

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI
Ehrlic tümörü oluşturulmuş farelerde Rhamnetinin solid tümör kitlesindeki AgNOR
protein sentezi üzerine etkisinin araştırılması

Proje No:
THD-2016-6499

Proje Türü
Hızlı Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Adı Soyadı
Birimi/Bölümü
Doç.Dr. Tolga ERTEKİN
Tıp Fakültesi/Anatomi ABD

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Doç.Dr. RECEP ERÖZ (Başka Üniversite Mensubu)
Prof.Dr. Erdoğan UNUR (Personel)
Yrd.Doç.Dr. Mehtap NİSARİ (Personel)
Yrd.Doç.Dr. MUSTAFA NİSARİ (Başka Üniversite Mensubu)
Öğr.Gör. ÖZLEM BOZKURT (Başka Üniversite Mensubu)

EYLÜL 2016
KAYSERİ

TEŞEKKÜR: Bu çalışma ERÜ BAP Birimi tarafından ‘‘ THD-2016-6499
‘’ kodu ile desteklendiğinden dolayı ERÜ BAP Birimine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2.GENEL BİLGİLER	7
3. GEREÇ YÖNTEM	10
4. BULGULAR	11
5. TARTIŞMA	13
6. KAYNAKLAR	14
7. EKLER	16

ÖZET: Rhamnetin antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti kanserojen etkiye sahip bir flavanoiddir. Çekirdekçik organize edici bölgeler ribosomal gen bölgeleridir. Biz bu çalışmada rhamnetin'in hücre proliferasyonu üzerine bir etkisinin olup olmadığını, AgNOR proteinlerinin kanser tedavisi kullanımında bir potansiyele sahip olan yeni metabolit ve ilaçların tedavi edici etkisini tespit etmeyi amaçladık. Ehrlich asit karsinomalı 24 fare rastgele control, grup2 ve grup 3 (intraperitoneal olarak sırasıyla 100 µg/kg and 200 µg/kg muamele edilen) olarak 3 ana guruba ayrıldı. Tüm hayvanlar 16. Günde son dozdan 24 saat sonra sakrifiye edildi ve enjeksiyon bölgesinde gelişen tümörler çıkarıldı. Daha sonra ortalama AgNOR sayısı ve total AgNOR alanı/çekirdek alanı tespit edildi. Tüm gruplar arasında hem ortalama AgNOR sayısı hem de TAA/NA oranı için anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.000$). İkili grup kıyaslamalarında; pozitif control ve Rhamnetin (100 µg/kg) grupları arasındaki fark anlamlı değilken ($p=0.387$), pozitif control ve Rhamnetin (200 µg/kg) ve Rhamnetin (100 µg/kg) ve Rhamnetin (200 µg/kg) grupları arasındaki fark TAA/NA oranı için anlamlıydı ($p=0.000$). Rhamnetin kanser oluşumuna karşı önemli bir role sahiptir. Bizim çalışmamız aynı zamanda ortalama AgNOR sayısı ve TAA/NA değerlerinin uygulanacak olan tedavi stratejisinin başarı oranını değerlendirmek için ve hastalığın yönetiminde uygun doz seçimi için bir biyomarkır olarak kullanılabileceğini gösterdi.

