çekirdekçiğin ipliksi komponentinde yerleşmekte olup, RPI ve UBF major metafaz AgNOR proteinleri olarak önerilmektedir⁸².

NOR'lar, insanlarda var olan beş çift akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22'nci çiftler) ikincil boğumu olarak nitelendirilen satellit saplarında yerleşmiş olan ve aktifken gümüş ile boyanabilen ribozomal gen bölgeleridir. NOR'lar ile ilgili olan proteinler, gümüş iyonlarını bağlayarak seçici olarak boyanabilen, asidik non-histon tipi proteinlerdir. Gümüş, transkripsiyonel olarak aktif olan ya da transkribe edilebilen rDNA bölgelerine bağlanır ve rRNA'nın non-histon proteinlerine tutulu olarak kalır⁸⁵. Aktif transkripsiyon süresince Ribozomal RNA genleri (rRNA), RNA polimeraz I ile çekirdekçikte yer alırlar. İnsan diploid hücrelerinde NOR'lar, akrosentrik kromozomların kısa kollarında ribozomal RNA (rRNA) genleri için kodlanan ve ard arda tekrarlanan çok sayıdaki ribozomal genlerin yaklaşık 300-400 kopyasını içerirler⁸⁶.

2.5. NOR Proteinleri

Hücre döngüsü süresince, döngünün en hızlı olduğu zamanda en fazla miktarda Ag-NOR proteini sentezlenmektedir⁸⁷. Nukleolin ve protein B23, çeşitli memelilerin çoğalan hücrelerindeki iki ana proteindir⁸⁸. Bu iki protein genel boyanmanın % 60-75'ini oluştururlar⁸⁹. Bunlara ilaveten Nopp 140, RNA Polimeraz-I Alt Birimleri, UBF (Transkripsiyon Faktörü) ve 135 kDa'luk AgNOR Proteinide bulunmaktadır.

2.5.1. Nukleolin (C23 Proteini)

Nukleolin, yaygın olan çekirdek fosfoproteinlerinden biridir ve çekirdekçiğin birçok fonksiyon bu proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, nukleolinin, öncü rRNA'nın başlangıç parçalanmasının gerçekleşebilmesi için zorunlu olduğu gösterilmiştir⁹⁰. Nukleolinin aynı zamanda, pol II'nin transkripsiyonel düzenlenmesinden, immünoglobulin sınıfı genlerin çalışmasına kadar uzanan çeşitli ekstrasükleer işlevleri vardır⁹¹. Nukleolin, ekspresyonu hücre siklusuna bağımlı ana bir Ag-NOR proteindir. Bu proteinin ekspresyonu onun Ag-NOR boyanma miktarına göre tespit edilebilir⁹².

Nukleolinin ekspresyon düzeyi dinlenme halindeki hücrelerde azalmaktadır⁹³. Nukleolinin ekspresyonu hücre siklusu süresince düzenlenebilir ve bunun düzenlenmesi G1/S geçişinde bir artmaya, G2/M geçişinde de muhtemelen bir azalmaya bağlıdır. Bu nedenle nukleolinin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi, hücre proliferasyon aktivitesinin değerlendirilmesi manasına gelir^{94,95}.

2.5.2. Nükleofosmin (B23 proteini, neumatrin ya da NO38)

Pre-ribozomal partiküllerin olgunlaşmasında ve nukleositoloplazmik transport işleminde görev alan, oldukça bol bulunan bir çekirdekçiğ proteinidir. Yapılan çalışmalar, B23'ün ribozomların toplanmasında bir şaperon olarak fonksiyon gösterdiğini desteklemiştir⁹⁶.

İnterfazda major AgNOR proteinlerinden biri olan protein B23, 35–40 kDa’luk moleküler ağırlığı ile ribozomal olmayan RNA’ya bağlanan bir fosfoproteindir. İnsanlarda ve ratlarda B23, en az iki izoformda sentezlenir. Bunlar; B23’ün majör nükleolar formu olan 37–38 kDa’luk B23.1 ve 35–36 kDa’luk B23.2’dir. Bu her iki izoformu, bir tek gen tarafından kodlanmaktadır. Ultra yapısal seviyede, B23 esas olarak ön-ribozomların toplandığı çekirdekçik içi bir bölge olan granüler bölgede bulunur. Aktif olarak çoğalan hücrelerde bu bölge, çekirdekçik hacminin yaklaşık olarak %60’ını oluşturur. Halbuki çoğalmayan hücrelerde (insan periferik kan lenfositlerinde olduğu gibi) bu bölge önemli ölçüde küçülmüştür. Bu nedenle B23, hücre proliferasyon hızını göstermek için güvenilir bir immünohistokimyasal markıdır. Dolayısıyla nükleofosmin miktarının tespit edilmesi, çeşitli hastalıklarda tanı ve hastalığın seyrini tahmin etmeye yardımcı olabilir⁹⁷.

2.5.3. Nopp 140

Çekirdekçik fosfoproteinlerinden bir diğeri Nopp 140 dır. Yapılan bir çalışmada, Nopp 140’ın small nucleolar ribonucleoproteinler (snoRNPs)’nin komponentleri olan çekirdekçik fibrilların proteini ve NAP57’nin sadece çekirdekçiğe değil, aynı zamanda katlanmış cisimciklere (coiled body) rehberlik ederek, her iki yapı arasında fonksiyonel bir bağlaç olarak görev aldığı gösterilmiştir⁹⁸. Yine diğer çalışmalarda ise çekirdekçik ve katlanmış cisimcikler arasında snoRNPs⁹⁹ ve small nuclear ribonucleoproteinler (snRNPs)¹⁰⁰ için bir trafik akışının olduğu gösterilmiştir.

2.5.4. RNA Polimeraz-I Alt Birimleri

180 kDa’luk AgNOR proteini, RNA polimeraz-I’in en büyük alt birimidir. RNA polimeraz-I’ler, transkripsiyon ve transkripsiyonun inaktif olduğu durumlarda çekirdekçiklerdeki boyanmaya katılabilirler. Ribozomal genlerle birleşmiş olan mitotik

AgNOR proteinleri, interfaz süresince AgNOR boyamanın temel düzeyini oluşturmaktadırlar⁸².

2.5.5. UBF (Transkripsiyon Faktörü)

RNA polimeraz-I'in transkripsiyon faktörü olan 97–94 kDa'luk bir proteindir. RNA polimeraz-I yukarı kanat bağlanma faktörü 'nün mitoz boyunca ribozomal genlerle birleşmiş olarak kaldığı bilinmektedir⁸².

2.5.6. 135 kDa'luk AgNOR Proteini

Kromozomal ekstraktlar, 135 kDa'luk bir AgNOR proteini içerirler. Bu protein oldukça fosforlanmış olup, AgNOR proteini olarak önerilen ilk proteindir. Bu protein NOR'ların temel bir bileşenidir ve proliferasyonun bir markır'ı olduğu öne sürülmektedir fakat fonksiyonu tam olarak tüm boyutuyla aydınlatılmış değildir⁸².

2.5.7. Tümör Patolojisinde İnterfaz AgNOR'ları

Tümör patolojisinde AgNOR parametresinin ilk uygulaması Ploton ve ark. tarafından yapılmıştır¹⁰¹. Bu araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda insan prostat kanser hücrelerinin yüksek miktarda AgNOR proteinleri ile karakterize edildiğini göstermişlerdir. Bu öncü çalışmadan sonra, interfaz AgNOR proteinlerinin farklı yayılmalarını temel alarak, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran birçok çalışma yapılmıştır. Bu nedenle kanserli hücreleri kanserli olmayan hücrelerden ayırmada interfaz AgNOR proteinleri sıklıkla kullanılabilir⁷⁴. Melanokarsinomlar ve neoplastik hücreler (hem metastatik karsinoma hem mezotelioma) ve insan plöral effüzyonlarındaki reaktif hücreler arasında, interfaz AgNOR proteinlerinin değerleri açısından hiç bir örtüşme bulunamamıştır¹⁰². Tümör patolojisinde AgNOR parametrelerinin en verimli uygulaması ise kanser hastalığının seyrini tanımlamak amacıyla yapılmaktadır. İnterfaz AgNOR değerlerindeki değişikliklerin, akciğer ve

karaciğer kanserli hastalardaki tümör kütleindeki hızlı artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir^{103,104}. AgNOR tekniğinin benign ve malign lezyonları ayırt etmek amacıyla çok çeşitli neoplastik lezyonların patolojik materyalleri üzerinde başarıyla uygulandığı iyi bilinmektedir^{105,106}.

AgNOR proteinleri birçok kanser türünde hücresel proliferasyonun bir indikatörüdür⁵⁻⁷. Bu bölgelerin aktiviteleri direk olarak protein sentezi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktif NOR sayıları, artan hücresel aktiviteyle artar. Burada bahsedilen metodu kullanarak yapılmış olan daha önceki çalışmalarda, ortalama AgNOR sayısı ve TAA/ÇA oranının papiller tiroid kanserinde benin tiroid nodüllerine göre anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir⁶. Aynı zamanda yeni bir yaklaşım olarak total AgNOR alanının total çekirdek alanına oranının (TAA/ÇA oranının tespitinin) malin ve benin tiroid lezyonlarda hücrelerin proliferasyon aktivitesinin tespiti için oldukça uygun bir metod olduğu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceği tespit edilmiştir^{5,6}. Diğer bir çalışmada bu yeni yaklaşımla elde edilen cut-off değerlerinin Foliküler Adenom ve Foliküler Tiroid karsinomunun cerrahi öncesi ayırımına yardım edebileceği ve rutin sitopatolojiye katkı sunabileceği bildirilmiştir⁸. Buna ilaveten ince iğne aspirasyon biyopsisinde örneğin doğru lokalizasyondan alınıp alınmadığını tespit etmek amacıyla, normal tiroid dokusundan benin nodülleri ayırmak için bir cut-off değeri elde edilmiştir⁷.

Prostat kanseri; hücre kinetiği çalışmak için kullanılan yöntemler olan Tritium-etiketli histootoradyografi, AgNOR boyama tekniği ve Ki67MIB-1 immünohistokimyasal tekniklerinin kullanımı ile, yavaş, orta ve hızlı proliferasyon yapan tümörler olarak gruplara ayrılabilir. Bu teknikler klasik histoloji ve sitolojiye ilaveten düşük, orta ve yüksek dereceli derecelendirmelerin yapılabilmesi için önemli tamamlayıcı yöntemlerdir ve ön koşullar olarak karşımıza çıkmaktadır¹⁰⁷.

Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge doku belirteçleri olan Bcl-2 ve p53'ün ekspresyonundaki değişikliklerle ve DNA üzerinde gümüş boyalı çekirdekçik düzenleyici bölgelerin (AgNOR) varlığı ile prostat adenokarsinomalarında belirtilir. Kanseri oluşumunu teşvik eden ve baskılayan mekanizmaların hesaba katılması ile kanser evresi ve derecesi ile ilişkilendirilebilecek bir matematiksel modelin geliştirilmesi, hastalık davranışını incelemek için yararlı olacaktır. Bununla birlikte 17 hastanın adenokarsinom biyopsi örnekleri kullanılarak yapılmış olan bir çalışmada proliferasyonun bir markırı olarak Bcl-2 ve AgNOR, apoptozisin markırı olarak da p53 kullanılarak geliştirilen bir matematiksel model anlamlı derecede Gleason skoru, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) sınıflandırması ve serumdaki prostat spesifik antijen düzeyi ile korelasyon göstermiştir. Oysa her bir doku markırı yalnız başına tüm bu ölçümlerle korelasyon göstermez¹⁰⁸.

Prostat hastalıkları morbidite ve mortalitenin ana nedenlerinden biridir. Hastalığın erken dönemlerinde tespit edilmesi ve etkili tedavi stratejisinin yönetilmesi önemli bir gereksinimdir. Prostat spesifik antijen (PSA) çok hassas olmadığından hastalığın tanı ve seyri hakkında bilgi elde edebilmek için başka tekniklere gereksinim vardır. Yapılan bir çalışmada prostatik lezyonlardaki AgNOR'un rolü ve serum PSA ile korelasyonu incelenmiştir. Bunun için 1 yıldan daha fazla süredir prostat hastalığına sahip olan 60 hasta değerlendirilmiştir. Hastalar benign prostatik hiperplasia (BPH), prostatit veya prostatik adenokarsinoma (PKa) olarak 3 gruba ayrılmıştır. BPH ve Prostatit'in ortalama AgNOR sayıları arasında BPH ve PIN arasındaki gibi istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Düşük ve yüksek dereceli PIN arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur. Prostatik adenokarsinomanın AgNOR sayısında, benign hastalıklardan anlamlı derecede artış tespit edilmiştir. Aynı zamanda lokalize ve metastatik karsinoma arasında da anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Serum

PSA değerleri ile AgNOR sayıları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. ($p < 0.001$)¹⁰⁹.

Yaşları 60-75 arasında değişen prostat kanseri (PKa) hastalarından otuz beş iğne biyopsisi incelenmiştir. Yapılan alışma sonucu en yüksek AgNOR sayımı kötü diferansiye karsinomalarda bulunmuş olup (9,81), bu değer, iyi diferansiye karsinomda (5,3), Duktal karsinomalarda (7,61) orta derecede diferansiye karsinomlarda (7,35) olarak bulunmuřtur¹¹⁰.

