

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

DEİNOKSANTİN VE DOSETAKSEL KOMBİNASYONUNUN PC-
3 İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Filiz ÇANKAYA

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2022
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEİNOKSANTİN VE DOSETAKSEL KOMBİNASYONUNUN PC-3 İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Filiz ÇANKAYA

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

Kanser dünya üzerinde milyonlarca insanı etkileyen önemli bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmalar sonucunda onlarca farklı tipte kanser türü tanımlanmıştır. Prostat kanseri en sık görülen kanserler arasında ön sıralarda gelmektedir. Prostat kanserine karşı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, bu kanserin biyokimyasal ve genetik parametrelerinin iyi anlaşılması önemli rol üstlenmektedir.

Kanser tedavisinde, son yıllarda araştırmacılar tarafından iki, üç veya daha fazla anti kanser etkisi olabilecek etken maddelerin birlikte denenmesi önem kazanmıştır. Bu tarzda uygulamaların en önemli avantajlarından bir tanesi ortaya çıkabilecek ilaç direnç oluşumlarını en aza indirmektir.

Taksan grubu bir kemoterapötik olan dosetaksel, prostat kanserinde tübülün depolimerizasyonunu engelleyerek, mikrotübüllerin stabilizasyonu yoluyla antitümöral etki göstermektedir.

Deinococcus radiodurans bakterisinin hücre duvarından elde edilen deinoksantin ile yapılan anti kanser çalışmalarda pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkisinin olduğu görülmüştür.

Tez kapsamında dosetaksel ve deinoksantin Prostat kanseri hücre hattı (PC-3) üzerine anti-kanser ve anti-proliferatif sinerjik etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda hücre kültürüne maddelerin ayrı ve kombinasyonlarının uygulanması sonucunda; *BAX*, *BCL2* ve *CASPASE 3* genlerinin ifade düzeyleri ve protein seviyelerinin araştırılması RT-qPCR ve ELISA yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir.

2022, 49 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Deinoksantin, Dosetaksel, PC-3, Prostat Kanseri

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE APOPTOTIC EFFECTS OF DEINOXANTINE AND DOCETAXEL COMBINATION ON PC-3 HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE

Filiz ÇANKAYA

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Mehmet KUZUCU

Cancer is the most important disease affecting millions of people around the world. As a result of research, dozens of different types of cancer have been defined. Prostate cancer is among the most common cancers. A good understanding of the biochemical and genetic parameters of this cancer plays an important role in the development of treatment methods against prostate cancer.

In the treatment of cancer, it has become important for researchers to test two, three or more of the active substances that can have anti-cancer effects together in recent years. One of the most important advantages of such applications is to minimize the emergence of drug resistance.

Docetaxel, a taxane group chemotherapeutic, has an antitumoral effect through stabilization of microtubules by inhibiting tubulin depolymerization in prostate cancer.

Anti-cancer studies with deinoxant obtained from the cell wall of *Deinococcus radiodurans* bacterium showed that it has pro-apoptotic and anti-proliferative effects.

Within the scope of the thesis, the anti-cancer and anti-proliferative synergistic effects of Docetaxel and Deinoxanthin on Prostate cancer cell line (PC-3) were investigated. In this context, as a result of applying separate and combinations of substances to cell culture; The expression levels and protein levels of *BAX*, *BCL2* and *CASPASE 3* genes were investigated by RT-qPCR and ELISA methods.

2022, 49 Pages

Keywords: Deinoxanthin, Docetaxel, PC-3, Prostate Cancer

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam da desteğini ve yardımını hiçbir zaman eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden her daim faydalanabildiğim çok değerli danışman hocam, sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunmaktayım. Hücre kültürü çalışmalarının her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZGÜR, Dr. Ahmet ÇETİN ve Nihan GÜNAY'a teşekkürlerimi sunarım. Deinoksantin üretimi ve saflaştırılmasında bana her zaman destek veren Seda KILINÇ'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Lisansüstü eğitimim süresince beni her zaman destekleyen sevgili eşim Murat ÇANKAYA'ya ve her daim yanımda olan sevgili çocuklarıma sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Filiz ÇANKAYA

Şubat 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Prostat Kanseri	4
2.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	6
2.2.1. Yaş.....	6
2.2.2. Etnik köken	6
2.2.3. Aile tarihi.....	6
2.2.4. Genetik Faktörler.....	6
2.3. Prostat Kanseri Evreleme	7
2.4. Genetik Değişiklikler	10
2.5. Dösetaksel	11
2.6. Deinoaksantin.....	12
2.7. Kombinasyonel İlaç Çalışmaları	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	20
3.1.2. Hücre hattı	20
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	20
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları	22
3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları	22
3.2.1.2. Hücre kültürünün pasajlanması.....	22
3.2.1.3. Hücre kültürünün stoklanması	24

3.2.1.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi	24
3.2.1.5. Hücre sayımı	25
3.2.2. Sitotoksosite çalışmaları.....	25
3.2.2.1. Sitotoksosite çalışmasında kullanılacak kimyasalların hazırlanması.....	25
3.2.2.2. Hücre canlılık testi	26
3.2.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	27
3.2.4. RNA ve cDNA konsantrasyonu ve saflığının tespiti.....	28
3.2.5. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi	29
3.2.6. Protein ekstraksiyonu	30
3.2.7. İstatistiksel hesaplamalar.....	31
4. BULGULAR	32
4.1. Hücre Canlılık Testi	32
4.2. Kombinasyonel Etki Değeri	33
4.3. Gen İfade Düzeyleri	37
4.4. Protein Seviyeleri	38
4. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	41
KAYNAKLAR	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Normal/Kanser Hücresi Bölünmesi	5
Şekil 2.2. Prostatın canlı vücudunda görünümü	5
Şekil 2.3. Dosetaksel'in moleküler yapısı	12
Şekil 2.4. Deinoksantin moleküler yapısı (Betlem vd., 2012)	15
Şekil 3.1. PC 3 prostat kanseri hücre hattına ait inverted mikroskop görüntüleri	22
Şekil 3.2. Hücrelerin steril ortamda pasajlanması	24
Şekil 3.3. Kombinasyon indeksi değerlendirmesi.....	27
Şekil 4.1. 24 saat inkübasyon süresinde PC-3 hücre hattı üzerine deinoksantin (DE), dosetaksel (DO) ve DE+DO nun antiproliferatif aktivitesi	32
Şekil 4.2. 48 saat inkübasyon süresinde PC-3 hücre hattı üzerine deinoksantin (DE), dosetaksel (DO) ve DE+DO nun antiproliferatif aktivitesi.	32
Şekil 4.3. Şekil 4.3. Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin CI değerleri	33
Şekil 4.4. Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin, 24 saatlik inkübasyon süresinde Doz-Effect eğrisi.	34
Şekil 4.5. 24 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin Median-Effect grafiği	34
Şekil 4.6. 48 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin İndeksi grafiği.....	35
Şekil 4.7. 48 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin Doz-Effect eğrisi.	36
Şekil 4.8. 24 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin Median-Effect grafiği.	36
Şekil 4.9. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının <i>BAX</i> geni ifade düzeyine etkisi	37

Şekil 4.10. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının <i>BCL2</i> geni ifade düzeyine etkisi	37
Şekil 4.11. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının <i>Caspase-3</i> geni ifade düzeyine etkisi	38
Şekil 4.12. Dosetaksel, Deinoksantin ve kombinasyonlarının BAX proteini miktarı üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.13. Dosetaksel, Deinoksantin ve kombinasyonlarının Bcl-2 proteini miktarı üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.14. Dosetaksel, Deinoksantin ve kombinasyonlarının Caspase-3 proteini miktarı üzerine etkisi.....	39

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	26
Tablo 3.2. RNA saflaştırma için deney seti kodları.....	29
Tablo 3.3. Analizi yapılan genlere ait Primer sekanslar.....	30
Tablo 3.4. RT-qPCR deneysel çalışmasında uygulanan sıcaklık döngüsü.....	30
Tablo 3 5. Protein ekstraksiyonu için deney seti kodları.....	31
Tablo 4.1. 24 Saat inkübasyon süresinde deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) kombinasyonlarının CI değerleri.....	33
Tablo 4.2. 48 Saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin CI değerleri.....	35
Tablo 4.3. BAX, BCL2 ve Caspase-3 protein seviyeleri.....	40

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Celsius
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
dk	Dakika
L	Litre
M	Molar
ml	Mili litre
ng	Nano gram
nm	Nano metre

Kısaltmalar

DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERBB2	Eritroblastik Onkogen B 2
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HSGM	Halk Sağlığı Genel Merkezi
MDR	Çoklu İlaç Direnci
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kanser vücudun herhangi bir organ ya da dokusundaki hücrelerin anormal ve kontrolsüz büyümesi ve çoğalması sonucu oluşan malign hastalık tablosudur (Bkz. Şekil 2.1). Kanser hücreleri anormal bir şekilde bölünürler ve çoğalırlar dolayısıyla bulundukları alandaki doku ve organlara baskı yapma ve sıkıştırma gibi istenmeyen tablolara neden olabilmektedirler. Kanser hücreleri bulundukları tümörden ayrılırlarsa kan ve lenf dolaşımı yoluyla diğer doku ve organlara giderek burada metastaz dediğimiz yayılımı gerçekleştirirler (Mackay vd., 2006; Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kansere etkili tedavinin uygulanabilmesi için özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Kanser hücrelerinin karakterizasyonunu yapılmasında hücre döngüsünün hızlanması; genomik değişiklikler, invaziv büyüme; artan hücre hareketliliği; kemotaksis; hücresel yüzeydeki değişiklikler; litik faktörlerin salgılanması vb. özelliklerinde faydalanılarak yapılır. Kanserli hücreler morfolojik olarak düzensiz boyut ve şekle sahip büyük bir çekirdek ile karakterize edilir, nükleoller belirgindir, sitoplazma kıt ve yoğun renkli veya tam tersine soluktur (Ba ve Cătoi, 2007). Bildiğimiz üzere kanser tek bir hastalık değildir, 120'den fazla çeşidi mevcuttur (NCI, 2022).

Prostat kanseri, Batı dünyasında erkeklerde en sık görülen deri dışı malignitedir ve uzun süredir heterojen bir hastalık olduğu bilinmektedir (Siegel vd., 2018). Prostat kanserinin klinik görünümü, lokalize tembellikten hızla ilerleyen ölümcül metastatik hastalığa kadar değişebilir (Sartor ve de Bono, 2018; Nelson vd., 2003). Erkeklerin çoğuna organa sınırlı hastalık teşhisi konmasına rağmen, uzun vadeli onkolojik sonuçlar büyük ölçüde değişebilir (Pound vd., 1999; Litwin ve Tan 2017). Ayrıca, histomorfolojik ve moleküler tümör özellikleri, farklı hastalar arasında ve belirli bir tümör içinde önemli çeşitlilik gösterir. Bu, tanısal zorluklar doğurur ve klinik yönetim için önemli etkileri vardır. Primer prostat kanseri teşhisinin karmaşıklığının çoğu, hastalığın çok odaklı yapısından kaynaklanmaktadır. Çok sayıda rapor, primer prostat kanserlerinin >%80'inin çoklu topografik ve histomorfolojik olarak farklı tümör odakları gösterdiğini belgelemiştir (Aihara vd., 1994; Andreoiu ve Cheng, 2010; Sartor ve de Bono, 2018).

Sağlık sisteminde kullanılan kanser önleyici kemoterapötik ajanların çoğu, kanser hastalarının yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan yan etkilere sahip olabilir. Bu sebeple,

kanser ilaçlarını yeniden değerlendirerek, kanser ilacı geliştirme süreçlerinde geleneksel ilaç geliştirme sürecinin verimsizliğini iyileştirebilir. Bu şekilde de prostat kanserinde terapötik olarak kullanılmak üzere yeniden tasarlanan ilaçlara odaklanmak kanserin tedavisi açısından önemli olabilecektir. Araştırmacıların bu doğrultuda yalnızca yeni kanser ilaç adaylarını keşfetmelerini yanı sıra, aynı zamanda farklı ilaç türevlerini de yeniden konumlandırma çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Prostat kanseri tedavisi için kullanılan ilaçlar, doku tipinden bağımsız olarak farklı kanser türlerinde ortak yollar veya hedefler paylaşılacağından potansiyel olarak diğer kanser türlerinde kullanılabilir (Shim ve Liu, 2014; Vanhaelen vd., 2017).

Dosetaksel, hormona dirençli prostat kanseri üzerinde kesin etkisi olan ilk sitotoksik ilaçtır (Beer vd., 2005). In vitro deneyler, prostat kanseri hücre hattının büyümesinin, daha yüksek hücre içi ilaç seviyesi ve daha uzun alıkonma süresi nedeniyle antikanser aktivitesi taksolden daha yüksek olan bir ilaç olan dosetaksel tarafından etkili bir şekilde inhibe edildiğini ortaya koydu (Che vd., 2013). Bununla birlikte, dosetaksel, özellikle kalbe yönelik ciddi yan etkilerin olmadığı rapor edilmiştir (Guillen vd., 2015). Dosetaksel, prostat spesifik antijen artışlarını inhibe etme, ağrıyı giderme ve kemoterapiden kaynaklanan advers reaksiyonları azaltma etkileriyle tümörün ilerlemesini geciktirebilir, semptomları azaltabilir ve hasta ömrünü önemli ölçüde uzatabilir (Tamatani vd., 2012).

Deinococcus radiodurans, iyonlaştırıcı radyasyon, kuruma, UV radyasyonu, oksitleyici ajanlar ve elektrofilik mutajenlerin neden olduğu bir dizi hasara karşı dikkate değer bir direnç gösteren bir bakteridir (Makarova vd., 2001). *Deinococcus radiodurans* bu ekstrem şartlarda koruyan sistemlerden biride sentezlendiği karotenoidleri olduğu bir çok çalışmada rapor edilmektedir. Sentezlenen en önemli karotenoid ise deinoksantindir (Tian vd., 2018; Ji, 2010, Cheng vd., 2014).

Deinoksantin DNA üzerinde çok güçlü koruyucu ve onarıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Deinoksantin yapısı birkaç konjuge ikili bağa ve ayrıca 1c pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahiptir. Deinoksantin antioksidan etkisi, verilen yapıya doğrudan ilişkilendirilebilir (Ji, 2010; Xu vd., 2007). Araştırmalar fukoksantin, deinoksantin, β -karoten ve neoksantin gibi maddelerin karotenoid grubu olup, oksidatif strese sebep olan reaktif oksijen üretimin artırarak kanserli hücreyi apoptoza sürüklediğini göstermiştir.