ABSTRACT

Rhamnetin is a flavonoid that has antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer effects. Nucleolar-organizing regions are the ribosomal genes region. We aimed to identify whether rhamnetin has an effect about the cell proliferation and whether AgNOR proteins may be used for detection of the therapeutic benefits of the drugs and new metabolites, which have potential for the using of cancer treatments. Twenty four mice with Ehrlich's ascitic carcinoma (EAC) were randomly assigned to 3 main groups as positive control, group 2 and 3 treated intraperitoneally with rhamnetin (100 µg/kg) and (200 µg/kg), respectively. All the animals were sacrificed on 16 d, 24 h after the last dose, the tumors, which developed at the site of injection were removed out. Then, mean AgNOR number and total AgNOR area/nuclear area (TAA/NA) were detected for each mice. Significant differences were detected among all groups for mean AgNOR number ($p=0.000$) and TAA/NA ratio ($p=0.000$). In comparison of two groups; while the difference was not significant between positive control and Rhamnetin (100 µg/kg) groups ($p=0.387$), there are significant differences between positive control and Rhamnetin (200 µg/kg) groups ($p=0.000$) and between Rhamnetin (100 µg/kg) and Rhamnetin (200 µg/kg) groups ($p=0.000$) for TAA/NA ratio. Rhamnetin has an important role again to cancer formation. Also our study showed that mean AgNOR numbers and TAA/NA values may be used as biomarkers for evaluation of success rate of the performed therapeutic strategy and accurate dose selection for management of the disease.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

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. Günümüzde tedavide başarılı olmak ve kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek üzere yapılan çalışmalar deney hayvanlarında oluşturulan deneysel hayvan tümörleri 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 geçmişi vardır. Bazı antikanser bileşenleri binlerce yıldır geleneksel tıp sistemi içinde kullanılmıştır (Agrawal 2011). Bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan flavonoidler de antitümöral etki gösteren bileşiklerdir. Bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidratlar, aminoasitler gibi birincil metobolitlerden türetilirler. Bu çalışmada Ehrlic tümörü oluşturulmuş ve daha sonra rhamnetin'in değişik konsantrasyonları (100 mg/ 200 mg)uygulanmış farelerin tümör kitlelerindeki, tümör hücrelerinde AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı / Çekirdek alanı değerlerini (TAA/ÇA) bir bilgisayar programı (ImageJ version 1.47t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) kullanarak hesaplamayı amaçlıyoruz. Böylece her bir grup (Tümör pozitif kontrol, Solid tümör + 100 mg Rhamnetin, Solid tümör + 200 mg Rhamnetin) için ortalama AgNOR sayısı ve TAA/ÇA değerleri belirlenmiş olacaktır. Ayrıyeten bir patoloji uzmanı tarafından her bir gruptaki hayvandan elde edilen biyolojik materyallerden hazırlanmış preperatlar için histopatolojik değerlendirme yapılacaktır. Böylece hiçbir tedaviye maruz bırakılmamış tümörlü grup ile değişik konsantrasyonlarda farklı tedavilere maruz bırakılmış tedavi gruplarındaki AgNOR parametrelerindeki değişiklikler ve histopatolojik değişiklikler belirlenerek uygulanan tedavilerin tümörün prognozu ve tedavisindeki etkinliği belirlenmeye çalışılacak aynı zamanda histopatolojik değerlendirme skoru ile AgNOR parametreleri arasındaki ilişki (korelasyon) tespit edilerek yalnızca AgNOR parametrelerinin tespit edilmesinin histopatolojik değerlendirme skoru yerine kullanılıp kullanılamayacağı belirlenecektir. İstatistiksel olarak bir ilişkinin bulunması durumunda tümörün tedavisinde anti-tümör etkinliğe sahip ajanlardan rhamnetinin, hangi konsantrasyonlarda hastalığın tedavisine iyi geldiğinin, hangi konsantrasyonlarda ise fayda sağlamadığının ve değiştirilmesi gerektiğinin tespiti hakkında da bilgi edinilmiş olacaktır. 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, hüüzün vb. psikolojik rahatsızlığında önüne geçilmesine katkı sağlanabilecektir.