Prostatik lezyona sahip 50 hasta kullanılarak yapılan bir çalışmada en yüksek AgNOR sayısı (4,3-5,4/Hücre) adenokarsinomada bulunmuřtur¹¹¹.

Malignant hastalıklardan paramalignantları ayırmak için 185 prostatik ince iğne biyopsisini içeren bir diğer çalışmada, AgNOR alanının maligniteye bağlı olarak arttığı gsterilmiştir¹¹².

Prostat kanserli 26 hastanın parafine gömülmüş ve formalinde fikse edilmiş biyopsi örnekleri üzerinde yapılan çalışmada, AgNOR oranı, yüksek Gleason histological derecelendirilmesinde (7,5) düşük Gleason histological derecelendirilmesine (5) göre anlamlı derecede yüksek bulunmuřtur¹¹³.

Prostat kanserli 65 hastanın parafine gömülmüş ve formalinde fikse edilmiş çekirdek iğne biyopsileri ile yapılan çalışmada maliniteye bağlı olarak AgNOR miktarında anlamlı değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir¹¹⁴.

104 hastaya ait Prostatın benign, prenoplastik ve neoplastik lezyonlarında arjirofilik nucleolar organizatör bölgeler için incelenmiş ve kontrol grubunda lezyonlu gruba göre AgNOR miktarı daha düşük olarak bulunmuřtur¹¹⁵.

50 prostat latent kanseri ve 50 prostat klinik kanserinde hücre proliferasyon aktivitesinin bir göstergesi olan AgNOR, topoizomeraz II-alfa, Ki-67, alpha-methylacyl-CoA

racemase belirteçlerinin kullanılması ile yapılan bir çalışmada latent kanserlerin proliferasyon aktivitesi, klinik kanserlerden daha düşük olarak bulunmuştur¹¹⁶.

Tedavi almış ve prostat kanseri nedeniyle ölmüş 29 hasta değerlendirilmiştir. Tedavi öncesi 25 hastanın ve endokrin tedavisi süresince 10 hastanın doku biyopsisi otopsi örnekleriyle karşılaştırılmıştır. Öntedavi uygulanmış biyopsi örneklerinden otopside elde edilmiş biyopsi örneklerine doğru gidildikçe AgNOR ların sayısında istatistiksel olarak artış tespit edilmiştir. Buna ilaveten ön tedavi sonrası AgNOR'ların sayısı ile sağkalım arasında bir korelasyon olmamasına rağmen, endokrin tedavisi sonrası sistemik progresyonlu hastalardaki sağkalım arasında ters bir ilişki tespit edilmiştir¹¹⁷.

İlerlemiş prostat kanserli 50 hastanın biyopsi materyali ile yapılan çalışmada yüksek ve düşük dereceli hastaların AgNOR sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. AgNOR skorlarının intratümoral heterojeniteleri anlamlı olarak tespit edilmiştir¹¹⁸.

Normoglandular prostatik dokulu (10), hiper plastik prostatik dokulu (10) ve çeşitli derecelerdeki prostatik karsinomalı (74) 94 hastanın biyopsi örneğinden yapılan çalışmada, düşük derecelilerle kıyaslandığında yüksek dereceli farklılaşmış prostat kanserli bireylerde AgNOR sayısında bir artış tespit edilmiştir. Dahada ötesi gruplar arasındaki AgNOR değerleri anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($P < 0.001$)¹¹⁹.

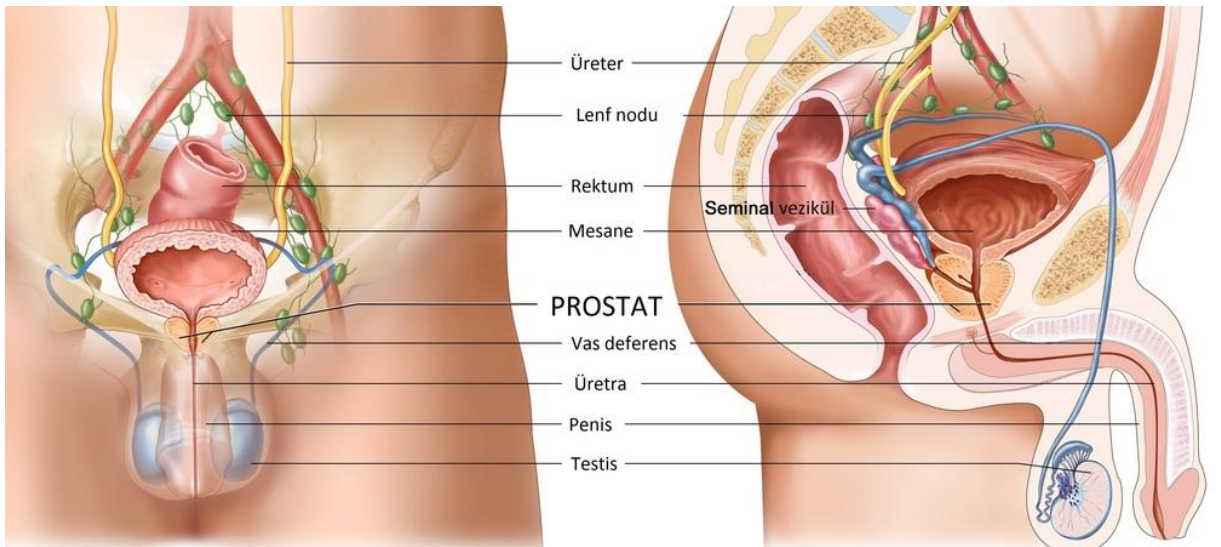
30 benin prostatik hiperplazili, 17 latent prostatik karsinomalı, 50 klinik karsinomalı ve 7 malignant lezyonlu prostatik karsinomalı hastalarda yapılan çalışmada AgNOR sayısı, AgNOR lekelerinin alanı ve AgNOR pozitif boyalı lekelerin rölatif skorları arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Bununla beraber infiltrativ lezyonlarda olmayanlara göre istatistiksel olarak yüksek sayıda AgNOR sayısı tespit edilmiştir¹²⁰.

Transrektal prostat aspirasyonlu 90 hastada (bunlardan 81'i aynı zamanda histolojik olarak değerlendirilmiştir) AgNOR boyama yapılarak bunların sayıları ve ölçümleri bir

interaktif image analiz sistemi ile yapılmıştır. Rutin tümör tanısındaki sensitivite %96 ve spesivitede %97 olarak bulunmuştur. Bu çalışmayla ucuz bir yöntem olan AgNOR boyama ile benin prostatik lezyonlardan karsinomatöz lezyonların ayrımı yapılmıştır¹²¹.

2.6. Prostat

Prostat derin pelviste yerleşik kapsülle çevrili şekli cevize ya da ters bir koniye benzeyen fibromusküler ve glandüler bir organdır. Genç erişkinlerde ortalama yaklaşık olarak 20 ml hacimde, 4 cm genişliğinde, 3 cm yüksekliğinde, ve 2.5 cm kalınlığındadır. Superiordan mesaneye, inferiordan ise eksternal üriner sfinkter ve membranöz üretraya bağlanır. Prostatın bazal kısmı mesaneyle komşu olan bezin superior kısmıdır, apeks ise inferior sınırına karşılık gelir. Prostatın posterior yüz, anterior yüz ve iki adet inferolateral olmak üzere dört yüzü vardır. İnferolateral yüzler konveks biçimlidir ve levator ani kaslarının medial kenarları ve endopelvik fasya ile ilişkilidir. Posterior yüz rektumla komşudur ve rektumdan Denonvilliers' fasyasıyla ayrılır. Denonvillier's fasyası anterior rektal duvarla prostatın ve seminal veziküllerin posterior yüzü arasında yer alır (Şekil 2.3)¹²². Bu fasya prostat kanserinin posterior yayılımını engelleyen bir bariyere benzer¹²³.



Şekil 2. 3. Prostat anotomisi¹²⁴

2.6.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PKa) prostat bezinin habis bir tümörüdür. ABD’de erkeklerde ikinci sıklıkta görülmekte olup, her yıl kanser tanısı konulan üç erkekten biri prostat kanseridir. Prostat kanseri hastanın hem kendi hayatını hem de yakınlarınınkini etkileyen ve baş edilmesi zor bir hastalıktır. Hastalar ailelerini kaybetmekten, iş ve günlük aktivitelerini sürdürememekten korkmaktadırlar. Tedaviler, yan etkiler, hastanede yatma süreleri de bu korku ve endişeye katkıda bulunmaktadır¹²⁵.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

1. Etüv (Thermo Scientific)
2. Karbondioksitli (CO²) 'li inkübatör (SANYO)
3. Santrifüj (Heraeus)
3. Su banyosu (PolySciencet)
4. Vorteks (IKA MS1)
5. Mikroskop (Olympus, CX41)
6. Mikroskop atasmanlı renkli dijital kamera video kamera ZEISS AxioCam ICc5 model)
7. Bilgisayar (DELL Optiplex 3020)
8. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
9. Fotomikroskop (Olympus)
10. Manyetik karıştırıcı (IKA cMAG HS7)
11. Laminar air flow kabin (NÜVE LN 120)
12. Hassas terazi (RADWAG AS 220/C/2)
13. Derin dondurucu (Ugur Derby)
14. Buzdolabı (Arçelik)
15. Otomatik pipet (Socorex Swiss, 1000µL)
16. Zaman ayarlayıcı
17. pH metre (Ino Lab)
18. Invert Mikroskop (WESCO)
19. Vortex (BiöCote Staurt)
20. Bilgisayar yazıcısı (Samsung CLP-315)

21. Bidistile su cihazı (PURE LAB flex)

22. Mikrotom (Shandon Finesse ME)

23. Isıtıcı tabla (Barnstead/Labline)

Sarf Malzemeler

1. İnsan Prostat Kanser Hücre Hattı PC-3 (ATCC® CRL1435™)

2. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)

3. Metanol (Merck, 502K5275408)

4. Lamel yapıştırıcı (Entellan, Merck, 640171987)

5. İmmersiyon yağı (imersiol, Merck, 09406599)

6. DMEM besi ortamı

7. Hidroklorik Asit (HCL, Merck, 0070135)

8. Ksilol (Carlo Erba, 492306)

9. AgNO₃ (Gümüş Nitrat) (Merck, 30474310228)

10. Etanol (Merck, K21078586)

11. Jelatin (Merck, 39166778-839)

12. Formik asit (Merck, K39189264836)

13. pH Universal _ndikatör pH 0-14 (Merck)

14. Distile su

15. Çesitli cam laboratuvar malzemesi

16. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü (Grainer, polystrene)

17. Filtre kâğıdı (Whatman Filter Papers 25mm)

18. Enjektör 2ml, 5ml, 10ml (Sterijen)

19. Pastör pipeti

20. Lam (Objektträger)

21. Lamel (Menzel-Glasser 24x32mm)

22. Alüminyum Folyo

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında ticari olarak alınan Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) kültüre edilerek, logaritmik üreme fazında olan aktif hücreler 5 gruba ayrılmıştır.

Bu hücrelerden ilk gruba hiçbir madde uygulanmazken, kültür kaplarında (T75,75 cm²) %80-90 oranında aktif hücrelerin bulunduğu diğer 4 gruba farklı dozlarda (25µm, 50 µm, 100 µm, 200 µm) kapsaisin uygulaması yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen gruplarımız aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

- 1) Hiçbir madde uygulanmamış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™)
- 2) 25 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™)
- 3) 50 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™)
- 4) 100 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™)
- 5) 200 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™)

Bu grupların her biri için ayrı ayrı yayma preparatlar hazırlanıp, hazırlanan bu yaymalar havada kurutularak metanolde fikse edilip, Ag-NOR boyama işlemi uygulanmış ve insan prostat kanseri hücre (PC3) hattındaki hücrelerde AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı / Çekirdek alanı değerleri bir bilgisayar programı (ImageJ version 1.47t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) kullanarak hesaplanmıştır.

3.2.2. Prostat Kanseri Hücresi Olan PC-3 Hücre Hattının (ATCC® CRL1435™) Kültüre Edilmesi

Çalışma hipotezine uygun olarak hücre kültürü protokolleri Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında ticari olarak alınan Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) kültüre edilmiştir. Prostat kanser hücrelerinde kapsaisin molekülünün farklı zaman dilimlerinde farklı konsantrasyonlarının AgNOR proteinlerinin üzerindeki etkilerini araştırmak ve etki mekanizmasını belirlemek üzere ticari olarak alınan PC-3 hattı (ATCC® CRL1435™) kullanılmıştır. AgNOR boyama tekniği ile boyanmış prostat hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarına göre ortalama AgNOR sayısı ve AgNOR alanı / Çekirdek alanı değerleri ölçülmüştür.

Temin edilen hücreler temin edilen kriyotüpler içinde saklandıkları (-80°C) derin dondurucudan çıkarılarak 37°C'deki steril su banyosunda kısa sürede çözündürülmüş ve olası kontaminasyonu önlemek için tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar akımlı steril bir kabinde işleme tabi tutulmuştur.