Deinoksantin ile yapılan çalışmalar sonucunda anti kanser aktiviteye sahip olduğu ve kolon, meme, prostat ve benzeri kanserler hücre hatları üzerinde apoptotik stimülatör gibi hareket ettiği çalışmalarla ortaya konmuştur (Choi vd., 2014). Kemoterapi uygulamalarında deinoksantin yardımcı kr maddesi olabilecek bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Tez alışması kapsamında deinoksantin ve dosetakselin prostat pc-3 kanseri hücre hattında sinerjik etkisinin incelemesi; Bcl-2, Bax ve Caspaz-3 genlerinin RT-qPCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve aynı genlerin protein seviyelerinin ELISA yöntemi ile analizi yapılarak mukayese edilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Prostat Kanseri

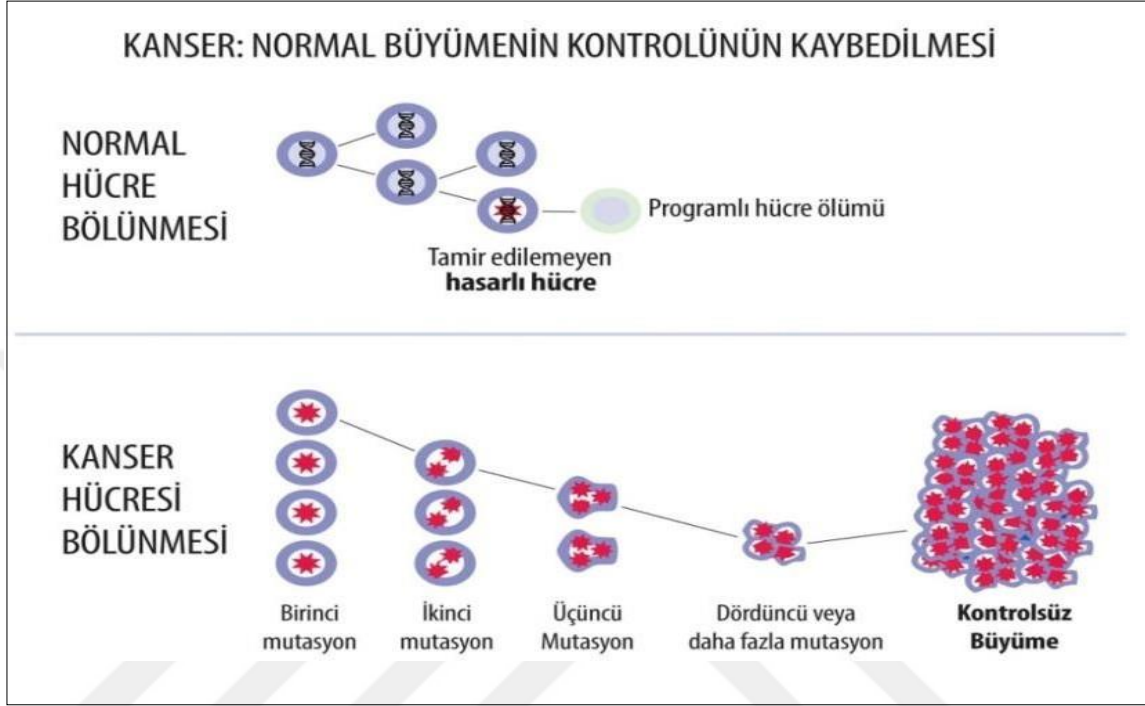
20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biri olan kanser, 21. yüzyılda süreklilik ve artan insidansla daha da yayılıyor. Ortaya çıkan durum analiz yapıldığında günümüzde her dört kişiden biri yaşam boyu kanser riski taşıyor. İnsanlık için önemli bir hastalık olan kanser, milyonlarca insanın hastalanması ve çoğunluğunun hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Bu sebeple de mortalite nedenleri arasında ilk sıralarda gelmektedir (Merey, 2002; Mackay vd., 2006). Prostat kanseri, diğer tüm kanser türleri arasında en sık görülen ikinci malign neoplazmdır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki prostat kanseri insidansı, 20. yüzyılın ikinci yarısı boyunca istikrarlı bir şekilde arttı. Bu artış, yaşam beklentisindeki artışla ve buna bağlı olarak prostat kanseri riski taşıyan yaşlı erkeklerin sayısındaki artışla ilişkili görünmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl iki yüz bin erkeğe prostat kanseri teşhisi konulduğu rapor edilmektedir. Yaşla birlikte kanser görülme sıklığı artar. Prostat kanseri de en sık teşhis edilen kanser türü olup, ölüme neden olarak ta kanser türleri arasında ikinci sırada gelmektedir. 50 yaşında Amerikalı bir erkeğin yaşam boyu latent kanser riski %40, klinik olarak belirgin kanser gelişimi için %16 ve prostat kanserine bağlı ölüm riski %2.9'dur. Prostat kanseri Amerika'da yılda 41000 ölüme neden oluyor (Kuzgunbay ve Yayıcıoğlu, 2015; Siegel vd., 2014; Mackay vd., 2006).

Türkiye'de ise sağlık bakanlığı verileri prostat kanseri insidansının 100.000'de 37,6 olduğunu ve en sık görülen ikinci kanser türü olduğu bildiriliyor. Ayrıca erkeklerde tüm kanser türlerinin %28'ini oluşturmaktadır (Kuzgunbay ve Yayıcıoğlu, 2015; Siegel vd., 2014; Çapık, 2013; Cornford vd., 2017).

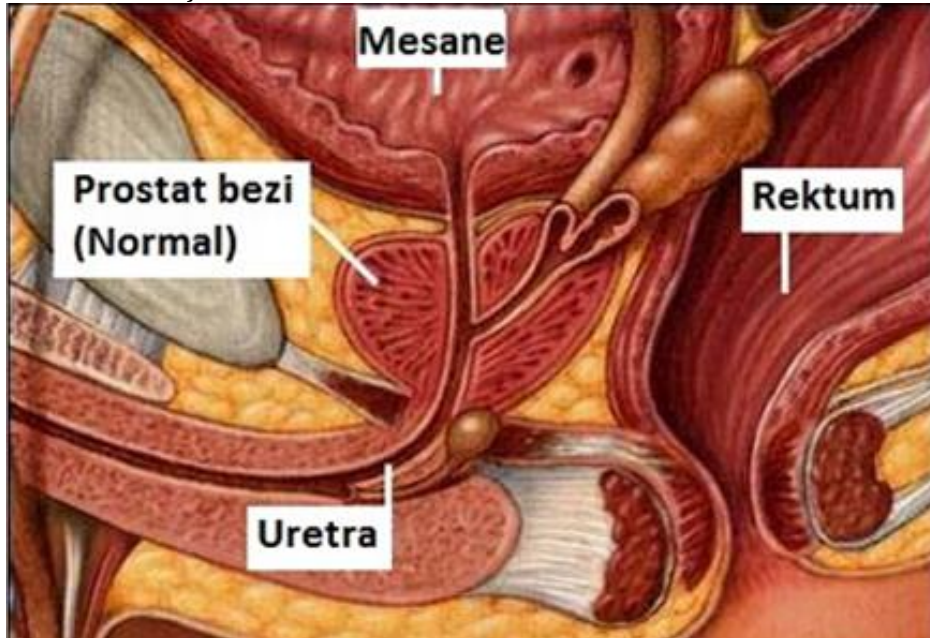
Yaş en önemli risk faktörüdür, ancak ailesinde prostat kanseri öyküsü olanlarda da risk daha yüksek orandadır. Prostat kanserinde ortalama yaş 72'dir (Vinjamoori vd., 2012). Afrika kökenli olup Amerika'da yaşamını sürdürenlerde, hastalık risklerinin artmasının yanında, hastalık oranları da yüksektir. İngiltere'de vakaların %36'sı 75 yaşındaki erkeklerde iken sadece %1'i 50'li yaşların altında olduğu teşhis edildi. (Julie vd., 2009).

Prostat spesifik antijen (PSA) taramasının yaygın kullanımı dahil olmak üzere diğer

faktörlerin de yıllık prostat kanseri insidansındaki artışa katkıda bulunduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 2.2). PSA, prostat bezinin iyi huylu veya kötü huylu hücre tarafından üretilen bir glikoproteindir. PSA taraması, çok sayıda yaygın asemptomatik prostat kanseri vakasını tanımladı (Verim vd., 2013).



Şekil 2.1. Normal/Kanser Hücresi Bölünmesi



Şekil 2.2. Prostatın canlı vücudunda görünümü

2.2. Prostat kanseri risk faktörleri

2.2.1. Yaş

İlerleyen yaş, prostat kanseri gelişimi ile ilişkili en yaygın risk faktörüdür. Tanı konan tüm vakaların yarısından fazlası 70 yaş ve üstü kişilerdir. Prostat kanseri insidansının en yüksek olduğu yaş 90 yaş ve üzeridir (UK, 2017).

2.2.2 Etnik köken

Birleşik Krallık'ta erkeklerde yaşam boyu prostat kanseri riski 8'de 1 iken, farklı etnik kökene sahip erkekler arasında önemli farklılıklar vardır (UK, 2017). İngiltere'de, 4 siyah erkekten 1'inin prostat kanseri teşhisi konacağı tahmin edilmektedir, bu, beyaz erkeklerde tahmin edilen oranın iki katıdır. Asyalı erkekler, 13 erkekten 1'inde meydana geldiği tahmin edilen, yaşam boyu en düşük riske sahiptir. Benzer eğilimler ABD'de de görülmektedir (Loyd vd., 2008; Jemal vd., 2017).

2.2.3 Aile Tarihi

Prostat kanseri olan birinci derece akrabası olan erkeklerin prostat kanserine yakalanma olasılığı en az iki kat daha fazladır. Etkilenen iki birinci derece akraba ile risk daha da artar. Meme kanseri olan bir annenin aile öyküsü, prostat kanseri riskini 1.24 kat arttırmaktadır. Bir başka çalışma, ailede hem prostat hem de meme kanseri öyküsünün, yalnızca ailede prostat kanseri öyküsüne kıyasla prostat kanseri gelişme riskini %89 oranında artırdığını göstermiştir (Bratt vd., 2016; Chen vd., 2008).

2.2.4 Genetik faktörler

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, prostat kanseri riskinin artmasıyla ilişkili 70'den fazla genetik varyasyon tanımlamıştır. Bu varyasyonların çoğu düşük prevalansa sahip olmakla birlikte, kalıtsal prostat kanseri riskinin yaklaşık %30'unu oluştururlar (Eeles vd., 2013).

Artan meme kanseri riskindeki rolleri ile iyi tanınan BRCA1 ve BRCA2 genleri, prostat

kanseri insidansının artmasıyla da ilişkilidir. Erken başlangıçlı prostat kanseri teşhisi konan erkeklerin %2'sinin BRCA2 mutasyonuna sahip olduğu tahmin edilmektedir, bu oran genel popülasyonda 300'de 1'dir (Edwards vd., 2013; Cuzick vd., 2014). Germline BRCA2 mutasyonları, 65 yaşında veya daha önce prostat kanseri gelişme riskinin 8.6 kat artmasıyla ilişkilendirilirken, germline BRCA1 mutasyonu, 3.75 kat gibi daha mütevazı bir risk artışı ile ilişkilidir (Leongamornlert vd., 2012). BRCA2 mutasyonu ve yüksek PSA'sı olan erkeklerde, sonraki biyopside %48'inde prostat kanseri olduğu ve orta veya yüksek riskli hastalığa sahip olma olasılığının daha yüksek olduğu bulundu, bu da bu popülasyonda hedeflenen PSA taramasının faydalı olacağını düşündürmektedir (Bancroft vd., 2014).

2.3. Prostat Kanseri Evreleme

Prostat kanserinin evrelemesinde araştırmacılar tarafında yaygın olarak kullanılan iki sistem vardır. Birincisi 1975'te tanıtılan “Jewett Sistemi” (A-D evreleri) ve ikincisi de Amerikan Ortak Kanseri Komitesi ve Uluslararası Kansere Karşı Birliği tarafından önerilen, Jewett Sistemindeki gibi T kategorilerindeki bazı alt kategorileri revize ederek oluşturulan TNM (Tümör Nodu ve Metastaz) sistemidir (Jewett, 1975; UICC, 2002; Bracarda vd., 2005).

TNM tanımları Primer tümör (T)

Tx: Primer tümör değerlendirilemez,

T0: Primer tümör kanıtı yok,

T1: Klinik olarak görünmeyen tümör, palpe edilemeyen veya görüntüleme ile görülemeyen,

T1a: Rezekte edilen dokunun %5 veya daha azında tümör tesadüfi histolojik bulgu,

T1b: Rezekte edilen dokunun %5'inden fazlasında tümör tesadüfi histolojik bulgu,

T1c: İğne biyopsisi ile tanımlanan tümör (örn. yüksek PSA nedeniyle),

T2: Prostat içinde sınırlı tümör,

T2a: Tümör bir lobun yarısını veya daha azını içerir,

T2b: Tümör bir lobun yarısından fazlasını içerir, ancak her iki lobu da içermez,

T2c: Tümör her iki lobu da içerir,

T3: Tümör, prostat kapsülü boyunca uzanır,

T3a: Ekstrakapsüler uzanım (tek veya çift taraflı),

T3b: Tümör seminal vezikülleri invaze etti,

T4: Tümör fikse veya seminal veziküller dışındaki komşu yapıları invaze etmiş: mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kasları ve/veya pelvik duvar,

Patolojik (pT)

pT2 (Not: Patolojik T1 sınıflandırması yoktur): Organ sınırlı,

pT2a: Tek taraflı, bir lobun yarısını veya daha azını içeren,

pT2b: Tek taraflı, bir lobun yarısından fazlasını tutan, ancak her iki lobu da içermeyen,

pT2c: Bilateral hastalık,

pT3: Ekstraprostatik uzantı,

pT3a: Ekstraprostatik genişleme,

pT3b: Seminal vezikül istilası,

pT4: Mesane, rektum invazyonu,

Bölgesel lenf düğümleri (N)

Nx: Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez,

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok,

N1: Bölgesel lenf düğümü veya düğümlerinde metastaz,

Patolojik

Nx: Bölgesel düğümler örneklenmedi,

pN0: Pozitif bölgesel düğüm yok,

pN1: Bölgesel düğüm(ler)deki metastazlar,

Uzak metastaz (M)

Birden fazla metastaz bölgesi mevcut olduğunda, en gelişmiş kategori kullanılır, pM1c en gelişmiş kategoridir.

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemez

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz

M1a: Bölgesel olmayan lenf düğüm(ler)i

M1b: Kemik(ler)

M1c: Kemik hastalığı olan veya olmayan diğer bölge(ler)

Histolojik derece (G)

Gx: Not değerlendirilemez

G1: İyi diferansiye (hafif anaplazi) (Gleason 2-4)

G2: Orta derecede diferansiye (orta derecede anaplazi) (Gleason 5-6)

G3-4: Yetersiz diferansiye/farklılaşmamış (belirgin anaplazi) (Gleason 7-10) (UICC, 2002; Bracarda vd., 2005)

Jewett evreleme sistemi

Evre A: Klinik olarak saptanamayan tümör prostat bezi ile sınırlıdır ve prostat cerrahisinde tesadüfi bir bulgudur.

Alt evre A1: İyi diferansiye, fokal tutulum, genellikle tedavi edilmez.

Alt evre A2: Orta derecede veya zayıf farklılaşmış veya bezde birden fazla odak içerir.

Evre B: Prostat bezine sınırlı tümör

Alt Aşama B0: Palpe edilemez, PSA tarafından algılandı.

Alt Evre B1: Prostatın 1 lobunda tek nodül.

Alt Aşama B2: 1 lobun daha geniş tutulumu veya her iki lobun tutulumu.

Evre C: Klinik olarak periprostatik alana lokalize olan ancak prostat kapsülü boyunca uzanan tümör; seminal veziküller tutulabilir.

Alt Aşama C1: Klinik ekstrakapsüler uzatma.

Alt evre C2: Mesane çıkışı veya üreter obstrüksiyonu oluşturan ekstrakapsüler tümör.

Evre D: Metastatik hastalık

Alt Evre D0: Klinik olarak lokalize hastalık (yalnızca prostat) ancak kalıcı olarak yüksek enzimatik serum asit fosfataz titreleri.

Alt Aşama D1: Yalnızca bölgesel lenf düğümleri.

Alt Aşama D2: Uzak lenf düğümleri, kemik veya iç organlara metastazlar.

D3 Alt Aşaması: Yeterli endokrin tedavisinden sonra nüks eden D2 prostat kanseri hastaları (Jewett, 1975; Bracarda vd., 2005).