GENEL BİLGİLER

NOR (Nukleolus Organizer Region= Çekirdekçik Oluşturan Bölgeler) insan ve diğer ökaryotların kromozomlarındaki çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleridir. Bu bölgeler rRNA sentezledikleri için 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 indirgemektedir (Shiina et al. 1996; Goodman MT et al. 1988; Howell WM, 1982). Hücrenin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi tümörlerin histolojik sınıflandırılmasına yardımcı olması açısından önemlidir (Shiina et al. 1996). Histopatoloji'de, interfaz AgNOR proteinlerinin analizleri preneoplastik ve neoplastik lezyonların ayrılmasında sık olarak kullanılmaktadır (Kuno T et al. 2006). AgNOR proteinleri bir çok kanser türünde hücrel proliferasyonun bir indikatörüdür (Shiina et al. 1996, Cucer et al. 2007, Eroz et al. 2010, 2011, 2013a,b). Bu bölgelerin aktiviteleri direk olarak protein sentezi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktif NOR sayıları, artan hücrel aktiviteyle artar. Burada bahsedilen metodu kullanarak yapmış olduğumuz daha önceki çalışmalarımızda, ortalama AgNOR sayısı ve TAA/ÇA oranının papiller tiroid kanserinde benin tiroid nodüllerine göre anlamlı derecede arttığını tespit ettik (Eroz et al. 2010, 2011). 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 tespit ettik (Eroz et al. 2011, 2013a). 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 sunabileceğini bildirdik (Oktay M. et al. 2015). 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 ettik (Eroz et al. 2013b). 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 metodda 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 protein sentez kapasitesi hakkında daha iyi bilgi verir. Biyomoleküllerin sayısı, hücrenin boyutu ve hücre çekirdeği hücre metabolik aktiviteye bağlı olarak değişmektedir. Bununla TAA/ÇA oranının tespit edilmesi ile hücrelerin metabolik ve proliferatif aktiviteleri hakkında daha kesin bilgiler elde edilebilmektedir. Bizim kullandığımız 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 sayısı 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 sürmektedir (Çevik ve ark. 2012). Kanser alanında uygulanan tedaviler geçmişten günümüze kadar farklı teknikler kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile gelişme kaydetmiştir. Yalnız hangi metod 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. Elde edilmiş bu yana pek çok araştırmaya konu olan deneysel hayvan tümörlerinden biri olan EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış ve Ehrlich & Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir. 1932 yılında Loewenthal ve Jahn (1932) bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır (Özaslan et al. 2011). EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir (Klein et al. 1951). EAT amaca göre asit form veya solid form

olarak kullanılmaktadır. Eğer tümör hücre si içeren assit sıvısı deney hayvanına i.p. yolla enjekte edilirse assit form, s.c. yolla enjekte edilirse solid form elde edilir. Bu çalışmada kullanacağımız tümör modeli olan EAT (Ehrlich Ascites Tumor, Ehrlich Assit Tümörü), transplante edilebilir bir tümör modeli olup ve farelere özgü olmasından dolayı EAT'nin çalışılması tümör değerlendirmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlayacağı düşüncesindeyiz. Araştırmanın konusu olan rhamnatin (7-O-metilquercetin) bir flavonold r. Flavonoller ortak bir kimyasal yapıya sahiptirler. Flavonollar 3 pozisyonunda bir hidroksil grubuna bağlanmış flavonlardır (Deveoğlu ve ark. 2011). Rhamnatin özellikle karanfil bitkisinde olmak üzere, Akdeniz bölgesinde yetişen cehri ve akdiken gibi bazı bitkilerde de bulunur. Rhamnaceae familyasının (k kboyasıgiller) Rhamnus tinctoria cinsine mensup bitkilerine genel olarak cehri denir. Bu bitkiler Anadolu'da uzun yıllar kumaş boyamada kullanılmıştır. Bu familyadan olan akdikenin meyveleri idrar söktürücü ve m şhil olarak kullanılmaktadır. Taze meyvelerinden hazırlanan şurup, kuru meyvelerinden yapılan toz da aynı amaçla kullanılır. Flavonoidlerin Antitümör etki mekanizması: Flavonoidler hücreler arası iletişimi arttırarak, ornitindekarboksilazi ve timidinin DNA'nın yapımına katılımını engelleyerek hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca ilgili reseptörleri bloke etmek suretiyle antiproliferatif etki göstermekte, laktat transportunu inhibe etmekte, kalmodulini inhibe ederek vaskuler dokunun endotelyumundaki nitrikoksit (NO) sentezinin regulasyonunu düzenlemekte, apoptozis'i uyararak antianjiogenik etki sergilemek suretiyle antitümör etki göstermektedir (von Brandenstein et al. 2008, Wang et al. 2004, Ara jo et al. 2011).