Tüp içerisindeki hücreler, içinde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 non-essansiyel aminoasit olan hücre üremesine uygun DMEM besi ortamı ile T75 cm²'lik hücre kültürü üretim kabında (flask) yerleştirilip, Laminar kabinden alınarak 37°C'deki %5 karbondioksit (CO₂) ortamındaki etüvde inkube edilmiştir. Dondurmayı takiben ilk kez çözülmüş olan hücrelerin besiyerleri ertesi gün değiştirilerek tazelenmesi gerekmektedir. Daha sonraki değişimler hücre büyüme insidansına göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Tam konfluent olan hücreler, uygulama yapılması amacıyla Tripsin/EDTA (Lonza, İsviçre) kullanılarak subkültüre edilip, bir kısmı da %10 dimetil sülfoksit (DMSO) (D2650, Sigma, St. Louis, USA) dondurma vasatıyla dondurularak saklanmıştır.

Logaritmik üreme fazında olan, kültür kaplarında (T75,75 cm²) %80-90 oranında aktif hücrelere optimal konsantrasyonu belirlemek amacıyla farklı dozlarda (25 uμ, 50 uμ, 100 uμ, 200 uμ) kapsaisin uygulaması yapılmıştır. Farklı inkubasyon sürelerini tamamladıktan sonra, trypan blue ile hücre sayımı yapılmış ve MTT testi canlılık analizleri ile değerlendirilmiştir.

Prostat hücrelerine en etkin ve toksik olmayan uygun konsantrasyonun bulunması ile, T75 flasklarda eşit sayıda olan hücre gruplarına uygulama yapılmış ve AgNOR tekniği ile boyamaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Prostat Kanseri Hücresi Olan PC-3 Hücre Hattı (ATCC® CRL1435™) Hücrelerinden Preperat Hazırlanması ve Fiksasyon Aşaması

Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) kültüre edilerek, Logaritmik üreme fazında olan 5 gruba ayrılan aktif hücrelerden her biri için daha önceden metanol/asetik asit solüsyonu içerisinde ve soğukta bekletilmiş olan temiz lamalar kullanılarak yayma preperatlar hazırlanmıştır. Her bir grup için ayrı ayrı hazırlanan bu preperatlar, oda sıcaklığında havada kurutulmuştur. Daha sonra metanolde 10 dakika fikse edilerek Prostat kanser hücrelerinin lama sabitlenmesi sağlanmıştır.

Kullanılan Çözeltiler

% 50'lik AgNO₃ Çözeltisi

1g AgNO₃'ün 2 ml enjeksiyonluk bidistile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan bu çözelti kullanım aşamasına kadar +4 °C' de ve karanlıkta saklanmıştır.

% 1'lik Formik asit Çözeltisi

1ml formik asitin üzeri distile su ile 100ml' ye tamamlanıp homojen dağılımı sağlanarak hazırlanmıştır.

% 2'lik Jelatinli Formik asit Çözeltisi

Oda sıcaklığında 98 ml % 1'lik formik asit içinde 2g jelatinin manyetik ısıtmalı karıştırıcı yardımıyla çözünmesiyle (% 2'lik jelatin) elde edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kâğıdından süzülerek kullanım aşamasına kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

Gümüş Boyama Çözeltisi

Daha önce hazırlamış olduğumuz % 50'lik AgNO₃'den 1 ml (iki hacim) % 2'lik Jelatinli Formik asit'den 0.5 ml (bir hacim) alınarak, ışıktan korumak için etrafı alüminyum folyo ile kaplanmış bir tüp içerisinde pastör pipeti yardımıyla karıştırılarak hazırlanmıştır. Gümüş Boyama solusyonu her kullanımda yeniden hazırlanmıştır.

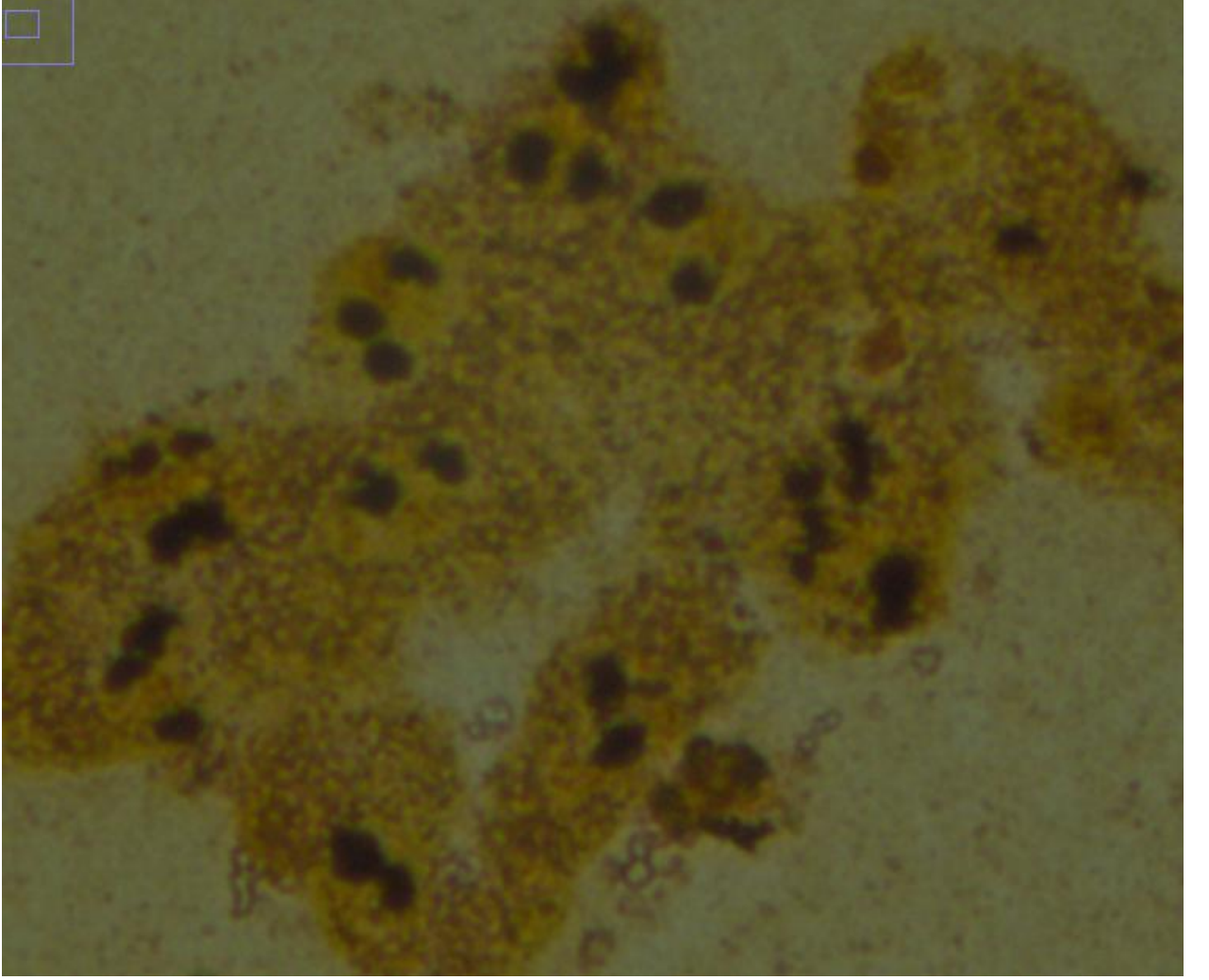
AgNOR Boyama İşlemi

Kapsaisin uygulanmış insan prostat kanseri hücre (PC3) hattından elde edilen preparatlar Benn-Perle ve Lindnerin protokolunun hafif modifiye edilmiş hali ile AgNOR boyamaya tabi tutulmuştur^{126,127}.

Bizim kullandığımız bu yöntemde, sıcaklık 37⁰C'ye çıkarılırken süre 15 dakikaya düşürülmüştür. Prostat kanseri hücrelerini içeren preparatlar ilk önce 10 dakika metanolde bekletilerek fiksasyon sağlanmış ve daha sonra oda sıcaklığında havada kurutulmuştur. Havada kurutulan preparatlar daha sonra içinde nemli ortam oluşturmak amacıyla su ile ıslatılmış kurutma kâğıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirilmiştir.

Preparatların üzerine daha önceden boyama amacıyla hazırlamış olduğumuz gümüş boyama solüsyonundan pastör pipeti ile preperattaki hücre yoğunluğu göz önünde bulundurularak 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır. Sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılmış ve 37 ⁰C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15. dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile

yıkanmış ve kurutma kağıdının üzerinde beklemeye alınmıştır. Sonuçta tüm preparat üzerindeki bütün bölgelerde hedeflediğimiz kalitede homojen AgNOR boyalı Prostat kanseri hücrelerini içeren preparatlar elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. AgNOR boyama işlemi yapılmış prostat kanser hücreleri

3.2.3. Gruplara Göre Tiroid Hücrelerindeki İnterfaz NOR Aktivitelerinin Değişiminin Değerlendirilmesi

Hiçbir madde uygulanmamış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™), 25 µM konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™), 50 µM konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™),

100 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ve 200 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattına ait (ATCC® CRL1435™) hücrelerdeki interfaz NOR aktivitelerinin değişimini tespit etmek için, AgNOR boyama işlemi uygulanmış her bir preparattan 100 interfaz çekirdeği incelenmiştir. Her üç grupta tiroid hücrelerinin interfaz NOR aktivitelerinin değişimi kamera ataçmanlı ışık mikroskobu ve bir bilgisayar programı yardımı ile değerlendirilmiştir.

3.2.4. Kamera Ataçmanlı Işık Mikroskobu Yardımı ile İnterfaz NOR'larının Analiz İşlemleri

Belirlenmiş olan gruplara göre interfaz NOR aktivitelerindeki değişiklikleri tespit etmek amacıyla, AgNOR boyama protokolüne göre boyanmış olan her bir preparattan 100 interfaz alanı, doğrudan kamera ataçmanlı bir ışık mikroskobu altında ve yüksek büyütmede (1000X) incelenmiştir. Gümüşle boyalı Prostat kanseri hücrelerinin (PC3) interfaz çekirdekçiğinin hücre çekirdeğine oranı şeklinde, özel bir bilgisayar programı olarak hazırlanmış görüntü analizi yardımı ile ölçülmüştür. Buna ilaveten her bir bireyin 100 hücresindeki AgNOR sayıları sayılarak Ortalama AgNOR sayı değerleri hesaplanmıştır. Bilgisayarda ölçüm işlemleri için aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilmiştir.

3.2.5. Bilgisayarda İnterfaz NOR'larının Ölçüm İşlemleri

Prostat kanseri hücre Gruplarına göre, hücrelerdeki interfaz NOR aktivitelerinin değişimini değerlendirmek için, AgNOR boyalı her bir preparattan 100 interfaz alanı aşağıdaki basamaklar takip edilerek değerlendirilmiştir.

3.2.5.1. Prostat Kanseri Hücre Görüntülerinin Elde Edilmesi

Analiz işleminde kullanılacak olan Prostat kanseri hücre çekirdeklerinin görüntüleri kamera ataçmanlı bir ışık mikroskobundan (100 x 10 büyütme) bilgisayar ortamına bir video kamera (LEICA DFC 420 C model) aracılığı ile aktarılmıştır (Şekil 3.2, 3.3). Kameradan alınan görüntüler, üzerinde analiz işlemi yapılmak üzere jpg türü resim formatında bilgisayara kaydedilmiştir.