Prostat kanserini için geliştirilen evreleme prosedürleri, kısmen, hastalığın biyoptik teşhisine yol açan benzer araçları (transrektal ultrason ve PSA) kullanılarak geliştirilmiştir. Bunların yanında göğüs röntgeni, karın BT veya MRI ve radyonüklid kemik taraması gibi geleneksel görüntüleme tekniklerinden de faydalanılmıştır, şu anda kemik metastazlarının saptanması için en hassas yöntem (McGregor vd., 1978; O'Donoghue vd., 1978). BT taraması ve MRG ile yapılan taramanın kullanıldığı lenf nodu evrelemesi, %0 ile %70 arasında olan orta düzeyde bir hassasiyet gösterdiğinden dolayı lenf nodu tutulumu riski yüksek hastalar için önerilebilir (UICC, 2002; Bracarda vd., 2005).

Görüntüleme yöntemlerin ile yapılan teşhislerin yeterli olmadığı durumlarda, PSA testinin hastalığın erken evrelerinde tanı konmasında yol göstermiştir. Bununla birlikte, özellikle metastatik olmayan hastalıkta her hasta için en uygun terapötik endikasyonu sağlamak için klinik evrelemeye dayalı risk faktörü sınıflandırmasının oluşturulması büyük önem taşımaktadır (Bracarda vd., 2005). Gleason skoru, PSA, ER, pozitif çekirdek sayısı gibi klinik ve patolojik araçların tümü, bu hastalığı teşhisinde sıkça kullanılan metotlardan bazılarıdır. Bu faktörlerin tahmin değeri, Alan Partin ve arkadaşlarının 1997 yılındaki araştırmaları ile başlayarak, geriye dönük çok sayıda vaka çalışmasının değerlendirilmesinden toplanan tahmin faktörlerinin birleşik analiz sistemlerinin yayılmasına yol açmıştır (Partin vd., 1997). Bu birleşik sistemler (PSA, birincil ve ikincil Gleason dereceleri ve rektal muayeneye dayalı), metastatik olmayan prostat kanseri tedavisinde etkili karar verme için yaygın olarak kullanılır.

Nomogramlar, belirli bir klinik aşamadaki bir hastalığın, kesin patolojik tanıda, organa sınırlı veya ekstrakapsüler, nihai seminal vezikül veya lenf nodu tutulumu ile birlikte olabileceğine dair bir olasılık aralığı verir. Nomogramlardan toplayabildiğimiz, patolojik aşamanın bir tahminini sağlayan bilgiler, hastanın genel sağ kalımını tahmin etmek için de kullanılabilir (Bracarda vd., 2005).

2.5. Genetik Değişiklikler

Tümör hücreleri ile ilgili araştırmalar incelendiğinde birçok genin mutasyona uğradığı görülmüştür. MYC, CCND1, PIK3CA, FGFR1, PTEN, ERBB2, GATA3 ve TP53 en sık

mutasyona uğrayan genlerdir (Nik-Zainal vd., 2016; Pritchard vd., 2016).

Epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya çıkan en önemli sonuçlardan bir tanesi, ailede prostat kanseri öyküsünün varsa riski kayda değer ölçüde arttığı görülmüştür (Lange, 2010). İkiz çalışmalar, prostat kanserinin en kalıtsal kanserler arasında olduğunu göstermiştir. Geniş kapsamlı yapılan ölçekli genom çalışmaları, birçok prostat kanserine yatkınlık lokusunu tanımlamıştır (Lichtenstein vd., 2000).

Huang ve arkadaşları, prostat kanserine yatkınlık geni olarak bilinen HOXB13'ün fonksiyonel bir etkileşim yoluyla kanseri teşvik eden RFX6 geninin ekspresyonunu arttırdığı rapor etmişlerdir (Huang vd., 2014). Genomik çalışmalar, HOXB13'teki ailesel mutasyonları ve DNA onarım genlerini ailesi içinde BRCA2, ATM, CHEK2, BRCA1, RAD51D ve PALB2 gibi genlerde tanımlamıştır (Nik-Zainal vd., 2016; Pritchard vd., 2016).

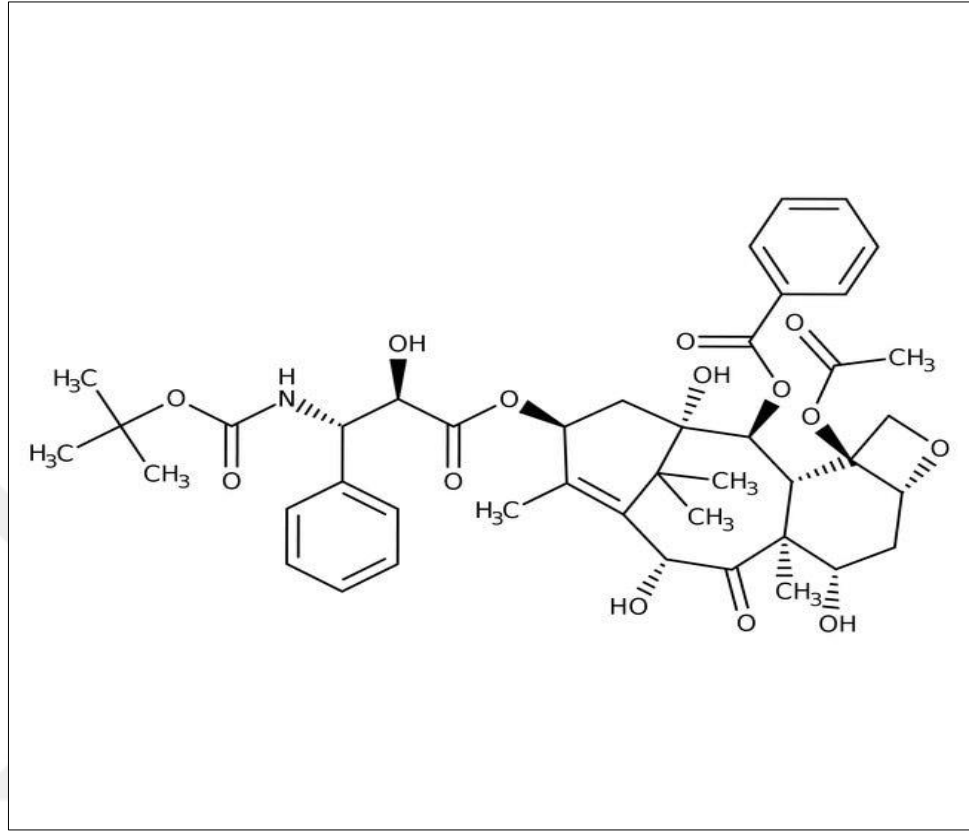
2.5. Dosetaksel

Dosetaksel, taksole dayalı olarak geliştirilmiş ikinci nesil taksan yarı sentetik bir antitümör ilaçtır (Bkz. Şekil 2.3). Ana hedef bölgesinin mikrotübül polimerizasyonunu teşvik eden. Mikrotübül bozunmasını engelleyebilen ve G2/M fazında hücre bölünmesini engelleyen. Bu şekilde de mitoz evresinde kansere etki ederek ve hücre çoğalmasını engellediği yaygın olarak kabul edilmektedir (Small, 2001; Long, 1994; Ganju vd., 2014).

Dosetaksel, moleküler ağırlığı 807.9 ve kimyasal formülü $C_{43}H_{53}NO_{14}$ olan beyaz renkli bir maddedir. Dosetaksel 50:50 (h/h) oranında etanol ve polisorbitat 80 (Tween® 80) karışımında 15 g/L konsantrasyonda hazırlanarak ve erken faz I denemelerinde kullanıldı (Extra vd., 1993).

Dosetaksel, akciğer kanseri, meme kanseri, mide kanseri ve prostat kanseri gibi bir çok kanserinde dahil olduğu farklı endikasyonlar için ABD FDA tarafından onaylanmıştır. Dosetaksel kanser tedavilerinde kullanılan ve standart kanser tedavilerinden biri olmuştur (Haller ev Misset, 2002; Small, 2001; Ganju vd., 2014). Dosetakselin etki mekanizması ve sürekli klinik çalışmalarda elde edilen sonuçlar nedeni ile bir çok kanser tedavisinde

yaygın olarak kullanılmasının önünü açmıştır (Sabzehzari vd., 2020; Ben ve Khanfir, 2020; Singh vd., 2021).



Şekil 2.3. Dosetaksel'in moleküler yapısı

2.6. Deinoksantin

Doğal pigment grupları içinde en çok kayda geçenlerin başında karotenoidler gelmektedir. Bu grubun tanımlanmış olan 600'ün üzerinde farklı tipi mevcuttur (Choi vd., 2014). Farklı türlerde birçok bakteri tarafından karotenoidler sentezlenebilmektedir (Choi vd., 2014). Araştırmacılar tarafından antioksidant aktivitelerinin bulunması ile günümüzde yaygın olarak kronik rahatsızlıklar ve epitel kanseri kullanılan β -karoten, likopen ve astraksantin gibi türevler yüz yıllardır insanlar tarafından gıda boyası olarak ta kullanılmaktaydılar (Sharoni vd., 2002; Rao ve Rao, 2007).

Ultraviyole radyasyonu, dehidrasyon, vakum, γ -ışını ve oksidan maddeler karşı en yüksek dirençli olan bakteri olan *Deinococcus radiodurans* kırmızı pigmentli olup, genellikle tetrat yapıda bulunurlar (Choi vd., 2014).

Pigmentasyona, reaktif oksijen molekülü ve serbest oksijen radikali (OH) gibi aktif oksijen türevlerini alfa-tokoferole ve beta-karotente kıyasla daha iyi şekilde yakalama özelliğine sahip bir karotenoid türevi olan deinoksantin üretimi sebep olur (Deshevaya vd., 2020).

D. radiodurans bulunan da katalaz, süperoksit dismutaz ve ROT temizleme sistemi olarak ortaya çıkan antioksidan mekanizmalar ile pirolokinolin kinon, Mangan (II) ve karotenoidlerinde bulunduğu enzimatik sınıfta olmayan antioksidanlardan oluşur (Sun vd., 2009).

Malign melanom olan hastalarda uygulanan tedaviler içinde sayılan için cerrahi müdahaleler, radyasyon ile yapılan uygulamalar, kemoterapi ile verilen etken maddeler yada bunların kombinasyonu ile yapılanları sayabiliriz. Yapılan bu tedavilerin genelde pozitif etkileri ile birlikte negatif birçok yan etkiyende sahiptirler. Bu sebeple, tedavi uygulanan gruplar üzerinde en az toksisiteye sebep olabilecek en iyi etkinlikte anti kanser uygulamalarına ihtiyaç bulunmaktadır (Walt vd., 2016; Tan vd., 2006).

Bu tarza da etkinlik için karotenoidler en iyi adayların başında gelmektedirler. Antioksidan olarak kuvvetli bir etkiye sahip olan karotenoidler singlet oksijen etkisizleştirmektedirler. Sigara, çevre kirleticileri maddeler, karsinojenler gibi dış etkenler aracılığıyla oluşabilen peroksil radikali (ROO⁻), süperoksit anyonu (O⁻), singlet oksijen (O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksi radikali (OH⁻) gibi çeşitli reaktif oksijen türleri (ROT) ve serbest radikaller vücutta normal metabolizma sırasında oluşabilmektedir. Bu tarza maddeler oksidatif stres oluştururlar. Oluşan bu stres ile protein, lipit, karbohidrat ve DNA gibi canlılık açısından elzem olan moleküllere zarar verebilmekte aynı zamanda birçok hastalığın oluşmasında da rol oynamaktadırlar (Walt vd., 2016; Tan vd., 2006).

Deinococcus radiodurans, iyonlaştırıcı radyasyona ve oksidatif strese maruz bırakıldığında reaktif oksijen türlerine dirençli olarak bilinen bir bakteridir. Bu canlının antioksidant özelliğini sebebi sentezlenen karotenoidler ile bağlantılıdır (Tian vd., 2010).

Bu bakteriden izole edilen karotenoidler içinde yer alan ve DNA'nın korunması ile onarılmasında da role oynayan deinoksanthin önemli bir antioksidanttır (Ji, 2010). Bu

antioksidant madde, bünyesinde konjüge çift bağ ve hidroksil grubu bulundurmaktadır (Tian vd., 2010; Xu vd., 2007).

Deinococcus radiodurans, patojen olmayan, spor formu meydana getirmeyen, kırmızı pigmentli, iki ya da dört hücreden oluşan kümeler ile meydana gelen bir bakteridir. Hücreler 32°C de oldukça bol miktarda yani zengin bir besi yerinde yani besi ortamında optimum üreme yaparlar. TGY (% 0.1 oranında glukoz , % 0.3 oranında maya özütü ve %0.5 oranında da tripton). *D. radiodurans* reaktif oksijen türlerine (ROT), iyonlaştırıcı ve UV-C radyasyonlar karşı yüksek oranda direnci bulunmaktadır (Zhou vd., 2015; Choi vd., 2014; Krinsky vd., 2005; Cheng vd., 2014).

D. radiodurans gram negatif bakteriler gibi hücre zarı olan gram pozitif bakteridir. *D. radiodurans* peptidoglikan tabakası ince olan, dış membranı bulunan ve yüzey tabakası belirli proteinlerin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmuştur (Farci vd., 2016).

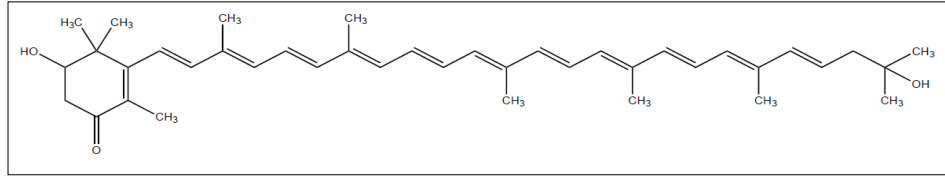
Bu bakterin UV-C'ye karşı hassasiyeti bakterin yüzey tabakasında bulunan DR-2577 proteini ile non kovalent bağlanma yapan deinoksantin ile daha canlılığın en dış yüzeyinde iken başladığı rapor edilmiştir (Farci vd., 2016).

D. radiodurans, eşsiz ve mükemmel bir ketokarotenoid olan deinoksantini üretir (Lemee vd., 1997; Ji 2010).

Deinoksantin karşılatıldığında hem likopen ve β -karoten gibi karotenlerden hem de zeaksantin ve lutein olan ksantofillerden daha fazla oranda antioksidan etkisi olduğu ve bu nedenle de reaktif oksijen temizleme etkinliğinde daha iyidir (Tian vd., 2010; Apel vd., 2004) (Bkz. Şekil 2.4).

Karotenoid grupları içinde olan likopen, lutein, beta karoten ve fukoksantin hayvanlarda ortaya çıkan karsinogenezi etkisi hale getirilmesinde ya da baskılamada etkilidirler aynı zamanda da farklı kanserlerde hücreler üzerinde apoptozu başlatabilirler. Bunlara ilaveten prostat kanseri riski ile karotenoid alımı ters orantılıdır. Yani karotenoidler kanser olma riskini düşürmektedirler (Sun vd., 2009; Tian vd., 2010).

Bunun için bu tarzda bir etken madde ile yani deinoksantin ile canlılarda ortaya çıkan kanser hücrelerine nasıl etki etiklerini incelemek oldukça önemlidir.



Şekil 2.4. Deinoksantin moleküler yapısı (Betlem vd., 2012)

Hücrelerin gelişerek büyümesi ile büyüme soncunda oluşan ölüm arasında oluşan dengesizliğe biz kanser demektediriz. Hücre ölüm oranlarındaki azalmanın nedenlerini sıralayacak olursak anti apoptotik genler üzerinde oluşan fazla ekspresyonlar, apoptoz genlerin baskılanması ya da inhibe olmaları gelmektedir.