Benin ve malin tiroid dokusu (Eroz R, 2011; Eroz R 2013a,b; Eroz R2012a, Oktay M 2015), alopesili ve sağlıklı insanların sa kökü hücreleri (Eroz R2012b; Eroz R2013c), Down sendromlu infantların ve sağlıklı bireylerin ağız epitel hücreleri (Eroz R2012c; Selvi B 2015), ve CO maruziyetinin kalp ve akciğer hücrelerindeki NOR proteinleri üzerine etkisi ile ilgili olan AgNOR proteinlerinin önemi hakkında bir çok çalışma yapılmıştır (Colakoglu S 2015; Kandis H 2015; Saritas A 2015). Bununla beraber bildiğimiz kadarıyla literatürde subkutan solid Ehrlic tümörü oluşturulmuş ve daha sonra tedavi amaçlı subkutan olarak 100 mg ve 200 mg Rhamnatin uygulanmış farelerin solid tümör kitlelerindeki tümör hücrelerinde, AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı / çekirdek alanı değerlerinin (TAA/A) ve bu AgNOR parametreleri ile histopatolojik değerlendirme skoru arasındaki ilişkinin araştırıldığı hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle biz bu çalışmayı yapmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında daha önceden Prof. Dr. Erdoğan UNUR'un yürütücülüğünde 14/30 etik kurul kararı ile etik izin alınan Ehrlich Assit Tümörü Enjekte Edilen Farelerde Rhamnetin'in Etkisinin Araştırılması başlıklı çalışmada kullanılan hayvanların tümör dokuları çalışma için kullanılacaktır. Histopatolojik değerlendirme için, subkutan solid Ehrlich tümörü oluşturulmuş ve daha sonra tedavi amaçlı subkutan olarak 100 mg ve 200 mg Rhamnetin uygulanmış farelerin solid tümör dokusundan yaklaşık 1x1x1 cm³ büyüklüğünde doku örnekleri alınarak rutin histolojik takip ile doku örnekleri %10'luk formaldehitte 24 saat fikse edilecek, değişik konsantrasyondaki etil alkol serilerinden ve ksilenden geçirilecek ve parafine gömülecektir. Daha sonra elde edilen parafin bloklarından 4 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin eosin boyaması yapıp ışık mikroskopunda değerlendirilecektir. Tümör Dokusu resimleri fotoğraf makinesi ataçmanlı bir ışık mikroskobu (Olimpus, Tokyo, Japan) yardımıyla fotoğraflanacaktır.