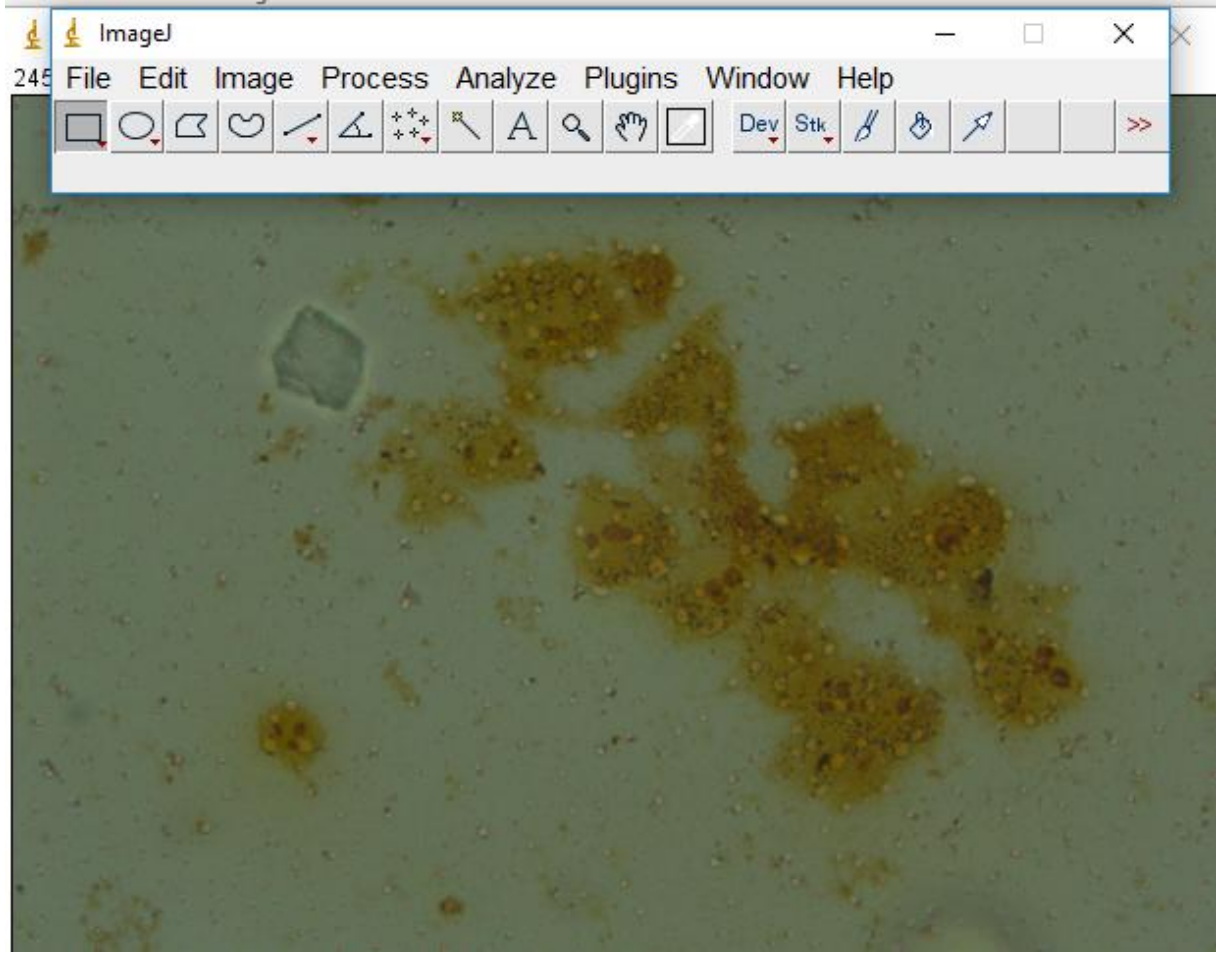
Şekil 3. 2. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu ve bilgisayar düzeneği



Şekil 3. 3. Analiz işleminde kullanılan kamera ataçmanlı ışık mikroskobu

3.2.5.2. Elde Edilen Görüntülerin Analiz İşlemi

Standardize edilen görüntüler aynı programla (ImageJ version 1.47t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) analiz edilmişlerdir. Analiz işleminde kullanılan programın görüntüsü Şekil 3.4’de görülmektedir.

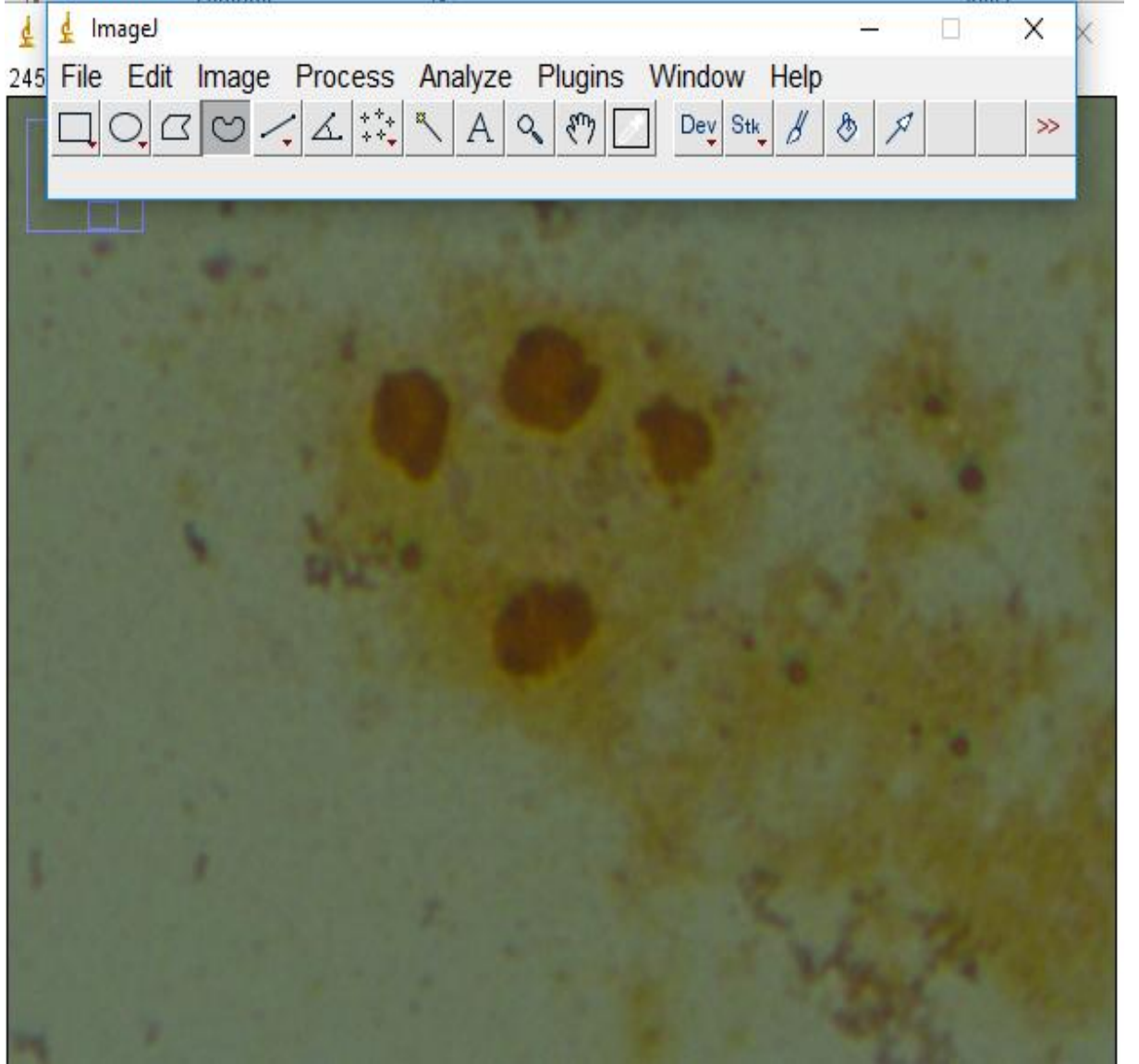


Şekil 3. 4. Analiz isleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan prostat kanseri hücreleri

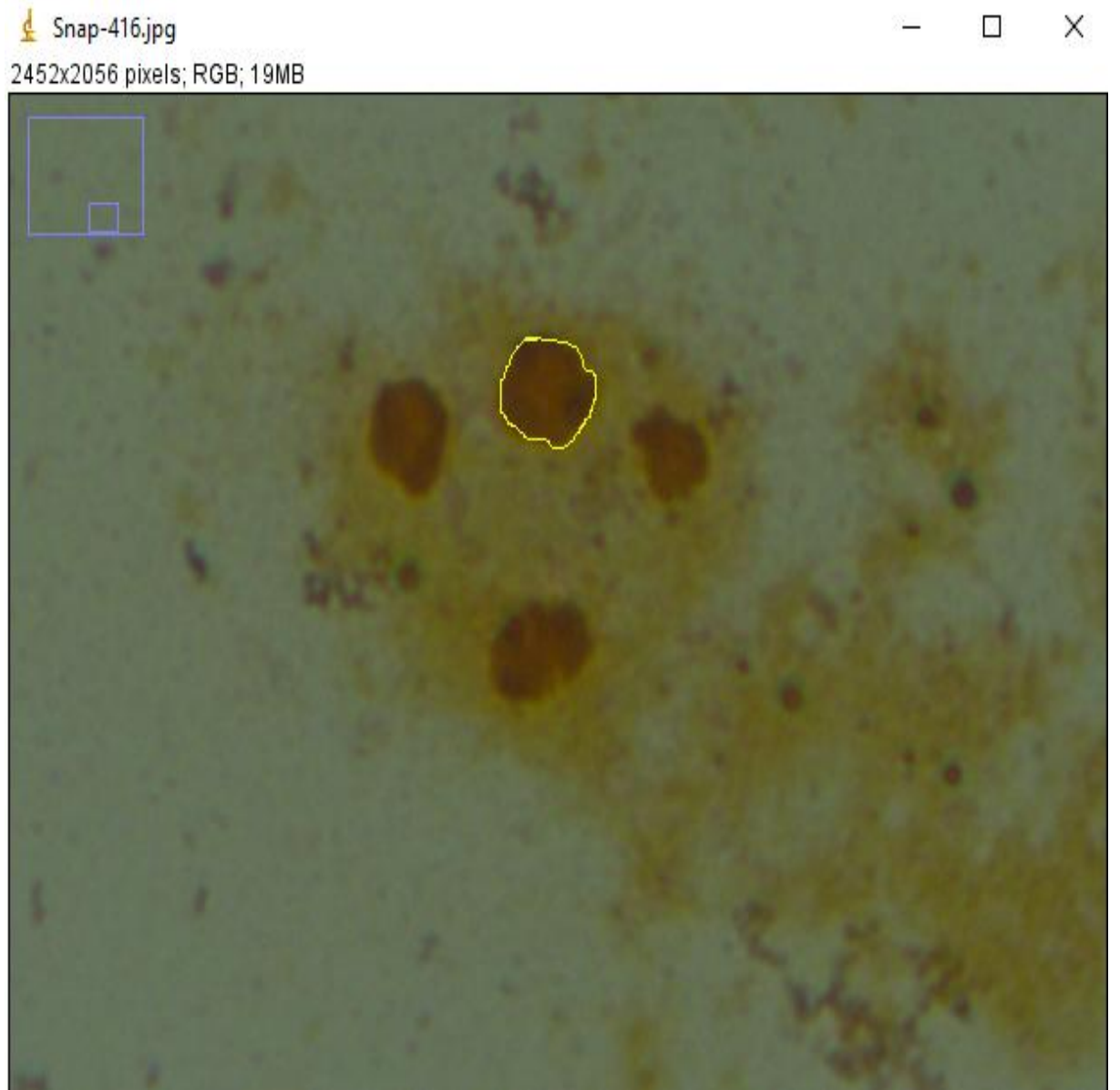
3.2.5.2. 1. NOR Bölgelerinin Belirlenmesi

Analiz programı yardımıyla NOR içeren bölgelerin seçimi “freehand selection” paneli kullanılarak yapılmıştır. Bu yolla seçilen bölgeler dışında NOR bölgesi olduğu düşünülmeyen fazla seçilmiş diğer bölgeler ise programın sunduğu çeşitli araçlar sayesinde seçime dahil edilmemiş seçimin dışında bırakılmıştır. NOR bölgelerinin belirlenmesinde bilgisayar programı yol gösterici olarak kabul edilip analiz yapan kişinin kararları esas alınmıştır (Şekil 3.5, Şekil 3.6), NOR bölgeleri belirlenmiş bir prostat kanseri hücre çekirdeğini göstermektedir. Daha sonra tespit edilen bu NOR bölgeleri hesaplanarak, çekirdek alanının belirlenmesine geçilmiştir (Şekil 3.7). NOR

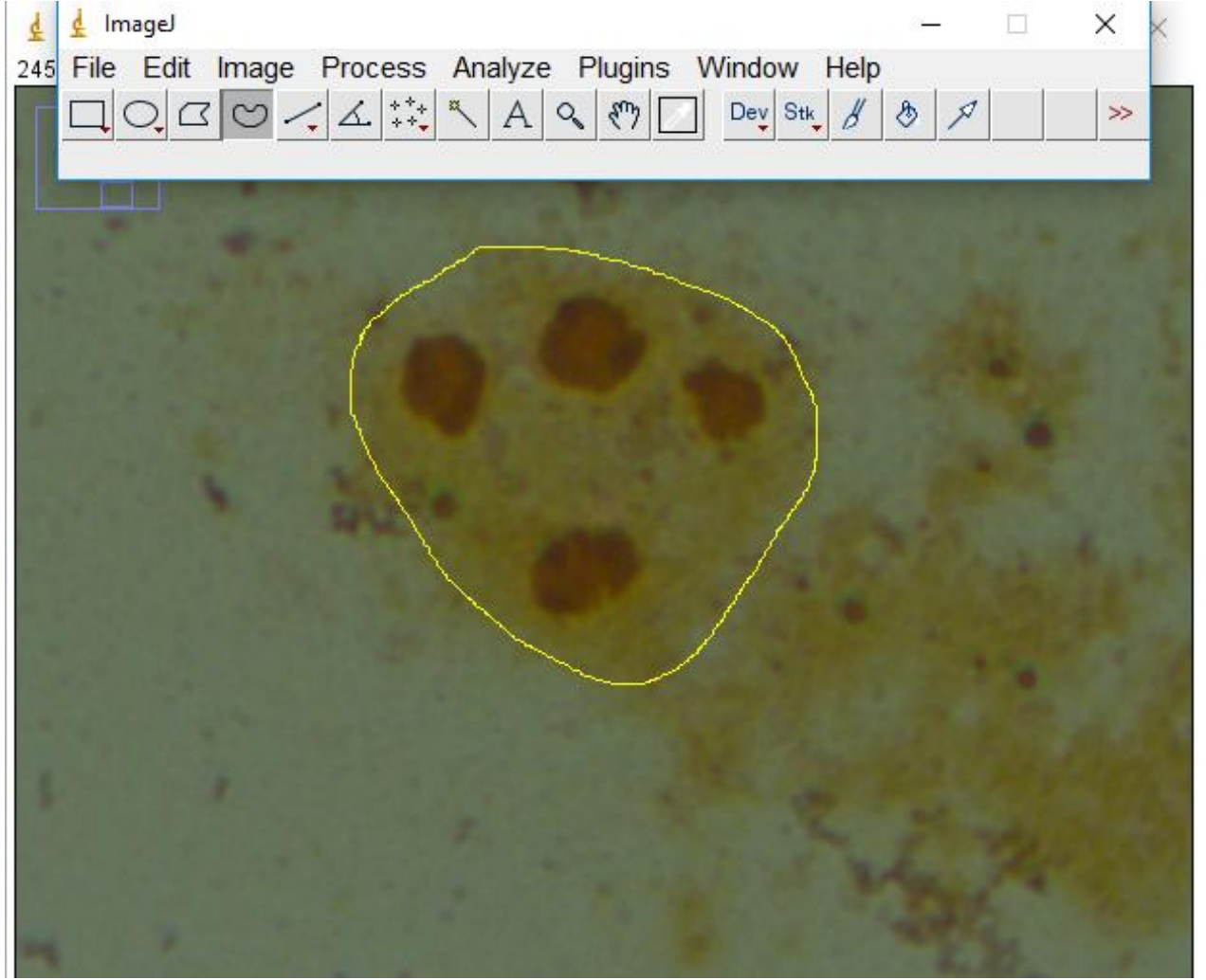
bölgeleri hesaplanmış bir prostat kanseri hücre çekirdeği Şekil 3.8’de görülmektedir. Her bir grup için ortalama AgNOR sayıları basitçe sayılıp, her bir bir prostat kanseri hücresi için ayrı ayrı kaydedilmiştir.