Bcl 2 ailesi sınıf da olan Bax proteini, mitokondriyal membran üzerinde meydana getirdikleri hasar ile delikler açarak apoptozla hücre ölümüne sebep olmaktadır (Yang vd., 2000; Lowe vd., 2000). Bunlara ilaveten, *BAX* ve *BCL2* 'de oluşabilecek gen hasarları ile *BCL2* 'ninde müdahil olduğu anti-apoptotik genlerin fazla miktarda ekspresyonları, melanoma, meme ve prostat gibi farklı tipte bir çok kanserlerde ve kanserler de uygulanan tedavilere dirençte bulunmuştur. Araştırmalar sonucunda ortaya çıkan en önemli önerilerde bir tanesi, kanser hücreleri üzerinde onların etkilerini yok etmek için kemoterapötik etken maddeler ile birlikte antioksidan maddelerinde uygulanmasıdır (Yang vd., 2000; Dimitrakakis vd., 2002; Emi vd., 2005).

Çalışmalarda kanser hücreleri üzerinde deinoksantin apoptotik indüksiyonu incelenmiş ve oksitleyici etken maddeler ile apoptotik ve canlılık etkileri, şekil değişimleri ve DNA miktarı ölçümleri yapılmıştır (Ji, 2010; Cheng vd., 2014; Farci vd., 2016).

Bu araştırmalar ile kanser hücrede olan apoptozun oluşumuna engel olan BCL2 genin ekspresyonunu ve bunla birlikte caspase 3 aktive eden etkiyi düşürdüğü, bunlara ilaveten apoptotik gen ekspresyonun karşılığı olan BAX geninin ekspresyonun deinoksantin tarafından artırıldığı bulunmuştur (Ji, 2010).

Önemli bir antioksidan olan deinoksantin aynı zamanda da özel koşullarda da prooksidatif bir etki oluşturmaktadır. Prooksidant, sistem de ya serbest radikal oluşturarak veya da antioksidan sistem üzerinde inhibisyon işlemi yaparak oksidatif strese meydana getiren endobiyotik veya ksenobiyotik olarak tanımlanabilir. Apoptozis oluşumda önemli

mekanizmalarda bir tanesi oksidatif stres olup, yapılan çalışmalarda apoptozisin indüksiyonu sırasında oksidatif mekanizmaların rolünü göz önüne sermiştir. Bu araştırmalarda, deinoxantin prooksidant aktivitesi ile ilişkili olan hücre içi reaktif oksijen yükselmesi ve farklı kanser tiplerinin apoptozisi indüklediği bulunmuştur (Muller vd., 2002; Nara vd., 2005; Choi vd., 2014; Özcan vd., 2015; Rahal vd., 2014).

Araştırmacılar tarafında rapor edilen durumlardan bir tanesinde 15 farklı karotenoid türü farklı tipte olan 3 prostat kanseri (PC-3, DU145 ve LNCaP) üzerinde etkileri incelenmiştir. Yetmiş iki saat boyunca 20µmol/L karotenoid bu kanser tiplerine ait hücreler ile kültüre edilmiştir. Prostat kanser hücre hatları üzerinde fukoksantin ve neoksantin anlamlı bir derecede etki ettiği bulunmuştur. Likopen, Betakaroten ve fitofluende hücre canlılığı üzerinde etkisi olduğu bulunmasına karşın diğer etken maddelerin uygulanan kanser hücre hatları canlılığı üzerine herhangi bir etkileri olmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile ulaşılan en önemli sonuçta birbirinde farklı olan fukoksantin ve neoksantin prostat kanseri hücre hatları üzerinde prooksidatif bir etkiye sebep oldukları ve apoptozisi indüklediği gösterilmiş olup bu ksantin türlerinin anti-karsinojenik etkileri ortaya konulmuştur (Nara vd., 2005).

İnsan hepatoma kanser hücre hattı, kolon kanseri hücreleri ve prostat kanseri hücreleri ile deinoxantin beraber yapılan çalışmalarda, bu ksantin türevinin hücre içi reaktif oksijen türlerini düzeylerini anlamlı şekilde artırdığında bu kanser hücrelerinde apoptozisi aktif hale getirdiği ve bu etken maddenin miktarının artması ile hücre canlılığın ters orantılı olduğu bulunmuştur (Choi vd., 2014).

Farklı kanser tipleri üzerinde uygulanan araştırmalarda bu etken maddenin hücreleri apoptoza sevk ettiği ve bu hücrelerin çoğalmalarını engellendiği bulunmuştur. Kanserli hücreler ile yapılan araştırmalar bizlere deinoxantin kanserli hücrelerde apoptoz başlatıcısı ve kemopreventif bir madde olarak görülebileceğini ortaya koymaktadır. Yapacağımız çalışmada diğer kanser türlerinden farklı olarak yüksek kalitede saflaştırılacak deinoxantin prostat kanseri hücreleri üzerine olan etkileri bulunmaya çalışılacaktır.

Bu araştırma sonucu ortaya çıkacak sonuçlar ile kanser hücreleri ile apoptozu başlatabilen deinoxantin farklı araştırmalarda incelenme ve değerlendirilme potansiyelini

artıracaktır.

2.7. Kombinasyonel İlaç Çalışmaları

Terapötik ajanların bulunmasında veya ortaya çıkarılmasında en önemli amaçları sıralayacak olursak membran reseptörlerinin bulunması ve bulunan reseptörlere ilgisi yoğun olan ligant geliştirmesi ön sırada gelmektedir. Bilimsel araştırmalar sonucunda ortaya çıkan yenilikler ile ilaç geliştirme yöntemleri de gelişmiş ve yenilikler ortaya çıkmıştır. Biyoinformatik biliminin birçok alanı organize ederek beraber çalışılması ile farklı tipte olan çok sayıda hastalığın genetiksel olarak oluşma sebeplerinin incelenmesi ile terapötik hedeflerin bulunması açısından önemli bir basamak olmuştur (Tutun ve Baydan, 2019).

Kanser tedavilerinde birden fazla ilacın kullanılmasına kombinasyon tedavisi denir. Standart terim olan bu tanımlama, bir rahatsızlık veya hastalığın çözümü için uygulanan tedavide birden fazla tedavin uygulanması anlamına gelir ve çoğunlukla bütün uygulanan tedaviler farmasötiktir. 'Farmasötik' kombinasyon tedavisi, farklı ilaçların birlikte uygulanmasıdır.

Tek bir ilaç ile uygulanan tedaviler, kısa dönemli olarak incelendiğinde maliyet açısından uygun olmalarına karşın kombinasyon tedavileri iyi dizayn edildiklerinde önemli avantajlar ortaya çıkar. Avantaj olarak, kombinasyonel uygulamalar tekli uygulamalara göre yan etki oranının az olması, direncin durumun ya olmaması veya daha düşük seviyelerde seyretmesi, yapılan uygulamalarda başarısızlık durumunun az olması verilebilir.

Son yıllarda onkolojik çalışmaların hedefinde kombinasyon olarak uygulanan tedaviler en ön sırayı almıştır. Farklı uygulamalarda denenilen ve tekli terapiye kıyasla bir çok etken maddenin beraber tatbik edildiği kombinasyonel uygulamalar, tekli uygulamalara göre daha güvenilir ve daha etkin oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Bu sebepten dolayı FDA tarafından bu tarzda yapılan tedavileri onaylamıştır (Janku vd., 2014; Musgrove vd., 2011).

Toksik kemoterapi uygulaması çoğunlukla metastatik kanser olan tedavilerde yapılması uygun olmaktadır. Tek uygulamalarda direnç oluşumu çok sık olduğundan birçok

durumda kombinasyonel ilaç uygulaması yapılmaktadır. Bu sebeple, farklı kimyasal formülleri olan ve aynı zamanda da hedefleri de farklı olan ilaçları (çoklu ilaç direnci) eş zamanlı direnç oluşturan mekanizmaların ile tanımlanması, 21 yüzyılda araştırmacıların en önemli hedefleri içinde ön sırada gelmiştir (Szakács vd., 2006).

Kanser hücrelerin etkisi hale getirmede antikanser ilaçları farklı sebeplerden dolayı etkisiz olabilmektedirler. Bu tarzda İlaçlar hastalara genellikle sistematik tatbik edilir, bunun içinde emilmeleri, metabolize olmaları yönünden hastalara özel olabilecek çalışmalar ile farklı uygulamalara tabi tutulurlar. Kanserler bulundukları yer açısından ilaçları rahatlıkla ulaşamayacağı yerlerde olabilirler (Szakács vd., 2006).

Antibiyotik kullanımı ile mikroorganizmalarda oluşan dirence incelenmesine benzer bir şekilde, kanser hücrelerinde ortaya çıkan ilaç dirençleri ile ilgili yapılan çalışmalar, kanser hücresinin sahip olduğu özel doğa ve genetik faktörlerin arka planı ya da toksik kemoterapiyi takip eden genetik değişiklikler nedeniyle hücresel dirence odaklanmıştır (Szakács vd., 2006).

Kanser tedavilerinde çok sayıda ilaç potansiyelleri incelenerek hem hücresel yolları hem de hücre de olan hedef noktaları açısından etkileri bulunmaya çalışılmıştır. Klinik denemelerde, kanserli olan hücreler üzerinde uygulanan yüksek dozaj, yan etkiler ve bir çok ilaç uygulaması ile oluşan direncin sebebi ile yapılan olumlu ilaç çalışmalarının sonuçları negatif etkiler gösterebilmektedirler. Bu neden ile farklı ilaçlar ile yapılan kombinasyon tedavilerinde uygulanan ilaçların dozların azaltılması ve etkinliklerin artırılması açısından incelenmektedir. Birçok çalışmada *in vivo* veya *in vitro* olarak kanser tedavilerinde kullanılma şansı olan tekli ve çoklu ilaç kombinasyonları araştırılmaktadır. Bu tarzda çalışmalarda uygulanan tedavilerin kanser hücrelerine olan etkilikleri görülmüş olsa da, ilave birçok araştırma ve bilgiye de gereksinim vardır. Bu, uygulanan tedavinin uygulandığı yerde olan hücresel yollara nasıl etki ettiği, apoptoza veya otofajiye sebep olup olmadığı gibi basamakları içerir (Al-Attar ve Madihally, 2020).

Çoğu durumda çoklu ilaç direncinin, belirli proteinlerin veya mutant proteinlerin çok sayıda farklı sitotoksik ajanın ortamında canlılığın devam etmesine izin verir ya da mutant proteinlerin oluşmasına sebep olan genetik değişimlerin bir sonucu gibi düşünülmektedir.

Genetik değişimler ile ortaya çıkan sitotoksik ilaç dirençleri, ilaçların alımını ve akışını, hücrelerin apoptoza duyarlılığını, hücre döngüsü dinamiklerini, hücre sel ilaç metabolizmasını, ilaçların hücre içi bölümlenmesini veya ilaca bağlı hasarın onarımını etkileyebilir (Ambudkar vd., 1999).

Araştırmacılar tarafından, terapötik olarak standardize edilmiş kombinasyonları belirleme fırsatı veren 2 veya 3 ilaç ile yapılan kombinasyon denemeleri için yapılan analiz metotları ve tasarımların bulunmasında oldukça büyük kademeler kat edilmiştir (Tan vd., 2003, 2009; Kong ve Lee, 2006; Fang vd., 2008, 2017).

Sağlık hizmetlerin önünde iyileştirme çalışmalarına engel olan en önemli başlıklardan bir tanesinde hastalılarda oluşabilecek çoklu ilaç dirençleridir. Bu tarzda dirençlerde en çok ortaya çıkan kanser kemoterapötikleri, antimalaryaller, herbisitler ve antibiyotiklerinde bulunduğu çok geniş bir skalada farklı özellikleri olan sitotoksik dahil olmak üzere geniş bir yelpazede kimyasal olarak farklı, sitotoksik maddeleri ortama veren aktif taşıyıcılardan meydana gelmektedir (Higgins, 2007).

Sinerjistik ilaç birleşimleri, tek tek olarak kullanılan ilaçların toplam etkilerinden çok daha fazla bir etkiye sahiptirler ve iyileştirilmiş terapötik indeks için potansiyel yaratmaktadır. Farklı tipte olan bazı kanserlerin tedavisinde ilaç kullanımı ile oluşan dirençleri ortadan kaldırmak için kombinasyon tedavi yöntemleri denenmektedir (Korkut vd., 2015; Lee vd., 2012).

Sağlık alanında yapılan son çalışmalarda, farklı ilaçların kombinasyonlarını oluşturularak yapılan uygulamalarda bireysel tümörlerde olan çoklu biyobelirteçler hedeflemiştir (NCI, 2016). Bunların yanı sıra, ticari olarak FDA tarafından 300 civarında kanser ilacı ile binlerce ikili ve milyonlarca da üçlü kombinasyon arasında tercih edilebilmektedir (Culjat, 2017). Bu kadar çok seçenekte onkolojik tedavilerde kombinasyon ile olabilecek tedavilerin önüne büyük bir engel oluşturmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar

Real-time PCR cihazı	:Qiagen Rotor Gene 6flex
PCR cihazı	:Bio-Rad C1000 Touch
ELISA	:Epoch Biotek
Mikroskop	:Nikon Eclipse Ti2-U Inverted
Kabin	:Bil-ser B2 Class II
CO ₂ inkübatörü	:Nüve EC 160
Santrifüj	:Hanil, Smart R17
Şarjlı otomatik pipet	:Isolab
Otomatik pipet	:Eppendorf Research Plus
Vorteks	:Heidolph Reaxtop
Buzdolabı	:Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	:Haer Medical
Kar makinesi	:Scotsman AF-20
Su banyosu	:Mettler
Saf su cihazı	:Nüve
Hassas terazi	:Shimadzu ATX224

3.1.2. Hücre Hattı

PC 3 Prostat Kanseri hattı ATCC'den ticari olarak satın alınarak temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

RPMI 1640 Medium	: Biological Industries
------------------	-------------------------

Fetal Bovine Serum	: Biological Industries
L-Glutamin	: Biological Industries
Penisilin-Streptomisin	: Biological industries
Trypsin-EDTA	: Biological Industries
Cell Proliferation Kit (XTT)	: Biological Industries
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest
RNA izolasyon Kiti	: Axygen Axyprep Total RNA Kit
RT-qPCR Kit	: Qiagen SYBR Green PCR Master Mix
cDNA sentez kiti	: Thermofisher High-Capacity cDNA Kit
Bcl2 ELISA kit	Cusabio
Bax ELISA kit	: Cusabio
Caspase-3 ELISA kit	: Cusabio
Aquaguard-1	: Biological Industries
Aquaguard-2	: Biological Industries
Dosetaksel	Sigma-Aldrich
Lizis tamponu	: 150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH: 7.4, 1 mM PMSF, 0.5% sodium deoksikolat, % 5 gliserol, 1 mM EDTA, % 1 Triton X-100
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich

3.2. Yöntem

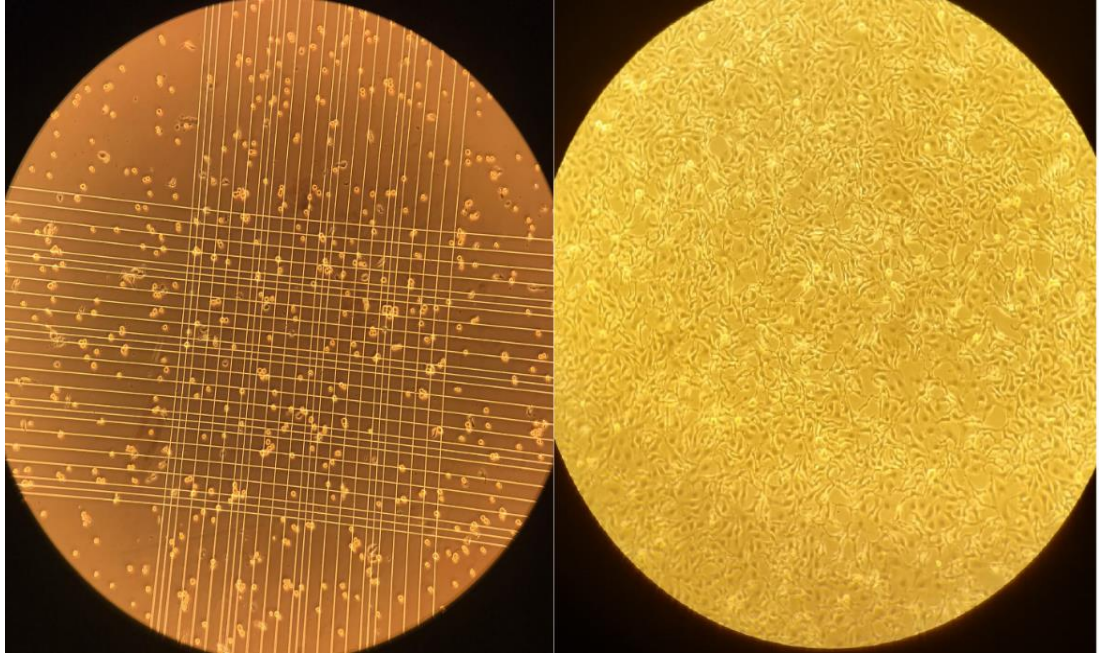
3.2.1. Hücre kültür çalışmaları

3.2.1.1. Hücre kültürü koşullar

PC 3 prostat kanseri hücre hattı; %10 Fetal Bovine Serum, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren RPMI'da kültive edilmiştir. Ortam %5 CO₂ ve 37 °C ayarlanarak, hazırlana örnekler inkübasyona bırakılmıştır (Bkz. Şekil 3.1).