AgNOR Değerlendirme

subkutan solid Ehrlich tümörü oluşturulmuş ve daha sonra tedavi amaçlı subkutan olarak 100 mg ve 200 mg Rhamnetin uygulanmış farelerin solid tümör dokusundan yaklaşık 1x1x1 cm³ büyüklüğünde doku örnekleri alınarak rutin histolojik takip sonrası 4 µm kalınlığında kesitler alınarak ksilende deparafinize edilip ve değişik konsantrasyondaki alkol serilerinden geçirilerek rehidre edilecek. Daha sonra hazırlanan preparatlar 15 dakika oda sıcaklığında kurutulup fiksatifte 5 dakika fikse edilecek (3birim metanol:1 birim asetik asit). Tüm preparatlar için Benn ve Perle ve Lindnerin protokolunun hafif modifiye edilmiş hali ile AgNOR boyamaya tabi tutulacaktır (Benn and Perle M, 1986; Lindner LE, 1993). Bunun için alimünyum folyo ile sarılmış nemli petri kaplarında hazırlanmış doku örneklerini içeren preparatlara %2'lik jelatinli formik asit ve %50 AgNO₃ karışımı ile hazırlanmış boya solüsyonu damlatılarak 37 0C'lik etüvde 15 dakika bekletilerek AgNO₃ ile çekirdekçik oluşturan bölge ile ilgili NOR proteinlerinin boyanması sağlanacak. Preparatlar etüvden çıkarıldıktan sonra sudan geçirilerek preparatlardaki AgNOR boyalı tümör hücre resimleri fotoğraf makinesi ataçmanlı bir ışık mikroskobu (Olimpus, Tokyo, Japan) yardımıyla fotoğraflanacaktır. Fotoğraflanmış her bir hücrenin AgNOR sayısı ile toplam AgNOR alanı / Çekirdek alanı değerleri (TAA/ÇA) bir bilgisayar programı (ImageJ version 1.47t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) kullanarak hesaplanacaktır. Her bir hayvandan toplam 100 hücre değerlendirilecektir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek her bir gruptaki AgNOR parametrelerindeki değişiklik karşılaştırılacak ve bu parametrelerin tümörün prognozu ve histopatolojik değerlendirme skoru ile ilişkisinde araştırılacaktır.

BULGULAR

Tüm gruplar arasında hem ortalama AgNOR sayısı hem de TAA/NA oranı için anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.000$). İkili grup kıyaslamalarında; pozitif control ve Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) grupları arasındaki fark anlamlı değilken ($p=0.387$), pozitif control ve Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ve Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ve Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) grupları arasındaki fark TAA/NA oranı için anlamlıydı ($p=0.000$). Elde edilen sonuçlar aşağıda tablo ve figür halinde verilmiştir.

Tablo 1: Tüm gruplardaki TAA/NA ve ortalama AgNOR sayı değerleri.

Groups	TAA/NA	Mean AgNOR number
Positive Control-1	0.1529±0.0869	1.700±0.9313
Positive Control-2	0.1504±0.0656	2.300±1.1824
Positive Control-3	0.1524±0.0767	2.8800±1.5733
Positive Control-4	0.1517±0.0903	2.700±1.6568
Positive Control-5	0.1526±0.0925	2.3800±1.2103
Positive Control-6	0.1512±0.0548	2.0400±1.1058
Positive Control-7	0.1502±0.0471	1.7200±0.0858
Positive Control-8	0.1518±0.0764	1.8800±1.0427
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-1	0.1470±0.1774	1.9400±1.0383
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-2	0.1466±0.0517	2.0200±1.1516
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-3	0.1442±0.0543	1.5010±0.7626
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-4	0.1489±0.0659	1.6400±0.8514
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-5	0.1473±0.0514	1.1800±0.3881
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-6	0.1483±0.0535	1.5000±0.7627
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-7	0.1489±0.0896	1.4600±0.7879
Rhamnetin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-8	0.1466±0.0473	1.8000±0.9035
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-1	0.1241±0.0749	1.3600±0.6627
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-2	0.1268±0.0519	1.8400±0.7384
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-3	0.1282±0.0940	2.1201±0.9612
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-4	0.1264±0.0865	2.1200±1.0428
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-5	0.1248±0.0480	1.6600±0.8478
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-6	0.1251±0.0492	1.9010±0.9091
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-7	0.1263±0.0549	1.6000±0.6388
Rhamnetin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)-8	0.1255±0.0594	1.9000±0.7889

TAA/NA: Total AgNOR area/Nuclear area

Tablo 2: Üç grubun karşılaştırmalı TAA/NA ve ortalama AgNOR sayı değerleri.