Şekil 3. 5. Analiz programında freehand selection panelinin aktif hale getirilmesi



Şekil 3. 6. NOR bölgeleri belirlenmiş bir prostat kanseri hücre çekirdeği



Şekil 3. 7. Çekirdek alanı belirlenmiş bir prostat kanseri hücre çekirdeği

3.2.5.2. 2. Prostat Kanseri Hücre Çekirdek Alanının Belirlenmesi

Çekirdek alanının belirlenmesi için de NOR bölgesinin belirlenmesine benzer bir yol izlenerek yine “freehand toll” paneli kullanılmıştır. Özellikle sitoplazma gölgesi bulunduran bazı görüntülerde çekirdeğin ayırt edilmesi oldukça güç olması nedeniyle bu tür görüntülerde çekirdeğin sınırları dikkatli bir şekilde elle çizilip, programın belirlenen alanı çekirdek bölgesi olarak görmesi sağlanmıştır. Şekil 3.7 ve Şekil 3.8 çekirdek ve NOR bölgeleri belirlenmiş bir bir prostat kanseri hücre çekirdeğini göstermektedir.

Results

	Area	Mean	Min	Max
1	1734	51.074	40	83
2	2203	50.955	40	77
3	1258	52.256	41	75
4	1978	50.242	38	69
5	35419	71.311	38	99

ImageJ

File Edit Image Process Analyze Plugins Window Help

Text tool (double-click to configure)

Şekil 3. 8. Çekirdek ve NOR bölgelerinin hesaplama sonucu

3.2.5.2. 3. Ölçütlerin Hesaplanması

Çalışmamızda değerlendirme ölçütü olarak, total NOR yüzey alanının bütün çekirdek yüzey alanına oranı kullanılmıştır. Bu parametrenin hesaplanması için kullandığımız bilgisayar programı sayesinde öncelikle NOR bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı ve çekirdek bölgesi olarak belirlenen bölgedeki nokta sayısı (pixel) hesaplanarak, içerisine NOR bölgesinin de dahil olduğu çekirdek alanına göre NOR alanının yüzde oranı hesaplanmıştır (Şekil 3.8).

3.3. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Günümüzde biyoistatistik analizler için Windows tabanlı programlardan Sosyal Bilimlerde İstatistik Paketi (SPSS) kullanılır. Gruplara göre interfazdaki NOR alan oranı ortalaması ve ortalama NOR sayıları tespit edildikten sonra bu değerlerin her biri için grupları birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırmak için SPSS 17,0 istatistik programı kullanılmıştır.

Bütün veriler bilgisayar ortamında SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Araştırmanın tüm verileri için öncelikle tanımlayıcı istatistikler uygulanmıştır. Ölçümle belirlenen değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama ve standart sapma şeklinde verilmiştir. Kullanılan verilerin öncelikle normal dağılıma uygunluk testleri (Shapiro-Wilk testi) yapılmıştır. Yapılan testler sonucu verilerin normal dağılım göstermediği ($p < 0,05$) saptanmıştır. Veriler normal dağılım göstermediğinden dolayı istatistiksel analizde non-parametrik testler yapılmasının uygun olacağı belirlenmiştir. Bunun için ikili kıyaslamalarda Mann-Whitney U Testi, ikiden fazla kıyaslamalarda Kruskal–Wallis Testi kullanılmıştır. Elde edilen 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi (p değeri) 0,05 olarak kabul edilmiştir.

Buna göre NOR alanı ortalaması açısından hiçbir şey uygulanmamış prostat kanser hücre hattını içeren grup ile farklı dozlarda madde uygulanmış prostat kanser hücre hattını içeren gruplar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Daha sonra ise her bir grup birbiriyle ikili olarak karşılaştırılmıştır. AgNOR sayısı açısından da yine aynı gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır.

4. BULGULAR

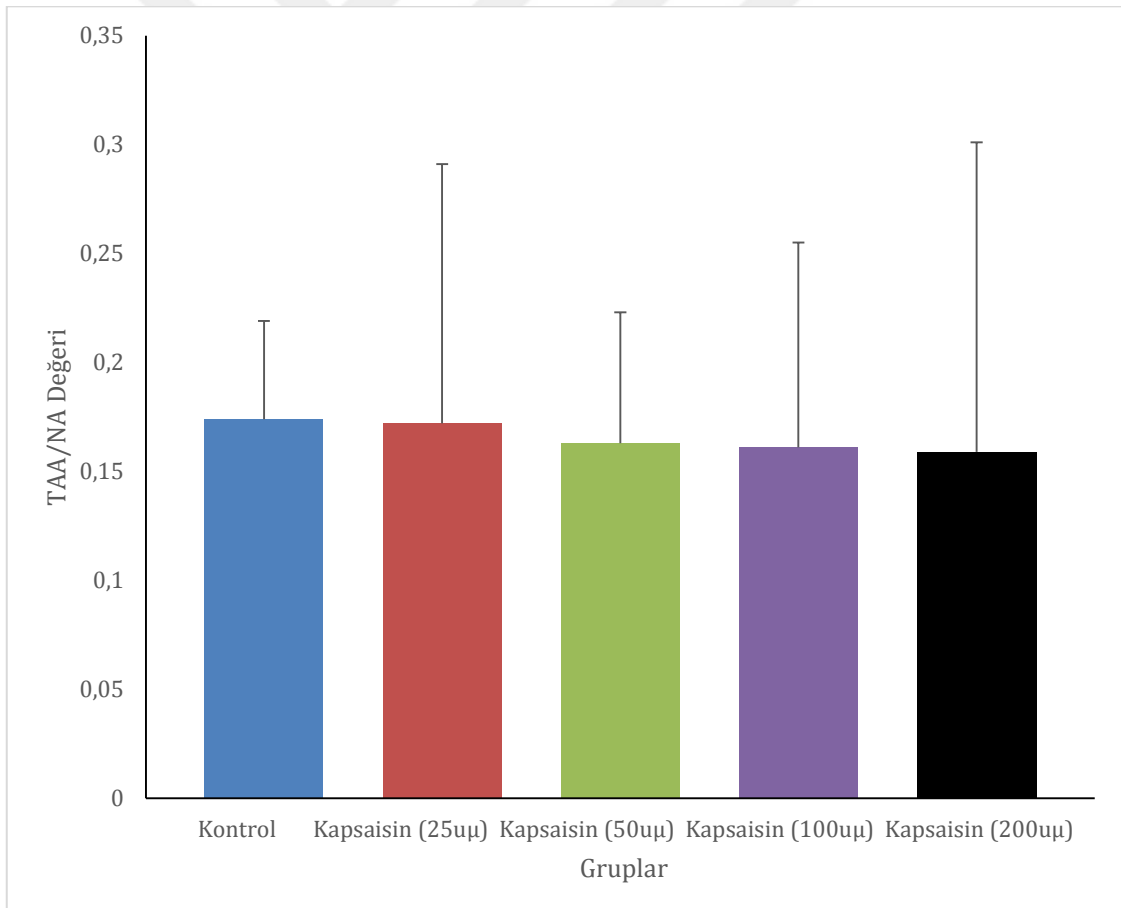
Şu anki çalışmada hiçbir madde uygulanmamış insan prostat kanser PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) , 25 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™), 50 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™), 100 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ve 200 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) olarak 5 gruba ayrılmış ve her bir gruba AgNOR boyama işlemi uygulanarak her bir grup için TAA/ÇA ve ortalama AgNOR sayısı değerleri hesaplanmıştır. Buna göre hiçbir madde uygulanmamış insan prostat kanser PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) için TAA/ÇA değeri $0,174 \pm 0,045$ ve ortalama AgNOR sayısı değeri $5,467 \pm 1,721$ olarak bulunmuştur. Bu değerler 25 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) için sırasıyla $0,172 \pm 0,119$ ve $3,677 \pm 1,659$; 50 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) için $0,162 \pm 0,06$ ve $3,118 \pm 1,741$; 100 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) için $0,161 \pm 0,094$ ve $3,044 \pm 1,673$; 200 µm konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) için ise $0,159 \pm 0,142$ ve $3,241 \pm 1,525$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda, hiçbir madde uygulanmamış insan prostat kanser PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile farklı konsantrasyonlarda 25 µm, 50 µm, 100 µm ve 100 µm kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) karşılaştırıldığında hem TAA/ÇA hemde Ortalama AgNOR sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (sırasıyla X^2 : 13,903 , $p=0,009$; X^2 : 83,716 , $p=0,000$) (Tablo 4.1; Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

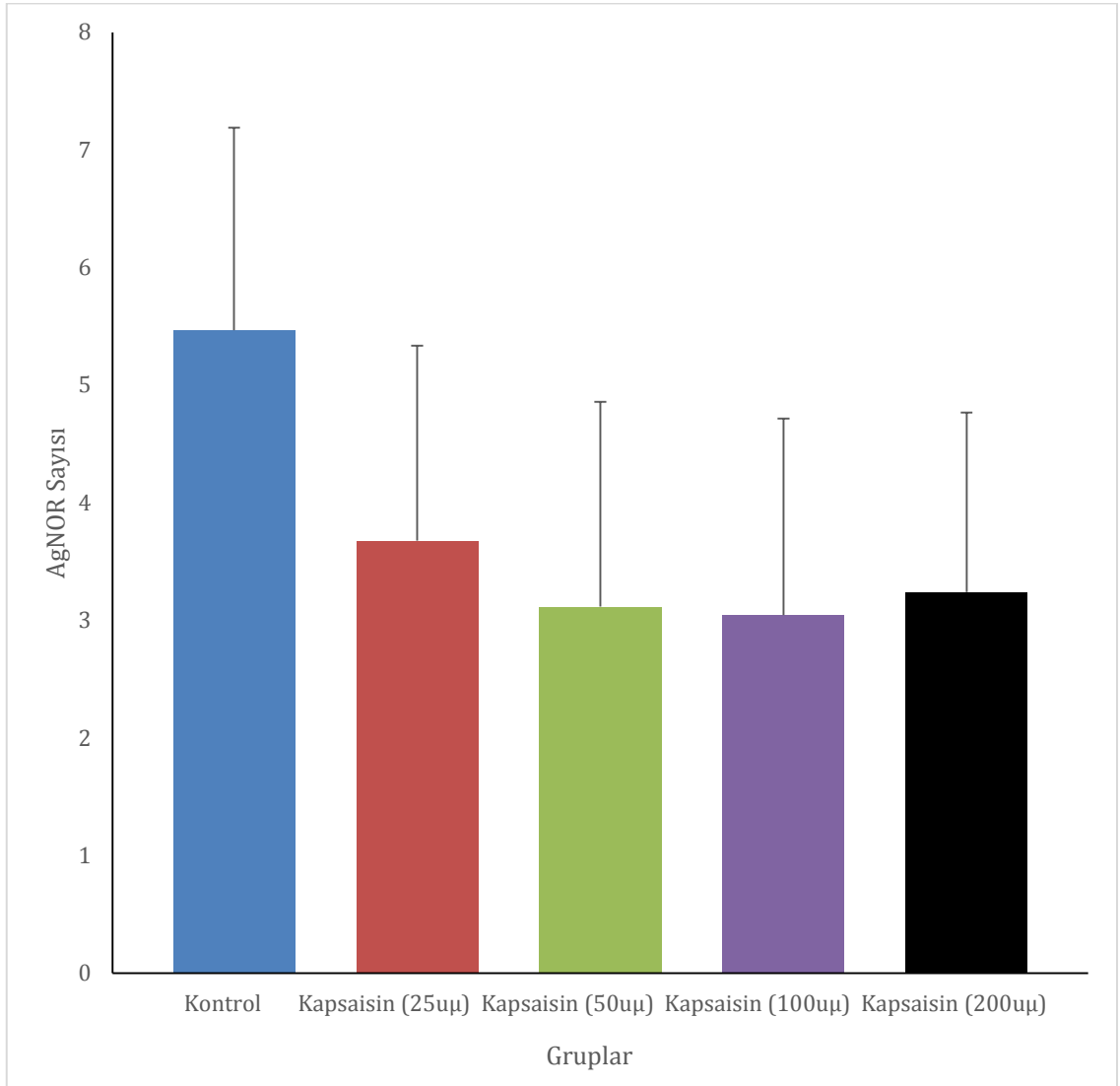
Tablo 4. 1. Grupların N, ortalama TAA/ÇA değeri, ortalama AgNOR sayısı, X^2 ve p değerleri