Nem oranı % 95 olacak şekilde karbon dioksit inkübatörü ayarlanmış ve inkübatörün alt ünitesinde, sterilize edilmiş saf su içinde %1 oranında Aquaguard-1 karışımı eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.

Ortamın sterilliği önem arz ettiğinden dolayı her çalışma öncesi ve sonrası laminar kabinin içi kısmı UV ışık ile steril edilmiştir. Bu işleme ilaveten % 70'lik etil alkol ile de ortam temizlenmiştir.



Şekil 3.1. PC 3 prostat kanseri hücre hattına ait inverted mikroskop görüntüleri

3.2.1.2. Hücre kültürünün pasajlanması

İnkübasyona bırakılan örnekler günlük olarak kültür ortamındaki gelişimleri takip edilmiş ve besiyeri değişimleri 2 günde bir yapılmıştır. İnkübasyona bırakılan hücre hatlarının

besiyeri değişimlerinde zara görmemeleri için T-flask yan eğilerek besi yerleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardına da ortam sıcaklığı 37°C olacak şekilde ayarlandıktan sonra, 4-6 mL (75 cm²'lik T-flask için) DPBS eklenir ve yavaş bir şekilde çalkalanmıştır. DPBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI'dan 10 mL eklenerek besiyeri değişimi yapılmıştır.

T-flask yüzeyi % 90 oranını yaklaşık olarak kaplayıncaya kadar yıkma işlemi tekrar edilmiştir. PC 3 hücre hattının 75 cm²'lik bir T-flaskına ait yüzeyi yaklaşık % 90'lık kısmı için doldurma süresi olarak ortalama 7-10 gün arasındadır (Bkz. Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hücrelerin steril ortamda pasajlanması

İnvertte mikroskop ile hücreleri yeterli doluluğa ulaşıp ulaşmadığı kontrol edilmiştir. Hücreler yeterli doluluğa ulaşmış ise pasajlama işlemi için kabin sterilitesi sağlandıktan sonra T-flask içinde olan besiyeri atılarak ölü hücreler DPBS ile yıkanarak T-flask ortamından uzaklaştırılmıştır. 8 mL %0,25 Trypsin-% 0,02 EDTA solüsyonu TC-treated yüzeyinde bulunan hücreleri ayırmak için T-flaska eklenmiştir. Bu işlemin ardına yaklaşık 7 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnvert mikroskopta ile belirtilen süre zarfında

hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol işlemi yapıldıktan sonra ayırma da kontrol edilmiştir.

Tripsinin etkisini yok etmek için, hücrelerin T-flaskın yüzey kısmından ayrılması ile ortamda bulunan tripsin ile oluşan etkiyi nötralize etmek için 32 mL %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI besiyeri eklenilmiştir. Hazırlana kültür, 50 mL'lik steril falkon tüplere alınarak 5 dk süre zarfında 800 xg'de santrifüjlenmiştir. Ardına süpernetant ortamdan uzaklaştırılmıştır. %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI besiyerinden 12 ml alınarak falkon tüp yüzeyinde bulunan pelet, pipet yardımı ile tamamen homojenize oluncaya kadar dikkatli bir şekilde pipetlenmiştir. Hücreler belirlenen yoğunluklarda 75'lik T-flasklara yeniden pasajlanmıştır.

İnoküle yapılan hücrelerin besiyerleri %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI ile 10 mL'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan örnekler karbondioksit inkübatöründe bir önceki işlemde uygulanan benzer koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.3. Hücre kültürünün stoklanması

Pasajlanarak çoğaltılan PC3 hücre hatları, sürekli olarak sıvı azot ile dondurma işlemi yapılarak ortamında korunmuştur.

PC 3 hücrelerinin saklanması için yapılan dondurma basamağı, T-flasklara hücre pasajlamadaki adımları tatbik edilmiştir. Hücreler 5 dk boyunca 800 xg'de santrifüjlenerek pelet kısmı kalacak şekilde üst kısımdaki süpernetant uzaklaştırılmıştır. Stok işlemi aseptik koşullarda, cryo tüplerinin her birine 900 µl FBS üzerine 100 µl DMSO karışımı gelecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım santrifüj edilen pelet üzerine eklenmiştir. Homojenizasyon işleminin ardından cryo tüplere aktarılan hücreler dikkatli sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

3.2.1.4. Dondurulan hücrelerin çözündürülmesi

Çalışmalarımız kapsamında gerekli olması durumunda stoklanan hücreleri yeniden çözülme işlemlerinden geçirilerek kullanılmıştır. 37 °C sıcaklığa ayarlana su banyosu kullanılarak dondurulan hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Aseptik koşullar altında 30 mL RPMI

besiyeri konan falkon tüpüne hücreler aktarılmıştır. DMSO'nun oluşturduğu toksik etki bu şekilde nötralize edilmiştir. Bu basamaktan sonra hücreler 800 xg'de 5 dk santrifüj yapılarak hücrelerin üst kısmında bulunan süpernetant alınmıştır. Hücre peletine 10 mL %1 penisilin-streptomisin, %10 Fetal Bovine Serum ve %1 L-glutamin içeren RPMI ilave edilerek pipetajlamanın sonrasında 75'lik T-flaska aktarılmıştır. Açıklandığı şekilde yapılan başmakların ardına hücre kültürleri karbondioksit inkübatörüne koşulları sabit şekilde bırakılmıştır.

3.2.1.5. Hücre sayımı

Inverted mikroskop ile yapılan kontrollerde ön görülen hücre popülasyonunun belirlenmesinin ardından ortamda bulunan besiyeri uzaklaştırılıp, DPBS' de 4 ml eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. 8 mL % 0,25 Trypsin-% 0,02 EDTA solüsyonu TC-treated yüzeyinde bulunan hücreleri ayırmak için ortama eklenmiştir. RPMI besiyeri yüzeyden ayrılmış olan hücreler üzerine eklemiştir. Bu işlemin ardına falkon tüpe alınan hücreler 5 dk, 800 xg'de santrifüj edilmiştir. Falkon tüp yüzeyinde oluşan pelet korunarak süpernetant ortamda alınır ve RPMI besiyerinden 5 mL ilave edilerek hücrelerin homojenizasyonu yapılmıştır. İnverde mikroskopda, homojenize edilen kültürden 10 µl alınarak thoma lamına yayılarak hücre sayımı yapılmıştır.

3.2.2. Sitotoksosite çalışmaları

3.2.2.1. Sitotoksosite çalışmasında kullanılacak kimyasalların hazırlanması

10 mg dosetaksel tartılır ve sterilize edilmiş olan eppendorf tüpüne aktarılmıştır. 700 µL DMSO maddenin ilave edildiği eppendorf tüpüne eklenerek çözünme işlemi yapılmıştır. Bu işlemin ardında aseptik koşullarda RPMI besiyerinden 2 ml ilave edilerek etken maddenin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti -20°C'de saklanmıştır. Ayrıca ışıktan da korunmuştur.

Çalışma süresinde kullanılacak olan Deinoksantin, Marmara Üniversitesi ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi ortaklığında yapılmış olan Seda KILINÇ'ın yüksek lisans tez çalışmalarında üretilerek saflaştırılmış ve stoğundan temin edilmiştir. 20 mg Deinoksantin tartılır ve sterilize edilmiş olan eppendorf tüpüne aktarılmıştır. 1400 µL

DMSO maddenin ilave edildiği ependorf tüpüne eklenerek çözünme işlemi yapılır ve bu işlemin ardında aseptik koşullarda RPMI besiyerinde 2000 µL ilave edilerek etken maddenin 200 µM stok çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan stok çözelti -20°C’de ve ışıktan korunarak saklanmıştır.

3.2.2.2. Hücre canlılık testi

Hücre ekimi 96 kuyucuklu TC-treated platelerin her bir kuyucuğuna 200 µl %1 penisilin-streptomisin, %10 Fetal Bovine Serum ve %1 L-glutamin içeren RPMI içerisinde hücre konsantrasyonu 5×10^4 sağlayacak şekilde inokülasyon yapılarak 24 saat 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 95 nem oranında inkübasyona bırakılmıştır. Zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerini belirlemek için deinoksantin ve dosetaksel’in birleşik ve ayrı ayrı olmak üzere konsantrasyonlarının belirlenmesi çalışması yapılmıştır.

24 saat inkübasyon sonrasında platelerdeki besiyeri aseptik koşullarda ortamdan uzaklaştırılmıştır. Dosetaksel, deinoksantin ve kombinasyonları azalan konsantrasyonlarda uygulanarak gruplandırılmıştır. Her bir grup için 24 ve 48 saatlik ilaç konsantrasyonları uygulanmıştır. Her deneme 4 tekrarlı olarak yapılmış olup kontrol grubu 12 tekrarlı gerçekleştirilmiştir (Bkz. Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları

Madde	Dosetaksel (µM)	Deinoksantin (µM)	Do (µM)+De (µM)
	400	400	400+400
	200	200	200+200
	100	100	100+100
Konsantrasyonlar	50	50	50+50
	25	25	25+25
	12,5	12,5	12,5+12,5
	6,25	6,25	6,25+6,25

Belirlenen süreler sonunda protokole uygun olacak şekilde XTT uygulaması yapılarak CompuSyn programı yardımıyla CI (Combinational Index) değerleri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 3.3).

Kombinasyon indeksi değerleri (CI)	Hücreye Etkisi
CI = 1,1 – 1,2	Hafif Antagonistik etki
CI = 1,2 – 1,45	Orta Antagonistik etki
CI = 1,45 – 3,3	Antagonistik etki
CI = 3,3 - 10	Güçlü Antagonistik etki
CI > 10	Çok güçlü Antagonistik etki
CI = 0,9 – 1,1	Aditif etki
CI = 0,85 – 0,9	Hafif sinerjik etki
CI = 0,7 – 0,85	Orta sinerjik etki
CI = 0,3 – 0,7	sinerjik etki
CI = 0,1- 0,3	Güçlü sinerjik etki
CI < 0,1	Çok güçlü sinerjik etki

Şekil 3.3. Kombinasyon indeksi değerlendirmesi

3.2.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

4 mL % 0,25 Tripsin-% 0,02 EDTA karışımı ilave edilir ve hücrelerin oldukları TC treated yüzeyinden ayırması yapılmıştır. Aseptik koşullarda tüp içine alınan hücreler ve 4°C sıcaklıkta DPBS ile 3 defa yıkma ile temizleme yapılmıştır. Her yıkamanın ardına 5 dk 800 xg’de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Son santrifüjden sonra pelet ortamda bırakılarak, üst kısmına RNA kompozisyonunun sabit kalması için RNAlater Reagent (Thermo Fisher) çözeltisi uygulanarak homojenizasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu oda sıcaklığı şartlarında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Bu işlemten sonra 5 dk 800 xg’de santrifüjlenir ve hücreler spernetant kısmı uzaklaştırılarak Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen®) protokolü tatbik edilerek total RNA saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Hücrelerin membaların parçalanması ve RNA saflaştırma işlemleri aşağıda verildiği gibi yapılmıştır,

- Hücrelerin üst kısmına 200 µL R1 tamponu ilave edilmiştir.
- 8-10 defa 21 Gauge’luk steril şırınga ile pipetaj işlemi gibi işlem yapılmıştır,
- Hazırlanan karışıma 75 µL R2 tamponu ilave edilir, 20 saniye vorteksenerek, 12000 xg’de, 24 °C’de 5 dk santrifüj yapılmıştır,

- Süpernetant 1,5 mL'lik RNaz-DNaz'dan temizlenmiş yeni steril mikrotüplere transfer edilmiştir. Ardında 125 µL izopropanol ilave edilerek 5 saniye vortekslenmiştir.
- Spin kolonu 2 ml'lik mikrotüpe takılarak örnek kolona aktarılmıştır.
- 6000 xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Alt kısımdaki sıvı (filtrat) atılarak spin kolonu tekrar mikrotüpe yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µL Buffer W1A eklenerek 12000 xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Filtrat atılarak mikrotüpe tekrar yerleştirildikten sonra 700 µL Buffer W2 eklendi ve 12000 xg'de 4 °C'de 1dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrar edilmiştir.
- Filtrat atılarak tüpe tekrar yerleştirilip, yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak için boş halde 12000 xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon 1,5 ml'lik RNaz-DNaz'dan arındırılmış steril yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- Kolona Buffer TE'den 100 µL eklenerek 24 °C'de 1 dk inkübe edilmiştir.
- 12000 xg'de 1 dk santrifüj edilerek alt kısımda toplanan saflaştırılmış RNA saflık-konsantrasyon tayini yapılmasının ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

RNA saflaştırma işleminin ardından cDNA sentez kit protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirilerek cDNA'lar RT-qPCR çalışmasında kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.4. RNA ve cDNA konsantrasyonu ve saflığının tespiti

BIOTEK marka ELISA cihazı ile elde edilen RNA ve DNA'ların saflıkları ve konsantrasyon belirlemede kullanılmıştır.

Absorbans ölçümü bütün numuneler için köre karşı 320 nm, 280 nm ve 260 nm'de belirlenmiştir.

RNA miktarı (ng/µl) = (OD₂₆₀) x seyreltme faktörü x 40 DNA miktarı (ng/µl) = (OD₂₆₀) x seyreltme faktörü x 50

Protein değerleri 280 nm'deki absorbans değeri ile, RNA'lar için 260 nm'deki absorbans değeri ve partikül varlığından dolayı olduğu bilgisine de 320 nm'de absorbans değeri ile ulaşılmıştır.