	TAA/NA	AgNOR Number	P	χ^2
Positive Control	0.1516±0.07463	2.200±1.2820	0.000*	47.082*
Rhamnetin (100 µg/kg)	0.1473±0.0838	1.630±0.0444		
Rhamnetin (200 µg/kg)	0.1259±0.0664	1.813±0.0431	0.000&	50.774&

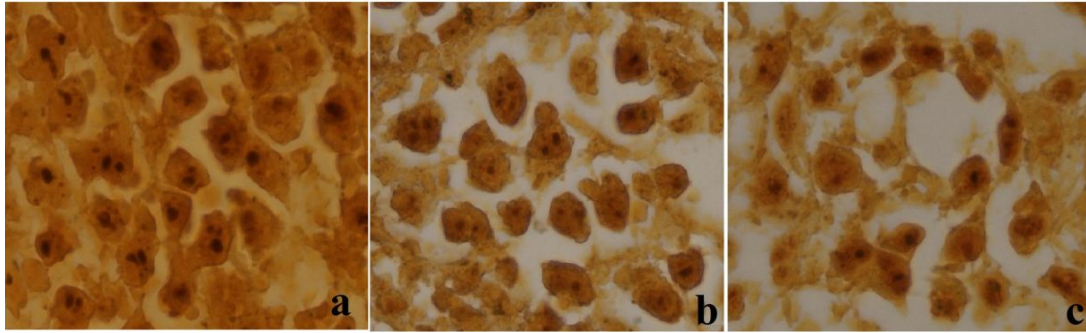
*:For TAA/NA &: For Mean AgNOR number TAA/NA: Total AgNOR area/Nuclear area

Tablo 3: Grupların ikili karşılaştırmalı TAA/NA ve ortalama AgNOR sayı değerleri.

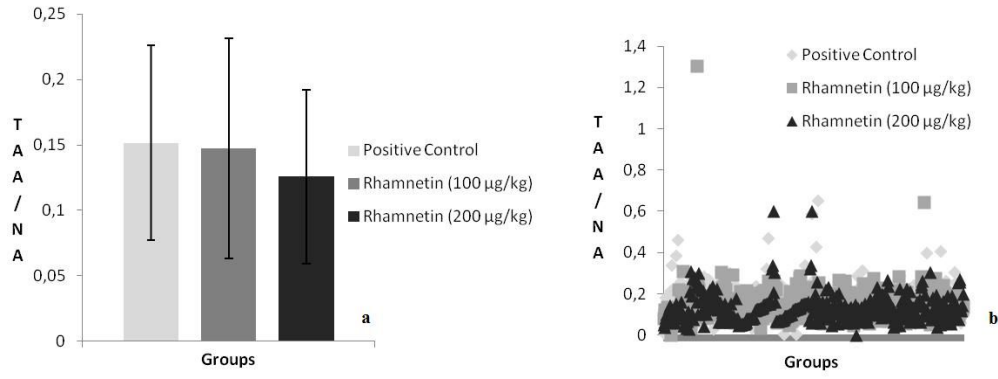
Groups	For TAA/NA		For Mean AgNOR number	
	P	Z	P	Z
Positive Control - Rhamnetin (100 µg/kg)	0.387	-0.866	0.000	-7.011
Positive Control - Rhamnetin (200 µg/kg)	0.000	-6.274	0.000	-3.681
Rhamnetin (100µg/kg)-Rhamnetin (200 µg/kg)	0.000	-5.521	0.000	-3.698