Gruplar	N	Ortalama TAA/ÇA	Ortanca Değer	AgNOR Sayısı	Ortanca Değer	X^2 Değeri	P Değeri
Kontrol	100	0,174±0,045	0,160*	5,467±1,721	5 ^{&}	13,903*	0,009*
Kapsaisin (25)	100	0,172±0,119	0,142*	3,677±1,659	3 ^{&}	83,716 ^{&}	0,000 ^{&}
Kapsaisin (50)	100	0,162±0,06	0,153*	3,118±1,741	3 ^{&}		
Kapsaisin (100)	100	0,161±0,094	0,143*	3,044±1,673	3 ^{&}		
Kapsaisin (200)	100	0,159±0,142	0,128*	3,241±1,525	3 ^{&}		

N. Ölçülen hücre sayısı * : Ortalama TAA/ÇA için değer & : Ortalama AgNOR Sayısı için değer



Şekil 4. 1. Grupların ortalama TAA/NA değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik



Şekil 4. 2. Grupların ortalama AgNOR sayısı değerleri arasındaki kıyaslamayı gösteren grafik

Hiçbir madde uygulanmamış insan prostat kanser PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile farklı konsantrasyonlarda 25 uM, 50 uM, 100 uM ve 100 uM kapsisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubunun her birinin ikili kıyaslaması yapıldığında;

Kontrol grubu ile 25 µ kapsaisin uygulanmış grup kıyaslandığında hem ortalama TAA/ÇA ($0,174 \pm 0,045$; $0,172 \pm 0,119$) hem de ortalama AgNOR sayısı ($5,467 \pm 1,721$; $3,677 \pm 1,659$) arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur (sırasıyla $Z=-2,361$, $p=0,018$; $Z=-5,786$, $p=0,000$).

Kontrol grubu ile 50 µ konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında; hem ortalama TAA/ÇA ($0,174 \pm 0,045$; $0,162 \pm 0,06$) değerleri arasındaki hem de, ortalama AgNOR sayısı ($5,467 \pm 1,721$; $3,118 \pm 1,741$) arasında anlamlı derecede farklılık tespit edilmiştir ($Z=-1,909$, $p=0,05$; $Z=-6,771$, $p=0,000$).

Kontrol grubu ile 100 µ konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında; hem ortalama TAA/ÇA ($0,174 \pm 0,045$; $0,161 \pm 0,094$) hem de ortalama AgNOR sayısı ($5,467 \pm 1,721$; $3,044 \pm 1,673$) arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur (sırasıyla $Z=-2,319$, $p=0,020$; $Z=-7,704$, $p=0,000$).

Yine kontrol grubu ile 200 µ konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında; hem ortalama TAA/ÇA ($0,174 \pm 0,045$; $0,159 \pm 0,142$) hem de ortalama AgNOR sayısı ($5,467 \pm 1,721$; $3,241 \pm 1,525$) arasında anlamlı derecede farklılık bulunmuştur (sırasıyla $Z=-3,816$, $p=0,000$; $Z=-7,319$, $p=0,000$).

Farklı konsantrasyonlarda 25 µ, 50 µ, 100 µ ve 100 µ kapsisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) gruplarının kendi içerisinde ikili kıyaslaması yapıldığında;

25 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile 50 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında; ortalama TAA/ÇA ($0,172 \pm 0,119$; $0,162 \pm 0,06$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken ($Z = -1,013$, $p = 0,311$), ortalama AgNOR sayısı ($3,677 \pm 1,659$; $3,118 \pm 1,741$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($Z = -1,895$, $p = 0,05$).

25 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile 100 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubunun ortalama TAA/ÇA ($0,172 \pm 0,119$; $0,161 \pm 0,094$) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken ($Z = -0,106$, $p = 0,916$), ortalama AgNOR sayısı ($3,677 \pm 1,659$; $3,044 \pm 1,673$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($Z = -2,492$, $p = 0,013$).

Yine 25 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile 200 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında; hem ortalama TAA/ÇA ($0,161 \pm 0,094$; $0,159 \pm 0,142$) değerleri ($Z = -0,343$, $p = 0,732$), hem de ortalama AgNOR sayısı ($3,044 \pm 1,673$; $3,241 \pm 1,525$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($Z = -1,654$, $p = 0,098$).

50 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile 100 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında; hem ortalama TAA/ÇA ($0,162 \pm 0,06$; $0,161 \pm 0,094$) değerleri ($Z = -0,106$, $p = 0,916$), hem de ortalama AgNOR sayısı değerleri ($3,118 \pm 1,741$; $3,044 \pm 1,673$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($Z = -2,492$, $p = 0,013$).

Yine 50 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile 200 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu kıyaslandığında, hem ortalama TAA/ÇA ($0,162 \pm 0,06$; $0,159 \pm 0,142$) ($Z=-1,813$, $p=0,070$), hem de ortalama AgNOR sayısı değerleri ($3,118 \pm 1,741$; $3,241 \pm 1,525$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($Z=-0,515$, $p=0,606$).

Son olarak 100 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile 200 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu karşılaştırıldığında, hem ortalama TAA/ÇA ($0,161 \pm 0,094$; $0,159 \pm 0,142$) ($Z=-0,642$, $p=0,521$), hem de ortalama AgNOR sayısı değerleri ($3,044 \pm 1,673$; $3,241 \pm 1,525$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($Z=-1,055$, $p=0,291$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlığın karşı karşıya kaldığı hastalıkların üstesinden gelebilmek için modern tıbbın tamamlayıcısı olarak kullanılan geleneksel ve alternatif tıp Dünya genelinde olduğu gibi Ülkemizde de her geçen gün önemi daha da artan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bitkilerin ilaç olarak kullanılmasının uzun ve başarılı bir geçmişi vardır. Bazı antikanser bileşenleri binlerce yıldır geleneksel tıp sistemi içinde kullanılmıştır¹²⁸. Bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan bu bileşenler antitümöral etki göstererek hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca bu bileşenler apoptozis'i uyarak antianjiogenik etki sergilemek suretiyle de antitümör etki göstermektedir. AgNOR proteinleri birçok kanser türünde hücresel proliferasyonun bir indikatörüdür^{1,5-7,129}. Bu bölgelerin aktiviteleri direk olarak protein sentezi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktif NOR sayıları, artan hücresel aktiviteyle artar. İşte bu sebeple bizde çalışmamızda fitoterapotik bir ajan olarak kullanılan kapsaisin uygulanmış İnsan Prostat Kanseri Hücre hattında (PC3) AgNOR parametrelerini inceleyerek, bu parametrelerdeki değişikliği tespit etmeyi amaçladık.

Hücrenin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi tümörlerin histolojik sınıflandırılmasına yardımcı olması açısından önemlidir¹. Histopatoloji'de, interfaz AgNOR proteinlerinin analizleri preneoplastik ve neoplastik lezyonların ayrılmasında sık olarak kullanılmaktadır⁴. AgNOR proteinleri birçok kanser türünde hücresel proliferasyonun bir indikatörüdür^{1,5-7,129}.

Prostat kanseri; Tritium-etiketli histootoradyografi, AgNOR boyama tekniği ve Ki67MIB-1 immünohistokimyasal tekniklerinin kullanımı ile, yavaş, orta ve hızlı proliferen olan tümörler olarak alt gruplara ayrılabilir¹⁰⁷.

Adenokarsinom biyopsi örnekleri kullanılarak yapılmış olan bir çalışmada, proliferasyonun bir markırı olarak Bcl-2 ve AgNOR, apoptozisin markırı olarak da p53

kullanılarak geliştirilen bir matematiksel model anlamlı derecede Gleson skoru, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) sınıflandırmısa ve serumdaki prostat spesifik antijen düzeyi ile korelasyon göstermiştir. Oysa her bir doku markırı yalnız başına tüm bu ölçümlerle korelasyon göstermez¹⁰⁸.

Prostat hastalıkları morbidite ve mortalitenin ana nedenlerinden biridir. Hastalığın erken dönemlerinde tespit edilmesi ve etkili tedavi stratejisinin geliştirilmesi önemli bir gereksinimdir. Yapılan bir çalışmada bir yıldan daha fazla süredir prostat hastalığına sahip olan 60 hasta değerlendirilmiştir. Hastalar BPH, prostatit veya prostatik adenokarsinoma olarak 3 gruptandırılmıştır. BPH ve Prostatit'in ortalama AgNOR sayıları arasında BPH ve PIN arasındaki gibi istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Düşük ve yüksek dereceli PIN arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur. Prostatik adenokarsinomanın AgNOR sayısında, benin hastalıklardan anlamlı derecede artış tespit edilmiştir. Aynı zamanda lokalize ve metastatik karsinoma arasında da anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Serum PSA değerleri ile AgNOR sayıları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur¹⁰⁹. PKa'lı hastalardan elde edilen otuz beş iğne biyopsisi üzerinde yapılan bir çalışmada, en yüksek AgNOR değeri kötü diferansiye karsinomalarda bulunmuştur¹¹⁰. Yine prostatik lezyona sahip 50 hasta kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada en yüksek AgNOR sayısı adenokarsinomada bulunmuştur¹¹¹.

Malignant hastalıklardan paramalignantları ayırmak için 185 prostatik ince iğne biyopsisini içeren bir diğer çalışmada, AgNOR alanının maligniteye bağlı olarak arttığı gösterilmiştir¹¹².

Prostat kanserli 26 hastanın biyopsi örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, AgNOR oranı, yüksek Gleason histological derecelendirilmesinde düşük Gleason histological derecelendirilmesine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur¹¹³.

Prostat kanserli 65 hastanın iğne biyopsileri ile yapılan bir çalışmada maliniteye bağlı olarak AgNOR miktarında anlamlı değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir¹¹⁴.

Bununla beraber 104 hastaya ait Prostatın benign, prenoplastik ve neoplastik lezyonlarında AgNOR'lar incelenmiş ve kontrol grubunda lezyonlu gruba göre AgNOR miktarı daha düşük olarak bulunmuştur¹¹⁵.

Prostat latent kanseri ve prostat klinik kanserinde hücre proliferasyon aktivitesinin bir göstergesi olan AgNOR, topoizomerez II-alfa, Ki-67, alpha-methylacyl-CoA racemase kullanılması ile yapılan bir çalışmada latent kanserlerin proliferasyon aktivitesi, klinik kanserlerden daha düşük olarak bulunmuştur¹¹⁶.

Tedavi almış ve prostat kanseri nedeniyle ölmüş 29 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, tedavi öncesi 25 hastanın ve endokrin tedavisi süresince 10 hastanın doku biyopsisi otopsi örnekleriyle karşılaştırılmıştır. Öntedavi uygulanmış biyopsi örneklerinden otopside elde edilmiş biyopsi örneklerine doğru gidildikçe AgNOR ların sayısında istatistiksel olarak artış tespit edilmiştir. Buna ilaveten ön tedavi sonrası AgNOR'ların sayısı ile sağkalım arasında bir korelasyon olmamasına rağmen, endokrin tedavisi sonrası sistemik progresyonlu hastalardaki sağkalım arasında ters bir ilişki tespit edilmiştir¹¹⁷.

Şu anki yapmış olduğumuz çalışmamızda insan prostat kanser hücre hattı hiçbir madde uygulanmamış, 25 µM konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış, 50 µM konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış, 100 µM konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış ve 200 µM konsantrasyonunda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) olarak 5 gruba ayrılmış ve her bir gruba AgNOR boyama işlemi uygulanarak her bir grup için TAA/ÇA ve ortalama AgNOR sayısı değerleri kıyaslanmıştır. Buna göre hiçbir madde uygulanmamış PC-3 hücre hattı (ATCC®

CRL1435™) ile farklı konsantrasyonlarda 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) arasında hem TAA/ÇA hemde Ortalama AgNOR sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (sırasıyla X^2 : 13,903 , p=0,009 ; X^2 : 83,716 , p=0,000).