DNA ve RNA'nın saflıkları aşağıda yazılan değerler yardımı ile yapılmıştır.

RNA; $OD_{260}/OD_{280} \geq 2.0$ DNA; $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$

3.2.5. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesi

PC 3 Hücre hattına ait *BAX*, *BCL2* ve *Caspase-3* genlerinin ekspresyon düzeyleri en düşük CI değerinde yapılmıştır. Bu çalışmada ACTB (beta- aktin) geni referans olarak kullanılmıştır.

24. saat inkübasyonu süresi içinde 6,25 μ M dosetaksel ve 6,25 μ M deinoksantin kombinasyonları sonucunda elde edilen veriler ile hesaplanan CI değerlerinde en iyi agonistik etkinin olduğu bulunmuştur. Bu parametreler uygulanan PC 3 prostat kanseri hücre hattı kùltive edilerek RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Deney setinde 4 farklı grubun her biri 4 defa tekrarlı, aseptik koşullarda TC-treated petrilere 2×10^6 tane hücre olacak şekilde inokùlasyon yapılmıştır. Daha önce belirtilen inkübasyon şartlarında hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından belirlenen konsantrasyonlardaki ilaçlar ayrı ayrı ve kombinasyon şekilde uygulanarak tekrar 24 saat daha önce belirtilmiş koşullarda inkübe edilmiştir.

Tablo 3.2. RNA saflaştırma için deney seti kodları

Petri Kodu	Dosetaksel	Deinoksantin
Kontrol	-	-
2	6,25 μ M	-
3	-	6,25 μ M
4	6,25 μ M	6,25 μ M

En düşük CI değeri bulunan, 24. saat inkübasyonu, 6,25 μ M Dosetaksel ve 6,25 μ M deinoksantin kombinasyonunda PC 3 hücre hattından saflaştırılmış RNA'dan sentezlenmiş cDNA'lar kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.2).

NCBI Primer-BLAST programından faydalanarak tasarlanan primerler, Metabion şirketine Tablo 3.3' de belirtilen sekanslara göre sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.3. Analizi yapılan genlere ait Primer sekansları

Gen	Primer dizisi
<i>BAX</i>	F: 5-AGCAGATCATGAAGACAGGG R: 5-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA
<i>BCL2</i>	F: 5-TATCTGGGCCACAAGTGAAG R: 5-ATTCGACGTTTTGCCTGAAG
<i>Caspase-3</i>	F: 5-GCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT R: 5-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT
<i>ACTB</i>	F: 5-CACCATGGATGATGATATCGC R: 5-GAATCCTTCTGACCCATGCC

Tablo 3.4’ de ki sıcaklık döngüsü protokolüne göre Qiagen SYBR Green Master Mix kiti kullanılarak RT-qPCR işlemi yapılmıştır.

Tablo 3.4. RT-qPCR deneysel çalışmasında uygulanan sıcaklık döngüsü

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Bağlanma	57 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	45 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

3.2.6. Protein ekstraksiyonu

PC 3 hücre hattında, BAX, BCL2 ve Caspase-3 proteinlerinin miktarları çalışma sonucunda elde edilen en düşük CI değerine göre yapılmıştır. Deney setinde tasarımı için 4 farklı grup yapılmış ve her grup için dört kez tekrarlı, aseptik koşullarda TC-treated petrilere 2×10^6 tane hücre olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. 24 saat, daha önce belirtilen inkübasyon şartlarında hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından belirlenen konsantrasyonlardaki ilaçlar ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanarak tekrar daha önce belirtilen koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir (Bkz. Tablo 3.5).

Tablo 3 5. Protein ekstraksiyonu için deney seti kodları.

Petri Kodu	Dosetaksel	Deinoksantin
Kontrol	-	-
2	6,25µM	-
3	-	6,25µM
4	6,25µM	6,25µM

İlaç uygulaması yapılan petrillerdeki besiyerleri 24 saatlik süre bitiminde ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardına 4 °C’de DPBS petrilere bulunan hücreler üzerine üç kez uygulanarak, yıkama işlemi yapıldıktan sonra petrilere 4 mL lizis tamponu (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH: 7.4, 1 mM PMSF, 0.5% sodium deoksikolat, % 5 gliserol, 1 mM EDTA, % 1 Triton X-100) ilave edilip, buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Çalışma petri yüzeyinde hücreleri kazıyıcı ile yüzeyden ayırdıktan sonra aseptik koşullarda falkon tüpe transfer edilmiştir. Falkon tüp içerisinde bulunan hücreler buz üzerinde 8-10 defa 21 Gauge’luk steril şırınga ile çek-bırak yapılarak lizis işlemi tamamlanmıştır. Santrifüj +4 °C ye ayarlanır ve hücreler 10 dk süre boyunca 2000 xg’de santrifüjlenir ve falkon tüp üzerinde süpernetant kısmı farklı steril eppendorf tüplerine konarak ve -80 °C’de stoklanmıştır.

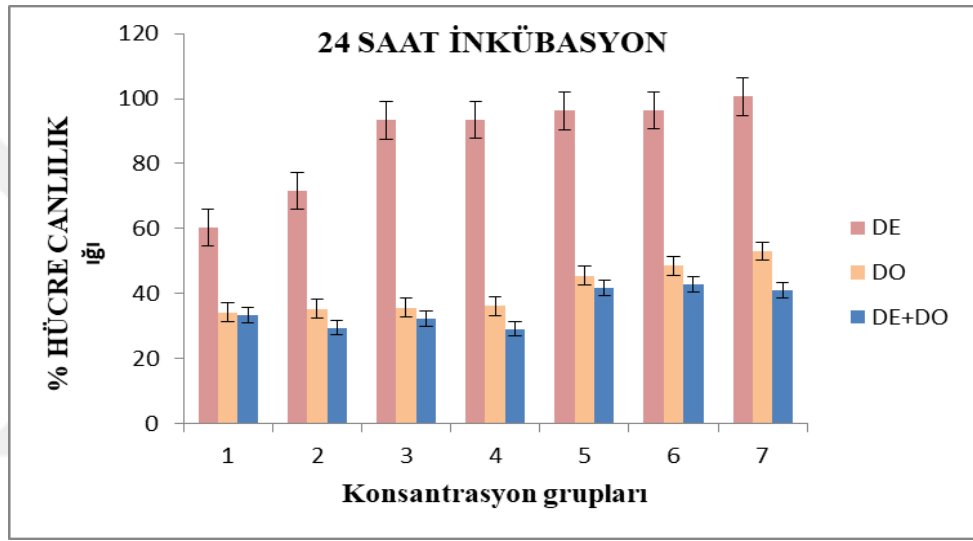
3.2.7. İstatistiksel hesaplamalar

Gen ifade düzeyleri birincil normalizasyon $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi geliştiren Livak ve Schmittgen’e göre analiz edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). İkincil normalizasyon *ACTB*, referans geni olarak kullanılarak *BAX*, *BCL2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır. İstatistiksel analiz SPSS 17.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçların anlamlılık yüzdesi $p < 0.05$ dir.

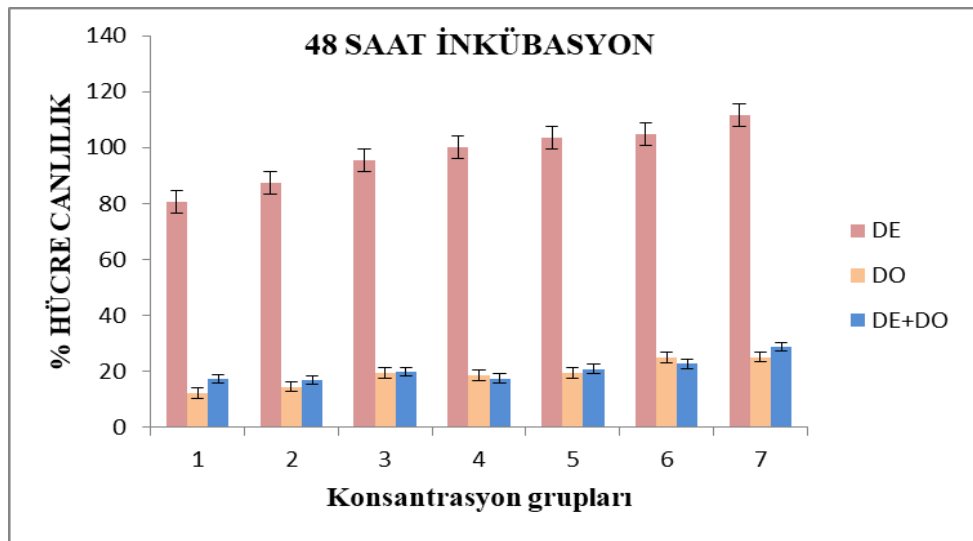
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Testi

PC 3 hücreleri üzerine dosetaksel/deinoksantin iki bileşenin kombinasyonları ve tek tek belirlenen konsantrasyonlarda uygulanmıştır, 24 ile 48 saatlik inkübasyon sürelerinde XTT çalışması yapılmıştır. Hücre canlılık yüzdeleri 450 nm’de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmış ve elde edilen sonuçlara göre Şekil 4.1 – Şekil 4.2’deki grafikler çizilmiştir.



Şekil 4.1. 24 saat inkübasyon süresinde PC-3 hücre hattı üzerine deinoksantin (DE), dosetaksel (DO) ve DE+DO nun antiproliferatif aktivitesi.



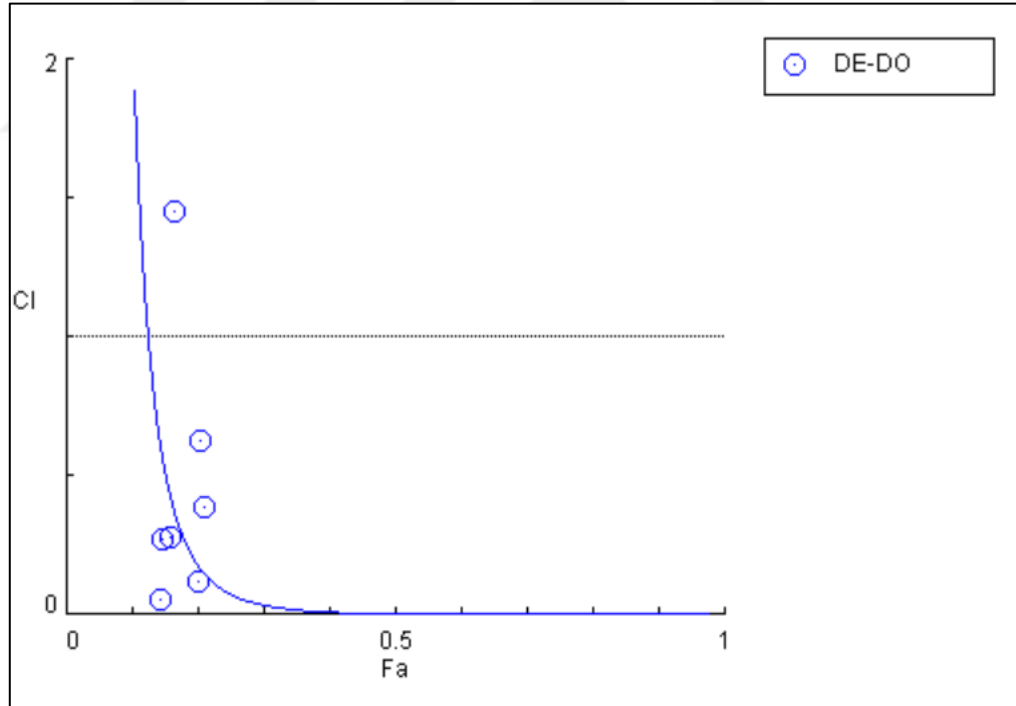
Şekil 4.2. 48 saat inkübasyon süresinde PC-3 hücre hattı üzerine deinoksantin (DE), dosetaksel (DO) ve DE+DO nun antiproliferatif aktivitesi.

4.2. Kombinasyonel Etki Değeri

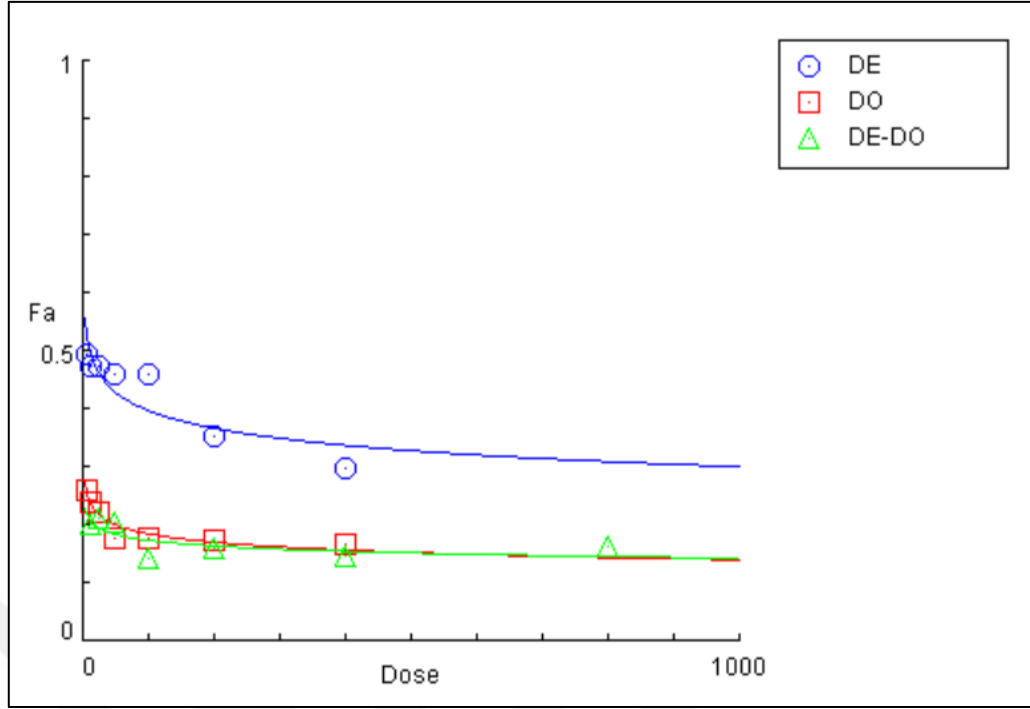
PC 3 hücre hattı üzerine uygulanan dosetaksiel, deinoksantin ile bu iki maddenin birleşimlerinin 24. ve 48. saatler de elde edilen absorbans verilerinden faydalanılarak CompuSyn programı ile kombinasyon etki değeri (CI) bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.1, Tablo 4.2). Elde edilen sonuçlara göre Şekil 4.3 – Şekil 4.8’deki grafikler çizilmiştir.