TAA/NA: Total AgNOR area/Nuclear area

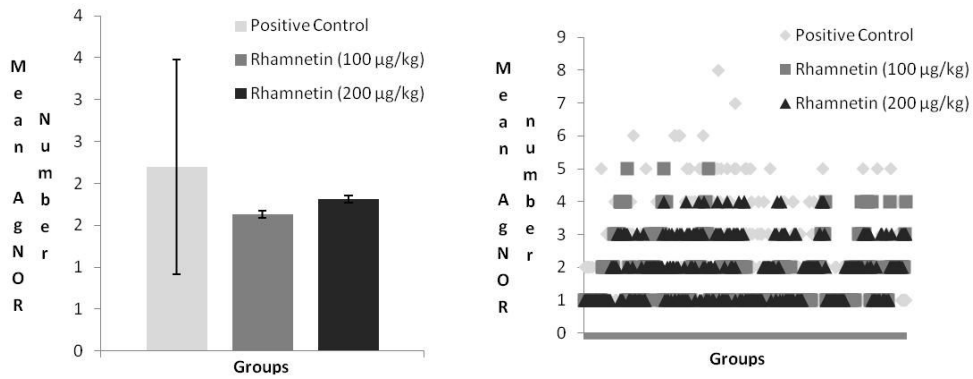
Şekil 1: AgNOR boyalı hücrelerin görünümü (a: positive control; b: Rhamnetin (100 µg/kg) group and c: Rhamnetin (200 µg/kg) group).



Figür 2: Üç grubun TAA/NA açısından karşılaştırılması



Figür 3: Üç grubun Ortalama AgNOR sayısı açısından karşılaştırılması



TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma Ehrlic tümörü oluşturulmuş farelerde Rhamnetin'in anti kanserojen etkisini AgNOR protein sentezi yönünden değerlendiren ilk çalışmadır. Rhamnetin kanser oluşumuna karşı önemli bir role sahiptir. Bu rol proliferasyon indeksinin bir göstergesi olarak kullanılan TAA/NA değerinin tedavi uygulanmış gruplarda azalmasıyla kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamız aynı zamanda ortalama AgNOR sayısı ve TAA/NA değerlerinin uygulanacak olan

tedavi stratejisinin başarı oranını değerlendirmek için ve hastalığın yönetiminde uygun doz seçimi için bir biyomarkır olarak kullanılabilceğini gösterdi. Çalışmamızın bundan sonraki çalışmalara öncülük edeceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

Agrawal SS., Saraswati S., Mathur R., Pandey M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. *Food and Chemical Toxicology* 49(2011):1924–1934.

Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res.* 2011;31(2):77-87.

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.

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*, 24-31pp., 2015
Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, et al. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. *JMIC*. 1025 1-6, 2007.

Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy M. Kanser tedavisinde lenfatik hedeflendirme. *Hacettepe üniversitesi eczacılık fakültesi dergisi*. Ocak 2012. 32(1): 67-90.

Deveoğlu O, Karadağ R. Genel Bir Bakış: Doğal Boyarmaddeler. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2011 , 23(1) 32-3.

Eroz R, Cucer N, Karaca Z, Unluhizarcı K, Ozturk F, “The Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid” , *Endocr Pathol* , 74–78 pp., 2011 , DOI:- 10.1007/s12022-011-9161-z.

Eroz R, Cucer N, Unluhizarcı 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. doi: 10.1002/cbin.10038.

Eroz R, Okur M, Ozkan A, Berik O, Gunes G, “Does higher NORs expression affect the developmental stages of down syndrome infants?” , *Genetic Counseling* , 249-253 pp., 2012c

Eroz R, Tasdemir S, Dogan H, “Is there any relationship between decreased AgNOR protein synthesis and human hair loosing” , *Biotech Histochem* , 494-498 pp., 2012b ,

Eroz R, Unluhizarcı 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*, 226-232, 2013a

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*, 267-271 pp., 2013c, ID:769632,

Eröz R, Ünlühizarcı K, Cücer N, Baltacı D, Oktay M, “Kistik Nodüler Guatrırlı Olguların Tiroid Hücrelerindeki AgNOR Sayısı ve AgNOR Yüzey Alanı/Çekirdek Alanı Oranının Yaş ve Cinsiyete göre Karşılaştırılması” , *Konuralp Tıp Dergisi* , 31-35 pp., 2012a,

Goodman MT, Yoshizawa CN, Kolonel LN. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Hawaii. *Cancer*. 1988; 61: 1272-1276

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, pp 89-142

Kandis H, Afacan MA, Eroz R, Colakoglu S, Bayramoglu A, Oktay M, Saritas A, Colak S, Kaya M, Kara IH. “Can argyrophilic nucleolar organizing region-associated protein amount be used for the detection of cardiac damage?” , *Human and Experimental Toxicology* 2015, Early Online: 1–9

Klein G, Klein E. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into an"ascites tumor". *Cancer Res*. 1951;11(6):466-9.

Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, et al. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. *Oncol. Rep*. 15(3), 533-538, 2006.

Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41(3): 439–445.

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*, 179-183 pp., 2015,

Özaslan M., Karagöz ID., Kılıç IH., Güldür ME. Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*. 2011.10(13): 2375-2378.

Saritas A, Gunes H, Colakoglu S, Eroz R, Aköz 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* 2015, Early Online: 1–8,

Selvi B, Demirtas H, Eroz R, Imamoglu N. Investigation of the age-dependent AgNOR protein level in buccal epithelial cells of healthy individuals. *Aging Clinical and Experimental Research*, 201-208 pp., 2015, DOI: 10.1007/s40520-014-0263-6

Shiina H, Knuehl 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.* 29. 99-105, 1996.

von Brandenstein MG, Ngum Abety A, Depping R, Roth T, Koehler M, Dienes HP, Fries JW. A p38- p65 transcription complex induced by endothelin-1 mediates signal transduction in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.*2008;1783(9):1613-22.

Wang W, VanAlstyne PC, Irons KA, Chen S, Stewart JW, Birt DF. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer.* 2004;48(1):106-14.

EKLER

Proje ile ilgili makale Bratislava Medical Journal dergisinde No. 333/2016 numarası ile Kabul edilmiş olup, aşağıda derginin web sayfasından alınan Kabul sayfası eklenmiştir. Makale içerisinde ERÜ BAP biriminden destek alındığı belirtilmiştir.

ARTICLES ACCEPTED FOR PUBLICATION

No. 131/2014

A glioblastoma focus detected within non-contrast enhancing astrocytoma using 5-aminolevulinic acid

Šteňo A, Fabian M, Jezberová M, Belan V, Rychlý B, Šteňo J

No. 63/2016

The mystery of HDL

Kasko M, Dukat A, Gaspar L, Kasko V, Kucera M, Oravec S

No. 296/2016

GSM-Like Radiofrequency Exposure Induces Apoptosis via Caspase-dependent Pathway in Infant Rabbits

Meral O, Ozgur E, Kismali G, Guler G, Alpay M, Sel T, Seyhan N

No. 297/2016

Unending saga of fighting cholesterol: Evacetrapib is another fallen warrior

Simko V

No. 304/2016

Micro RNA-126 coordinates cell behavior and signaling cascades according to characteristics of breast cancer cells

Turgut Coşan D, Öner Ç, Mutlu Şahin F

No. 308/2016

Total hip arthroplasty and total knee arthroplasty in patients with cardiovascular disease: risk of perioperative bleeding and ischemic complications

Džupa V, Mořovská Z, Widimský P, Waldauf P, Ondráková M, Bartoška R, Ježek M, Lena T, Popelka O, Krbec M

No. 333/2016

May Argyrophilic Nucleolar Organizing Region-associated Protein Synthesis Be Used for Selection of the Most Reliable Dose of the Drugs Such As Rharnetin in Cancer Treatments

Ertekin T, Bozkurt O, Eroz R, Nisari M, Bircan D, Nisari M, Unur E

No. 334/2016

The effect of mad honey on testosterone levels of male rats

Tatli O, Karaca Y, Turkmen S, Gulgen GS, Sahin A, Eryigit U, Fazli O, Karaguzel E, Mentese A, Orem A, Cansu A, Tureli S, Gunduz A

No. 336/2016

The effects of electromagnetic radiation (2450 MHz wireless devices) on the heart and blood tissue: role of melatonin

Gumral N, Saygin M, Asci H, Uguz AC, Celik O, Doguc DK, Savas HB, Comlekci S

Last modification July 29, 2016.

Belge sonu