Hiçbir madde uygulanmamış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) ile farklı konsantrasyonlarda 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM kapsisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubunun her biri ikili kıyaslandığında; hiçbir madde uygulanmamış PC-3 hücre hattı ile farklı konsantrasyonlarda (25 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM) kapsisin uygulanmış PC-3 hücre hattı gruplarının herbiri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ve kapsaisin uygulama dozundaki artışa bağlı olarak AgNOR'ların miktarında bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Bu da bize Kapsaisinin prostat kanserine karşı koruyucu bir etkisinin olduğunu ve antikarsinojen özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Farklı konsantrasyonlarda 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM kapsisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) gruplarının kendi içerisinde ikili kıyaslaması yapıldığında; 25 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı ile 50 µM ve 100 µM konsantrasyonda kapsaisin uygulanmış PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) grubu ortalama AgNOR sayısı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık variken, diğer uygulama yapılmış grupların ortalama AgNOR sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Buna ilaveten uygulama yapılmış grupların TAA/ÇA değerleri arasında doz artışına bağlı bir azalma olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buda bize belli bir miktara kadar kapsaisinin doz artışına bağlı olarak hücre proliferasyon aktivitesinin azaldığını, yine hücrelerin metabolik ve proliferasyon aktivitesinin indirek bir göstergesi olarak AgNOR miktarlarında düşmeler olduğunu göstermektedir. Bu nedenle

AgNOR protein miktarındaki değişikliklere bakılarak canlı hücrelerin metabolik aktivitesi hakkında bilgi edinilebilir.

Kanser alanında uygulanan tedaviler geçmişten günümüze kadar farklı teknikler kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile gelişme kaydetmiştir. Yalnız hangi metot kullanılırsa kullanılsın ilaç geliştirme araştırmalarında endüstriyel amaçlı üretilmiş olan insan hücre hatlarının kullanımı bir yerde zorunluluk göstermektedir. Günümüzde tedavide başarılı olmak ve kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek üzere yapılan çalışmalar endüstriyel amaçlı üretilmiş olan insan tümör hücre hatlarının üzerinde sürdürölmektedir. Doğada mevcut olan kimyasal ve biyolojik çeşitlilik; yeni bileşiklerin ve kimyasal maddelerin keşfi için olağan üstü fırsatlar sunmaktadır. Bitkilerin ilaç olarak kullanılmasının uzun ve başarılı bir geçmişı vardır. Bazı antikanser bileşenleri binlerce yıldır geleneksel tıp sistemi içinde kullanılmıştır¹²⁸. Bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan antikanserojen özelliğe sahip bileşenler antitümöral etki göstermektedir. Biz yapmış olduğumuz bu çalışma sonrasında antikanserojen etkiye sahip olan kapsaisinin İnsan Prostat Kanserine karşı koruyucu etkisi olduğunu, bunun için doz konsantrasyonunun ve saflık derecesinin önemli olduğunu, tedavi stratejisinin ve hastalığın prognozunda AgNOR yönteminin indirek bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiş olduk.

Böylece ilerleyen süreçlerde şu anki kullandığımız yeni yaklaşım (TAA/ÇA), değişik kanser türlerinin prognozu ve kullanılan antitümör ajanlarının tedaviye olan etkinliği hakkında bilgi edinilebilmesine ve böylece tedavi stratejisinin değiştirilip değiştirilmeyeceği konusunda da hekime yardımcı olabilir. Bu doğrultuda basit, ucuz ve uygulanabilirliği kolay olan bu yöntemle gereksiz zaman, para kaybı önlenebileceği gibi, hastalıktan müzdarip olan bireylerin müzdaripliğinin giderilmesi ve uzayan tedavi süresi ve zamandan kaynaklı stres, hüün vb. psikolojik rahatsızlıklarında önüne

geçilmesi sağlanabilecektir. Aynı zamanda bildiğimiz kadarıyla kapsaisin uygulanmış insan prostat kanseri hücre PC-3 hücre hattı (ATCC® CRL1435™) hattında AgNOR parametrelerindeki değişikliğin değerlendirildiği hiçbir çalışma olmaması nedeniyle, literatürde olan bu eksiklikte giderilmiş oldu.



6. KAYNAKLAR

1. Shiina H, Knuhel R, Hofstadter F. Evaluation of the argyrophilic nucleolar organizer region, nuclear DNA content and mean nuclear area in transitional cell carcinoma of bladder using a quantitative image analyzer. *Eur Urol.* 1996; 29: 99-105.
2. Goodman MT, Yoshizawa CN, Kolonel LN. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer.* 1988; 61: 1272-1276.
3. Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions(NORs). In *The Cell Nucleus. Eleventh volume.* Edited by H Busvh, L Rothblum. New York: Academic Pres, 1982: p. 89-142.
4. Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, Hata K, Hong S, Nami Q, Takeru A, Huilan O, Teruaki Z, Kobayashi H, Mori H. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. *Oncol Rep.* 2006; 15(3): 533-538.
5. Eroz R, Cucer N, Karaca Z, Unluhizarci K, Ozturk F, “The Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid”. *Endocr Pathol.* 2011; 74–78.
6. Eroz R, Unluhizarci K, Cucer N, Ozturk F, “The Value Of Argyrophilic Nucleolar Organising Region Protein Determinations in Non-Diagnostic Fine Needle Aspiration Samples (Due To Insufficient Cell Groups) Of Thyroid Nodules”. *Analytical And Quantitative Cytology And Histology.* 2013a; 226-232.
7. Eroz R, Cucer N, Unluhizarci K, Ozturk F. Detection and comparison of cut-off values for total AgNOR area/nuclear area and AgNOR number/nucleus in benign thyroid nodules and normal thyroid tissue. *Cell Biol Int.* 2013b; 37(3): 257-61
8. Oktay M, Eroz R, Oktay NA, Erdem H, Başar F, Akyol L, Cucer N, Bahadır A. “Argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis for cytologic discrimination of follicular thyroid lesions”, *Biotech Histochem.* 2015; 179-183.
9. Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy M. Kanser tedavisinde lenfatik hedeflendirme. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 2012; 32(1): 67-90.
10. Nisari M, Yılmaz S, Eroz R, Ertekin T, Bircan D, Ülger H. The Detection of Curcumins’ Antitumoral Effects via Argyrophilic Nucleolar Organizing Region-

- associated Protein Synthesis in Mice with Ehrlich's Ascitic Carcinoma. Bratislava Medical Journal. 2017; 118 (1):61-65.
11. Ertekin T, Bozkurt O, Eroz R, Nisari M, Bircan D, Nisari M, Unur E. May Argyrophilic Nucleolar Organizing Region–Associated Protein Synthesis Amounts Be Used for Detection of The Therapeutic Benefits and Selection of The Most Reliable Dose of The Drugs Such As Rhamnetin in Cancer Treatments. Bratislava Medical Journal. 2016; 117 (11): 653 – 658.
 12. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/52-prostat-kanseri.html>, Erişim tarihi: 20 Tem 2017 Perşembe.
 13. Ezgi S, şahin S. "Kapsaisin: Farmakokinetik, Toksikolojik ve Farmakolojik Özellikleri". Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Dergisi. 2010;29 (2): 149-163.
 14. Venier NA, Yamamoto T, Sugar LM, Adomat H, Fleshner NE, Klotz LH, Venkateswaran V. Capsaicin reduces the metastatic burden in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. Prostate. 2015;75(12):1300-1311.
 15. Eröz R, Ünlühızcı K, Cücer N, Baltacı D, Oktay M, “Kistik Nodüler Guatrılı Olguların Tiroid Hücrelerindeki AgNOR Sayısı ve AgNOR Yüzey Alanı/Çekirdek Alanı Oranının Yaş ve Cinsiyete göre Karşılaştırılması” , Konuralp Tıp Dergisi. 2012a; 31-35.
 16. Eroz R, Tasdemir S, Dogan H, “Is there any relationship between decreased AgNOR protein synthesis and human hair loosing”, Biotech Histochem. 2012b;494-498.
 17. Eroz R, Yilmaz S, Cucer N. “Argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis in hair root cells of humans at different developmental stages and sex” , Biotech Histochem. 2013c; 267-271.
 18. Eroz R, Okur M, Ozkan A, Berık O, Gunes G, “Does higher NORs expression affect the developmental stages of down syndrome infants?”, Genetic Counseling. 2012c; 249-253.
 19. Selvi B, Demirtas H, Eroz R, Imamoglu N. Investigation of the age-dependent AgNOR protein level in buccal epithelial cells of healty individuals. Aging Clinical and Experimental Research. 2015; 201-208.
 20. Colakoglu S, Saritas A, Eroz R, Oktay M, Yaykaslı KO, Akoz A, Kaya E, Kandis H. “Is one-time carbon monoxide intoxication harmless? Evaluation by argyrophilic

- nucleolar-organizing regions staining method” , Human and Experimental Toxicology. 2015; 24-31.
21. Saritas A, Gunes H, Colakoglu S, Eroz R, Akoz A, Oktay M, Buyukkaya A, Kandis H, Ozkan A. Are There Any Effects of Chronic Carbon Monoxide Exposure on Argyrophilic Nucleolar Organizing Region-Associated Protein Synthesis in Rat Myocardium? Human and Experimental Toxicology. 2016; 35(9): 921-928.
 22. Yemiş O., Bakkalbaş E., Artık N. Kapsaisinoit kaynağı olarak kırmızıbiberler. Gıda Mühendisliği Dergisi. 2004; 18: 30-37
 23. Duman A.D., Zorlugenç B., Evliya B. Kahramanmaraş'ta kırmızıbiberin önemi ve sorunları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi. 2002; 5 (1): 111-117.
 24. Verit A., Yeni E., Ünal D. Tarihten günümüz ürolojisine kırmızı acı biber. Türk Üroloji Dergisi. 2001; 27 (4): 399-402
 25. Yemiş O., Bakkalbaş E., Artık N. Kapsaisinoit kaynağı olarak kırmızıbiberler. Gıda Mühendisliği Dergisi. 2004; 18: 30-7
 26. Norton SA. Useful plants of dermatology. V. Capsicum and capsaicin. J Am Acad Dermatol. 1998; 39: 626-628
 27. Surh YJ, Lee RC, Park KK, Mayne ST, Liem A and Miller JA: Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and N-nitrosodimethylamine. Carcinogenesis. 1995; 16:2467-2471.
 28. Oyagbemi AA, Saba AB, Azeez O I. Capsaicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. *Indian journal of cancer*. 2010; 47(1):53.
 29. Thomas BV, Schreiber AA, Weisskopf PC. Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography, J Agric Food Chem. 1998; 46:2655-2663.
 30. Capsaisin, en.wikipedia.org/wiki/Capsaicin
 31. www.ensymm.com/pdf/ensymm_capsaicin_extraction_abstract.pdf ; Hazardous Substances Data Bank (HSDB), Capsaicin; U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Library of Medicine: Bethesda, MD, 2006
 32. Peña-Alvarez A, Ramírez-Maya E, Alvarado- Suárez LA. Analysis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Peppers and Pepper Sauces by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography- Mass Spectrometry, J Chromatogr A. 2009; 1216:2843-2847.

33. Kızılaslan A. Karıdalı Tipi Biber Salçasının Özelliklerinin İyileştirilmesi Üzerine Bir Araştırma. 1993, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
34. Markovits E, Gilhar A. Capsaicin--an effective topical treatment in pain. *Int J Dermatol.* 1997; 36: 401-404
35. Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anticancer drugs. *Anticancer Drugs.* 1994; 5: 3-9.
36. Bley K, Boorman G, Mohammad B, McKenzie D, Babbar S. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol.* 2012; 40: 847-73.
37. Bode AM, Dong Z. The two faces of capsaicin. *Cancer Res.* 2011; 71: 2809-14.
38. Topak H, Erbil N, Dıgırak M. Doguakdeniz ve Güneydogu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen biberlerin (*Capsicum annuum* L.) antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması. *Fırat Üniv Fen ve Müh Bil Dergisi.* 2008; 20(2): 257-64.
39. Yu C. Study on HIF-1 α Gene Translation in Psoriatic Epidermis with the Topical Treatment of Capsaicin Ointment. *ISRN Pharm.* 2011; 821874: 1-3.
40. Ellis CN, Berberian B, Sulica VI ve ark. A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1993; 29: 438-442
41. Markovits E, Gilhar A. Capsaicin--an effective topical treatment in pain. *Int J Dermatol.* 1997; 36: 401-404.
42. Soetarno S, Sukrasno E. Antimicrobial activities of the ethanol extracts of *Capsicum* fruits with different levels of pungency. *JMS.* 1997; 2(2): 57-63.
43. Cingi İ, Erol K, Özdemir M., *Farmakoloji ders notları*, 2.Baskı, Eskişehir, Doğan Yayınevi,1996:p. 262-263.
44. Srinivasan K, Sambayah K. The Effect of Spices on Cholesterol 7 Alpha-Hydroxylase Activity and on Serum and Hepatic Cholesterol Levels in the Rat. *Int J Vitam Nutr Res.*1991; 61(4):364-9.
45. Kawada T, Hagihara K, Iwai, K. Effects of Capsaicin on Lipid Metabolism in Rats Fed with High Fat Diet. *J Nutr.*1986; 116:1272-8.
46. Tellez G, Jaeger L, Dean CE, Corrier DE, DeLoach JR, Williams JD, Hargis BM. Effect of prolonged administration of dietary capsaicin on *Salmonella enteritidis* infection in leghorn chicks. *Avian Dis.* 1993; 37: 143-8.
47. Hussain M and Chandrasekhara N. Influence of curcumin and capsaicin on cholesterol gallstone induction in hamsters and mice. *Nutr Res.* 1993; 13: 349-57.