Tablo 4.1. 24 Saat inkübasyon süresinde deinoksantin (DE) ve Dosetaksiel (DO) kombinasyonlarının CI değerleri

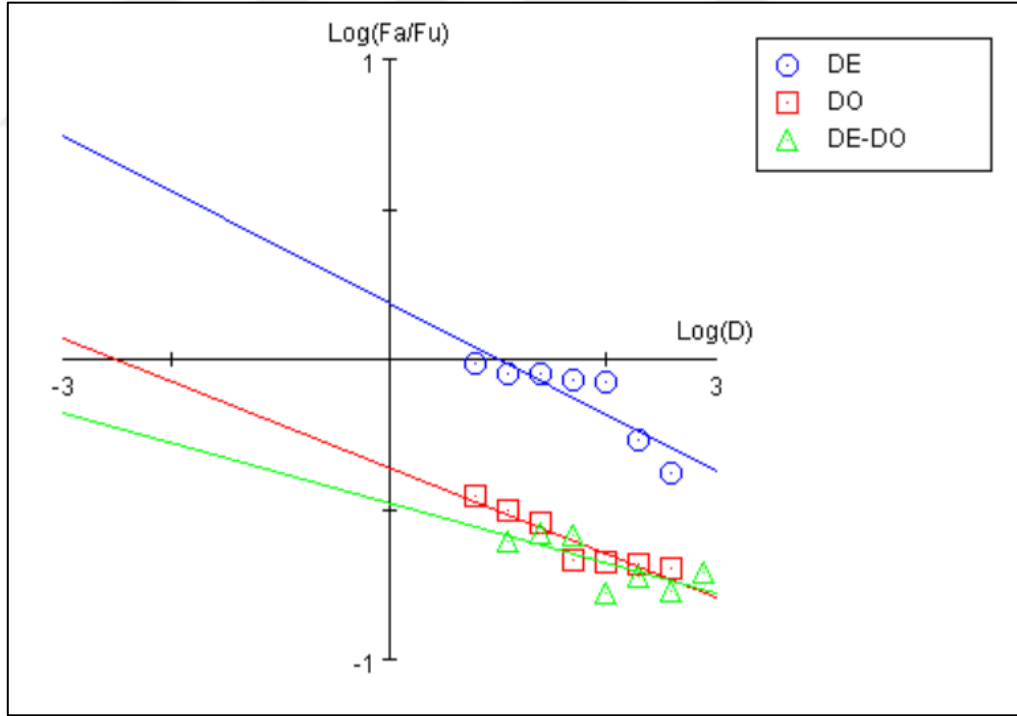
DE+DO Konsantrasyo($\mu\text{M}+\mu\text{M}$)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
400+400	1,452	Antagonistik etki
200+200	0,273	Sinerjik etki
100+100	0,276	Sinerjik etki
50+50	0,057	Sinerjik etki
25+25	0,629	Sinerjik etki
12,5+12,5	0,389	Sinerjik etki
6,25+6,25	0,121	Sinerjik etki



Şekil 4.3. Deinoksantin (DE) ve Dosetaksiel (DO) kombinasyonlarının CI değerleri



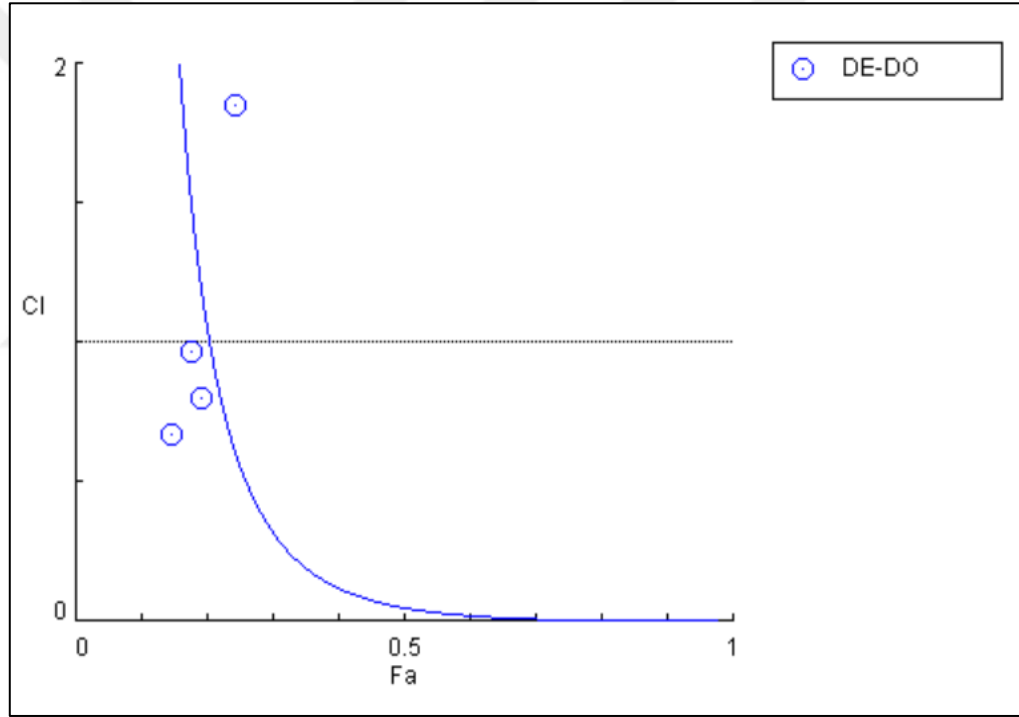
Şekil.4.4 Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) kombinasyonlarının, 24 saatlik inkübasyon süresinde Doz-Effect eğrisi.



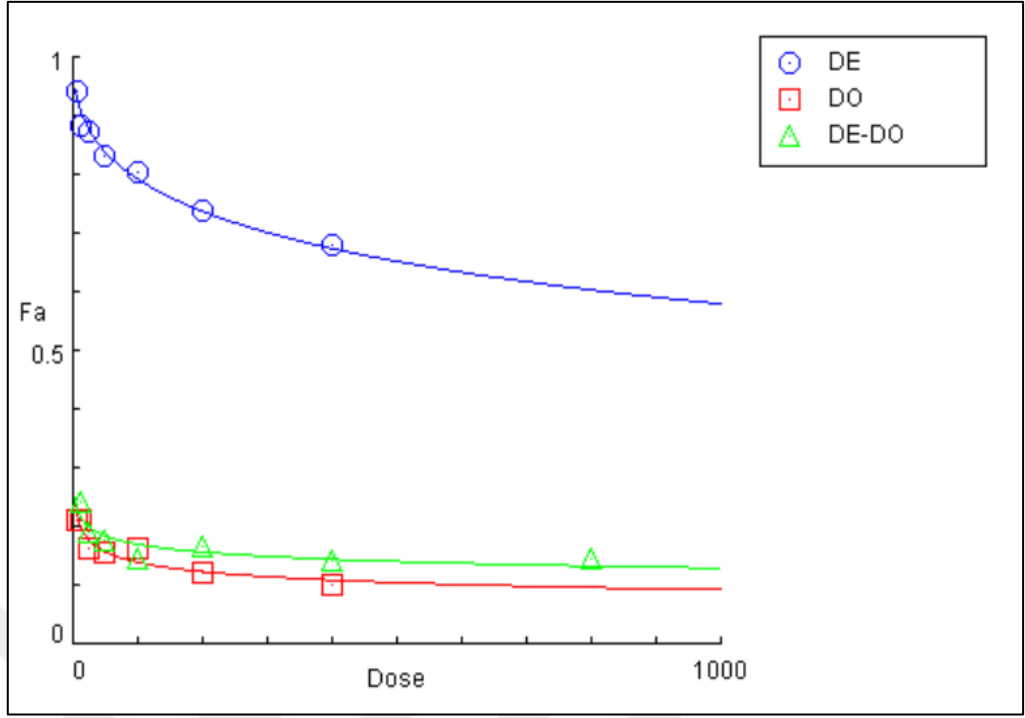
Şekil.4.5. 24 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) kombinasyonlarının Median-Effect grafiği.

Tablo.4.2. 48 Saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) bileşimlerinin CI değerleri

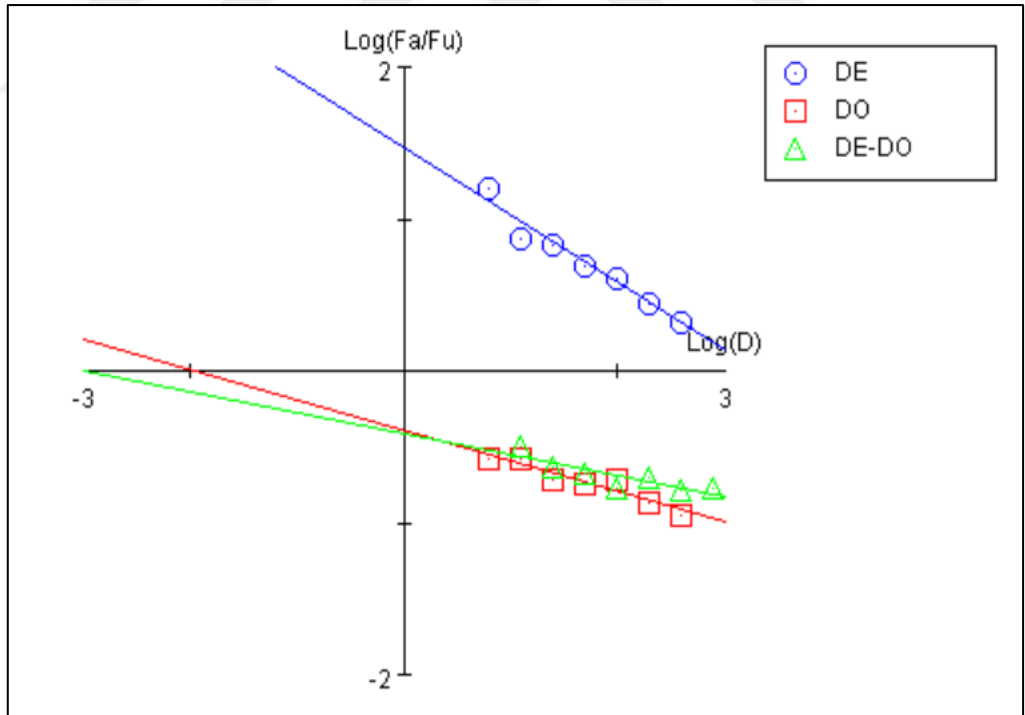
DE+DO Konsantrasyo($\mu\text{M}+\mu\text{M}$)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
400+400	4,891	Antagonistik etki
200+200	2,165	Antagonistik etki
100+100	2,82	Antagonistik etki
50+50	0,667	Sinerjik etki
25+25	0,967	Aditif etki
12,5+12,5	0,798	Sinerjik etki
6,25+6,25	1,85	Antagonistik etki



Şekil.4.6. 48 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) kombinasyonlarının İndeksi grafiği.



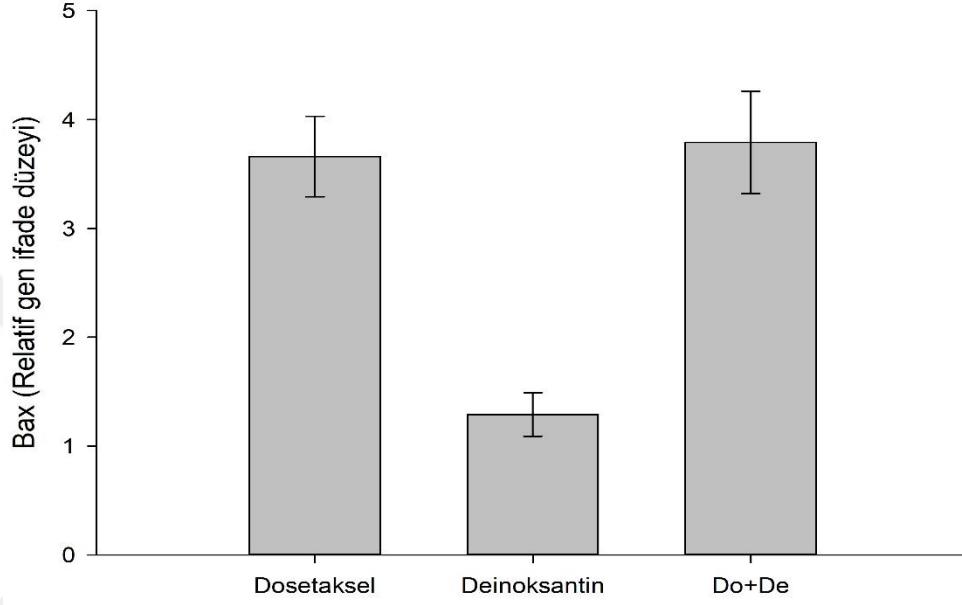
Şekil.4.7. 48 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) kombinasyonlarının Doz-Effect eğrisi.



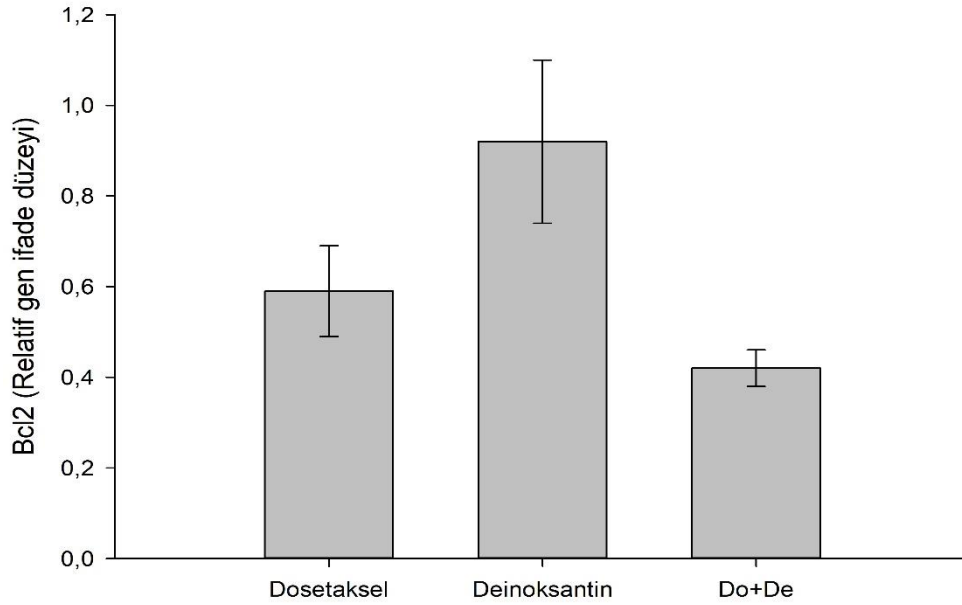
Şekil.4.8. 24 saat inkübasyon süresinde Deinoksantin (DE) ve Dosetaksel (DO) kombinasyonlarının Median-Effect grafiği.

4.3. Gen İfade Düzeyleri

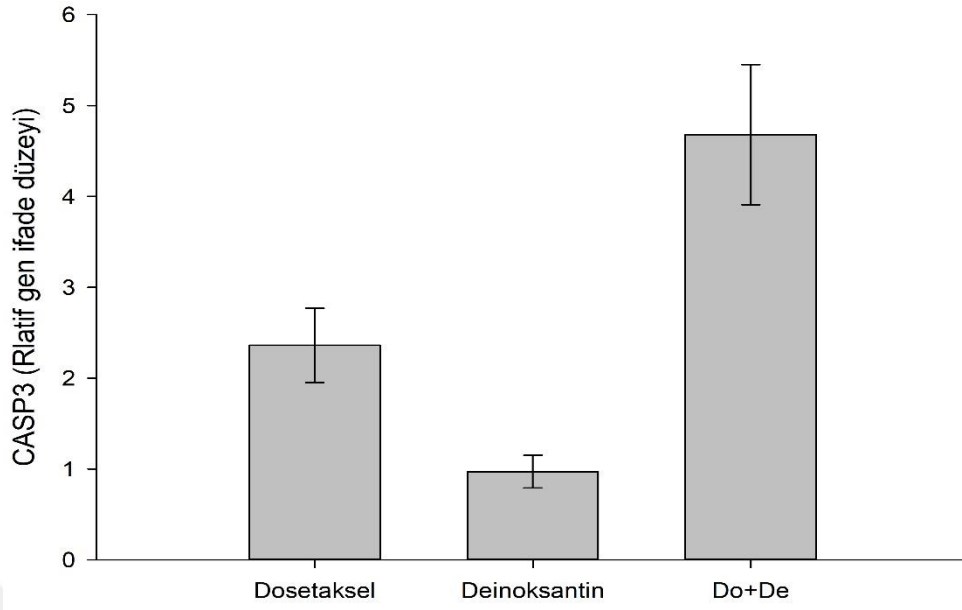
Çalışmada en düşük CI değerinde PC 3 hücre hattının *BAX*, *BCL2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Referans geni olarak *ACTB* (beta- aktin) geni kullanılmıştır (Bkz. Tablo 4.3). Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verildiği şekildedir.