48. Kogure K, Goto S, Nishimura M, Yasumoto M, Abe K, Ohiwa C, Terada, H. Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2002; 1573(1): 84-92.
49. Czaja MJ: Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4: 759-767.
50. Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, Koeffler HP. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer research*. 2006; 66(6):3222-3229.
51. Huang SP, Chen JC, Wu CC, Chen CT, Tang, NY, Ho, YT, Lin J G. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer research*. 2009; 29(1): 165-174.
52. Lee YS, Nam DH and Kim JA. Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Lett*. 2000; 161: 121-130.
53. Jung MY, Kang HJ and Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 down-regulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett*. 2001; 165: 139-145.
54. Gong XF, Wang MW and Ikejima T. Mechanisms of capsaicin-induced apoptosis of human melanoma A375-S2 cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese journal of oncology]*. 2005; 27(7): 401-403.
55. ZIK B, AKKOÇ CGÖ, TÜTÜNCÜ Ş. Sıçan ovariumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2010;; 57:223-228.
56. Min JK, Han KY, Kim EC, Kim YM, Lee SW, Kim OH, Kwon YG. Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer research*. 2004; 64(2): 644-651.
57. Deniz AC. Asetaminofen Zehirlenmesinde Kapsaisin Etkisi: Deneysel Bir Rat Model. 2016, Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa.
58. Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev*. 2007; 21:3027-43.
59. Dernburg AF, Misteli T. Nuclear architecture-an island no more. *Dev Cell*. 2007; 12:329-34.
60. Gorski S, Misteli T. Systems biology in the cell nucleus. *J Cell Sci*. 2005; 118:4083-4092. ; Misteli T. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*. 2005; 27:477-487.

61. Yamashita T, Higashi M, Momose S, Morozumi M, Tamaru JI. Nuclear expression of Y box binding-1 is important for resistance to chemotherapy including gemcitabine in TP53-mutated bladder cancer. *Int J Oncol.* 2017;51(2):579-586.
62. Feng S, Xing C, Shen T, Qiao Y, Wang R, Chen J, Liao J, Lu Z, Yang X, Abd-Allah SM, Li J, Jing N, Tang K. Abnormal Paraventricular Nucleus of Hypothalamus and Growth Retardation Associated with Loss of Nuclear Receptor Gene COUP-TFII. *Sci Rep.* 2017;7(1):5282.
63. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:677–87.
64. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:179–192.
65. Zaidi SK, Young DW, Javed A, Montecino M, Van Wijnen A, Stein GS. Nuclear microenvironments in biological control and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:454–463.
66. Gilbert DM, Zink D. Intranuclear changes in cancer cells. *Genome Biol.* 2007; 8:312.
67. Xiong X, Dai L, Liang W, Zhang J, Qin S, Cao W, Ye D, Liang P, Liu Z. Protective effect of p53 on the viability of intervertebral disc nucleus pulposus cells under low glucose condition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;pii: S0006-291X(17)31397-9.
68. Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54:131– 145
69. Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Kaplan H, Ploton D. Dynamics and threedimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA.* 2000; 6:1750– 1761.
70. McClintock B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1934; 21:294–328.
71. Caspersson TO. Cell growth and cell function. W.W. Norton and Co, New York, 1950; pp 85. ; Perry RP. The cellular sites of ribosomal and 4S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962; 48:2179–2186.

72. Ritossa F, Spiegelman S. Localization of DNA complementary to rRNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1965; 53:737–745
73. Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol*. 2006; 126:135–148
74. Derenzini M. The AgNORs. *Micron*. 2000; 31:117-120.
75. Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML. Distribution of 18128S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*. 1975; 53:25–36.
76. Worton RG, Sutherland J, Sylvester JE, Willard HF, Bodrug S, Dube I, Duff C, Kean V, Ray PN, Schmickel RD. Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science*. 1988; 239:64–68.
77. Gonzalez IL, Sylvester JE. Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics*. 1995; 27:320–328.
78. Kawasaki K, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu N. Methylation status of ribosomal RNA gene clusters in the flow-sorted human acrocentric chromosomes. *Mammal Genome*. 1992; 3:173–178.
79. Scheer U, Rose KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81:1431–1435.
80. Matsui S, Sandberg AA. Intranuclear compartmentalization of DNA-dependent RNA polymerases: association of RNA polymerase I with nucleolar organizing chromosomes. *Chromosoma*. 1985; 92:1–6.
81. Haaf T, Hayman DL, Schmid M. Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp Cell Res*. 1991; 193:78–86.
82. Roussel P, Hernandez-Verdun D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res*. 1994; 214:465–472.
83. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 1975; 53:37–50.
84. Ploton D, Ménager M, Adnet JJ. Ultrastructural localization of NOR in nuclei of human breast cancer tissues using a one-step AgNOR staining method. *Biol Cell*. 1982; 43:229–232.
85. Trere, D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000; 31: 127–131.
86. Hernandez-Verdun D, Louvet, E. Le nucleole: fonctions et maladies associées. *Med. Sci. (Paris)*. 2004; 20: 37–44.

- 87.** Brugal G. Interpretation of proliferation markers. *Virchows Arch.* 1995; 427:337–339.
- 88.** Hozak P, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Procedures for specific detection of silver stained nucleolar proteins on Western blots. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40:1089–1096.
- 89.** Sirri V, Roussel P, Trere D, Derenzini M, Hernandez-Verdun D. Amount variability of total and individual Ag-NOR proteins in cells stimulated to proliferate. *J Histochem Cytochem.* 1995; 43:887–893.
- 90.** Ginisty H, Amalric F, Bouvet P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 1998; 17:1476–1486.
- 91.** Scheer U and Hock R. Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; 11:365–390.
- 92.** Derenzini M, Sirri V, Trere D, Ochs RL. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest.* 1995; 73:1–6.
- 93.** Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber J-P, Teissie J, Amalric F. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0–G1 transition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:6770–6774.
- 94.** Sirri V, Roussel P, Gendron MC, Hernandez-Verdun D. Amount of the Two Major Ag- NOR Proteins, Nucleolin, and Protein B23 Is Cell-Cycle Dependent. *Cytometry.* 1997; 28:147–156
- 95.** Tasdemir S, Eroz R, Dogan H, Erdem HB, Sahin I, Kara M, Engin RI, Turkez H. Association Between Human Hair Loss and the Expression Levels of Nucleolin, Nucleophosmin, and UBTF Genes. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016;20(4):197–202.
- 96.** Szebeni A, Olson MOJ. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Prot Sci.* 1999; 8:905–912.
- 97.** Dergunova NN, Bulycheva TI, Artemenko EG, Shpakova AP, Pegova AN. A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immunol Lett.* 2002; 83:67–72.
- 98.** Isaac C, Yang Y, Meter T. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol.* 1998; 142:319–329.

99. Shaw PJ, Beven AF, Leader DJ, Brown JWS. Localization and processing from a polycistronic precursor of novel snoRNAs in maize. *J Cell Sci.* 1998; 111:2121-2128.
100. Sleeman J, Lyon CE, Platani M, Kreivi J-P, Lamond AI. Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Exp Cell Res.* 1998; 243:290-304.
101. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986; 18:5-14.
102. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions. *Molecular Biology in Histopathology.* Edited by Crocker J. John Wiley and Sons Ltd, 1994: p. 231-249.
103. Ogura S, Abe S, Sukoh N, Nakajima I, Kawakami Y, Inoue K. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate of lung adenocarcinoma. *Cancer.* 1992; 70: 63–68.
104. Trere D, Gramantieri L, Siringo S, Melchiorri C, Barbara L, Bolondi L, Derenzini M. In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. *J Hepathol.* 1995; 24:60–65.
105. Montironi R, Braseiseki A, Scerpelli M, Matera G, Alberti R. Value of quantitative nucleolar features vis preoperative cytological diagnosis of follicular neoplasia of the thyroid. *J Clin Pathol.* 1991; 44:509-514.
106. Solymosi T, Toth V, Sapi Z, Bodó M, Gál I, Csanádi L. Diagnostic value of AgNORs method in thyroid cytopathology: correlation with morphometric measurements. *Diagn Cytopathol.* 1996; 14:140-144.
107. Helpap B, Bubendorf L. Prostate cancer. Part 1: Review of cell kinetics over the years 1966-2015 and future perspectives of the new grading of the International Society of Urological Pathology (ISUP). *Pathologe.* 2016;37(1):3-10.
108. Munda M, Hajdinjak T, Kavalari R, Stiblar Martincic D. p53, Bcl-2 and AgNOR tissue markers: model approach in predicting prostate cancer characteristics. *J Int Med Res.* 2009;37(6):1868-76.
109. Goel T, Garg S. Role of AgNOR count and its correlation with serum PSA levels in prostatic lesions. *Urol Int.* 2009;82(3):286-90.

110. Roznovan SL1, Frâncu DL, Amălinei C, Rădulescu D. Study of nucleolar organizer regions in prostate cancer. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2009;113(1):173-9.
111. Ghosh J, Burman A, Manna AK, Chatterjee A. Role of proliferative markers in prostatic lesions. *Indian J Pathol Microbiol*. 2004;47(3):354-8.
112. Silva LC, Saldiva PH, Ellinger F, Filho BL, Capelozzi VL, Antonangelo L. Quantitation of conventional histologic parameters and biologic factors in prostatic needle biopsy are useful to distinguish paramalignant from malignant disease. *Pathol Res Pract*. 2004;200(9):599-608.
113. Botticelli AR1, Casali AM, Botticelli L, Zaffe D. Immunohistochemical detection of cell-cycle associated markers on paraffin embedded and formalin fixed needle biopsies of prostate cancer: correlation of p120 protein expression with AgNOR, PCNA/cyclin, Ki-67/MIB1 proliferation-scores and Gleason gradings. *Eur J Histochem*. 1998;42(1):41-8
114. Chiusa L1, Galliano D, Formiconi A, Di Primio O, Pich A. High and low risk prostate carcinoma determined by histologic grade and proliferative activity. *Cancer*. 1997;79(10):1956-63.
115. Mukherjee J1, Misra V, Gupta SC, Gupta AK, Tandon SP. Argyrophilic nucleolar organizer regions in atypical adenomatous hyperplasias, prostatic intraepithelial neoplasias and prostatic neoplasms. *Urol Int*. 1997;58(2):75-9.
116. Takahashi S1, Suzuki S, Takahashi S, Inaguma S, Asamoto M, Shirai T. Differences between latent and clinical prostate carcinomas: lower cell proliferation activity in latent cases. *Prostate*. 2006;66(2):211-7
117. Ohki T, Akakura K, Ueda T, Akimoto S, Yatani R, Shimazaki J. Changes in histologic grade and argyrophilic nucleolar organizer regions during progression of prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1996;26(2):82-7.
118. Ahiskali R, Alican Y, Ekicioğlu G, Cevik I, Küllü S, Akdaş A. Evaluation of three different AgNOR counting methods in advanced carcinoma of the prostate. *Prostate*. 1995 -;26(2):105-10.
119. Helpap B1, Riede C. Nucleolar organizer regions in low- and high-grade carcinomas of the prostate. *World J Urol*. 1995;13(3):195-9.
120. Konishi N, Nakaoka S, Tsuzuki T, Kitahori Y, Nishii K, Kitamura M, Ohshima M, Hiasa Y. Progressive activity in latent prostate carcinoma defined by

- argyrophilic staining of the nucleolar organizer regions (AgNOR). *Pathol Int.* 1994;44(4):297-302.
121. Bittinger A, von Keitz A, Rüschoff J, Melekos MD. Silver staining nucleolar organizer region in prostate cytology. *Zentralbl Pathol.* 1994;140(1):103-6.)
 122. Kirby R, Montorsi F, Gontero P, Smith JA. Radical prostatectomy: From open to robotic. London: Informa: 2007;p. 1-11
 123. Villers A, Mcneal JE, Freiha FS, Boccon-Gibod L, Stamey TA. Invasion of Denonvilliers's fascia in radical prostatectomy specimens. *J urol.* 1993; 149:793
 124. https://www.google.com.tr/search?q=PROSTAT+anatomisi+PDF&rlz=1C1GGRV_enTR752TR752&source
 125. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/52-prostat-kanseri.html>
 126. Benn PA and Perle M. Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney DE and Czepulskowski BH (eds) *Human cytogenetics: Constitutional analysis: A practical approach.* London: Oxford University Press, 1986, pp. 91–118,
 127. Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41(3): 439–445.
 128. Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. *Food and Chemical Toxicology.* 2011;49:1924–1934.
 129. Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, Demirtas H, Sarac F, Tatlısen A, Öztürk F. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. *JMIC.* 2007;1025:1-6.

ÖZGEÇMİŞ

1987 Yılında Konya da doğdum. İlköğretim yıllarımı Kayseri ve Elazığda olmak üzere çeşitli özel okullarda tamamladım. Lise eğitimimi Elazığ Ahmet Kabaklı Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladım. Çeşitli sağlık sebeplerimden dolayı, bir devlet üniversitesine yerleşip üniversite eğitim hayatıma başlamam 3 -4 yıl kadar gecikmeli başladı. 2009-2015 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünde eğitimimi tamamlayıp mezun oldum. Halen Düzce Üniversitesinde Tıbbi Biyoloji ve Genetik Eğitimi Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaktayım.