Şekil 4.9. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının *BAX* geni ifade düzeyine etkisi



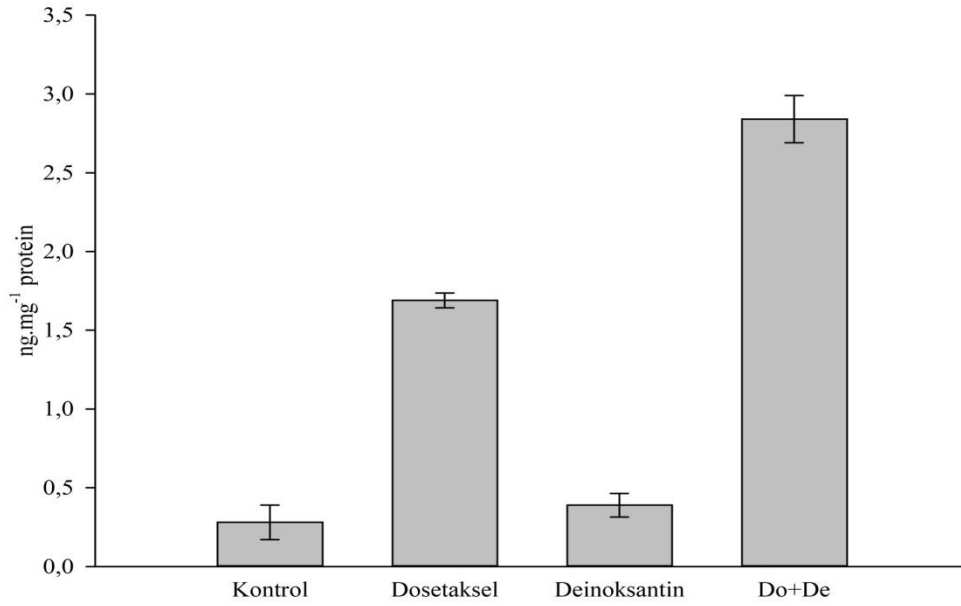
Şekil 4.10. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının *BCL2* geni ifade düzeyine etkisi



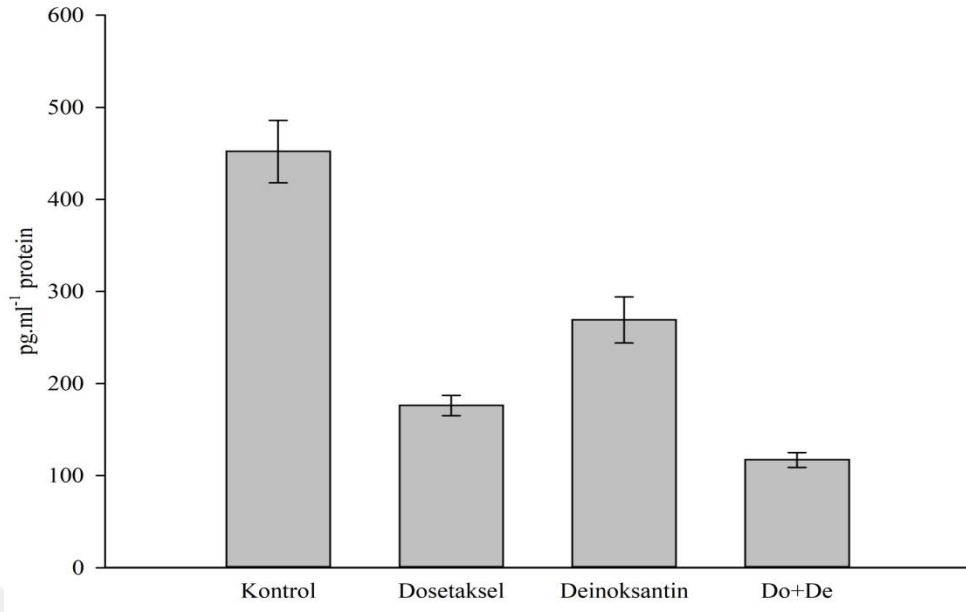
Şekil 4.11. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının *Caspase-3* geni ifade düzeyine etkisi

4.4. Protein Seviyeleri

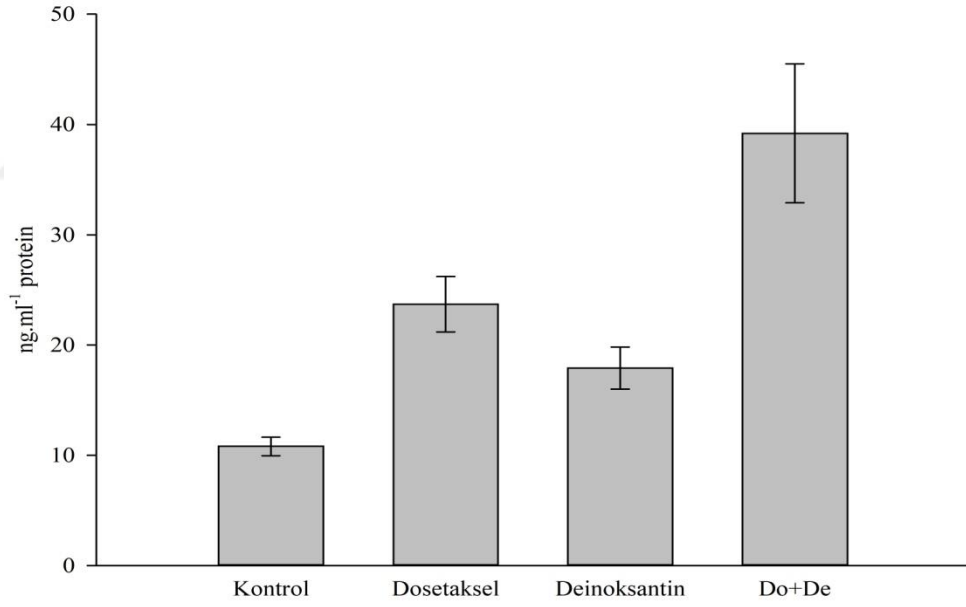
Çalışmada en düşük CI değerinde PC 3 hücre hattının BAX, Bcl2 Caspase-3 protein miktar düzeylerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de verildiği şekildedir.



Şekil 4.12. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının BAX proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.13. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının BCL-2 proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.14. Deinoksantin (DE), Dosetaksel (DO) ve kombinasyonlarının Caspase-3 proteini miktarı üzerine etkisi

Tablo 4.3. BAX, BCL2 ve Caspase-3 protein seviyeleri

	BAX (ng/mg protein)	BCL2 (pg/mg protein)	CASP-3 (ng/mg protein)
Kontrol	0,28±0,11	452±34	10,8±0,84
Dosetaksel (6,25µM)	1,69±0,047	176±11	23,7±2,52
Deinoksantin (6,25 µM)	0,39±0,075	269±25	17,9±1,9
Dosetaksel +Deinoksantin (6,25µM+ 6,25µM)	2,84±0,15	117±8	39,2±6,3

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

İlerleyen yaşlarda daha sık olarak rastlanan prostat hastalıkları, esas olarak iyi huylu prostat hiperplazisi ve prostat kanserini olarak sınıflandırılabilir. İyi huylu prostat hiperplazisi, büyük ölçüde geçiş bölgesinde, yani prostatik dokunun üretrayı çevreleyen kısmında meydana gelen hücresel proliferasyona bağlı olarak artmış prostat hacmi olarak tanımlanır. İyi huylu prostat hiperplazisi, prostat üretrasını tıkayabilen yaşa bağlı bir hastalıktır. Onun prevalans 40 yaşındaki erkeklerde %5 ile %10 arasında değişirken, 70-80 yaşlarındaki erkeklerde %80'e ulaşmaktadır. Prostat kanseri, gelişmiş ülkelerde onkolojik nedenlere bağlı ölümlerde ikinci sırada gelmektedir. Etnik köken de Prostat kanserinin epidemiyolojisini etkilese de, artan yaş bu malign tümörün gelişimi için yaygın olarak kabul edilen bir risk faktörüdür. Buna göre yaşlanan erkeklerde daha sık teşhis edilirken 45 yaşından önce oldukça nadirdir (Cannarella vd., 2021).

Dosetaksel, prostat kanserinde yaygın olarak kullanılan bir antineoplastik ajandır. Apoptoz inhibisyonun da içinde olduğu çoklu moleküler mekanizmalar bu kemorezistansa katkıda bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda dosetaksel ile yapılan uzun tedavilerde, tedavisi yapılan hastalık süreci içerisinde dosetaksel karşı direnç geliştiği rapor edilmiştir. PC3 hücrelerinde, dosetaksel, 10 ila 100 nM arasında doza bağlı bir toksisiteyi indüklediği araştırmacılar tarafında bulunmuştur (Cristofani vd., 2018).

Lijun ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Dosetaksel 'in etkinliğini arttırmak için dosetakseli, SATB1 (ZD55-SATB1) taşıyan onkolitik adenovirüs ile birleştirerek, dosetaksel'in dozunu azaltarak yan etkilerini azalttıklarını rapor etmişlerdir. Lijun ve arkadaşları; In vitro olarak ZD55-SATB1 ve dosetaksel'i prostat kanseri üzerine kombine olarak tedavi amaçlı uygulamışlardır. Bu uygulamada, prostat kanseri hücrelerinin canlılığı, istilası ve göçü üzerinde kayda değer bir etkiye sahip olmalarının yanında, normal prostat hücrelerinin canlılığı üzerinde önemli bir etkilerinin olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. İlave olarak, kombine tedavi, prostat kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklemeye en yüksek etkinliğe sahip olduğunu bulmuşlardır (Lijun vd., 2021).

Yeşil çay, kuarçetin ve dosetaksel kombinasyonu kastrasyona dirençli prostat kanseri hücreleri üzerinde denenmiştir. Bu kombinasyonel uygulanmanın dosetakselin terapötik etkisi önemli ölçüde arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Üçlü olarak uygulanan tedavide en

etkin sonuç bulunmuştur. Dosetaksel ile kombinasyon halinde yeşil çay ve kuarçetin'in, tek tek uygulamalara bileşiklere kıyasla normal prostat epitelyal PrEC hücrelerinde toksisiteyi artırmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, dosetaksel'in etkinliğini arttırmak için yeşil çay ve kuarçetin ile kombinasyon ile toksititesi daha düşük bir tedavi olabileceğini (Wang, vd., 2014).

Huang ve arkadaşların yaptığı çalışmada, brefeldin A ve dosetaksel'in birlikte uygulanmasında hem tek tabakalı ve hem de 3 boyutlu kültürlerde prostat kanseri hücrelerinin büyümesini engellediğini göstermişlerdir. Dosetaksel ve brefeldin A kombinasyonları, prostat kanseri hücreleri üzerine bu etken maddelerin tek tek uygulanmasından daha güçlü bir şekilde apoptozu indüklemiş olduğunu raporlamışlardır. Dosetaksel ile kombinasyon halinde brefeldin A'nın etkileri, PC-3 hücrelerinde Bcl-2 seviyesinde belirgin bir düşüş ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar, brefeldin A ile kombinasyon halinde dosetakselin, prostat kanserinde dosetaksel kemoterapisinin etkinliğini arttırmak ve toksik yan etkisini azaltmak için etkili bir yaklaşımı temsil edebileceğini vurgusunu yapmışlardır (Huang, vd.,2017).

Çalışmamızda PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde tek başına uygulanan dosetakselin *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeyinde çok yüksek bir etkiye sahip olmadığı fakat deinoxantin ile beraber verildiğinde *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir.

PC3 prostat kanseri hattı üzerinde yürütülen çalışmamızda deinoxantin tek başına kullanıldığında *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeyini çok yüksek oranda uyarmadığı, *BCL-2* üzerinde ise tek başına çok az etki ettiği görülmüştür. Tek başına intrinsek apoptotik bir uyarıcı olarak yüksek etkiye sahip olmadığı düşünülmektedir.

Yürütülen tez çalışması kapsamında PC3 hücre hattı üzerine 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde; Dosetakselin, deinoxantin ve her ikisinin kombinasyonlarının belirlenen konsantrasyonlarda uygulanması ile yapılan XTT çalışmasının sonuçlarına göre; 24. saatin 4, 6, ve 7. konsantrasyonları dışında dosetakselin deinoxantinden daha fazla anti-kanser etkiye sahip olduğu, bütün konsantrasyonlarda ise beraber uyguladıklarında ayrı ayrı uygulanmalarından daha iyi anti-kanser etki gösterdikleri belirlenmiştir. 48. saatte ise 24. saate kıyasla dosetakselin, deinoxantin veya her ikisinin daha uzun zaman zarfı

içerisinde bulunduklarında yarı ömürlerini yitirdikleri veya moleküler yapılarının bozulması gibi ihtimallerden kaynaklanan sebeplerden canlılık oranlarında dalgalanmalar görüldüğü gözlemlenmiştir.

Sinerjik etkinin en yüksek olduğu konsantrasyonu ve zamanı bulmak için hesaplanan CI değerlerini belirleme aşamasında; 24. saat inkübasyonunda diğer kombinasyonlara kıyasla en iyi sinerjik etkinin 6,25 μ M dosetaksel + 6,25 μ M deinoksantin kombinasyonunun etkili olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.1.). 0,121 CI değeri ile RT-qPCR ve ELISA çalışmaları yapılmıştır.

6,25 μ M dosetaksel + 6,25 μ M deinoksantin kombinasyonunun uygulandığı bütün örneklerdeki RT-qPCR sonuçlarına göre; *BAX* ve *CASP-3* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesinde, ilaçların ayrı ayrı uygulanmasına göre kombinasyon şeklinde uygulanması çok daha iyi sonuçların elde edildiği gözlemlenmiştir. *BCL2* genlerinin ifade düzeylerini belirlemede ise uygulanan ilaçların kombinasyonunun, tek tek ilaç uygulamasından daha etkin olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Gen ifade analizleri sonuçlarına ek olarak yapılan ELISA çalışmaları da RT-qPCR sonuçlarını destekleyecek şekilde olmuştur. *BAX* ve Caspase-3 protein seviyelerinde 6,25 μ M dosetaksel + 6,25 μ M deinoksantin kombinasyonu, *BAX* proteininde; kontrole göre 2,84 kat ve ayrı ayrı ilaç uygulamalarına göre sırasıyla 1,69;0,39 kat daha artmış; Caspase-3 proteininde, kontrole göre yaklaşık 39,2 kat ve ayrı ayrı ilaç uygulamalarına göre sırasıyla 23,7;17,9 kat daha arttığı görülmüştür. *BCL2* ifade düzeyinde 6,25 μ M dosetaksel + 6,25 μ M deinoksantin kombinasyonu kontrole göre 117 kat ve ayrı ayrı ilaçların uygulamalarına göre sırasıyla yaklaşık 269;176 kat daha azaldığı tespit edilmiştir. Bu neticeler doğrultusunda kanser üzerinde etkinliği bilinen dosetakselin deinoksantin ile kombinasyonunun anti-kanser aktivitesini daha da artırdığını ve hormon reseptörüne duyarlı meme kanseri tedavilerinde yardımcı kür olarak yüksek potansiyel vaat eden bir madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

İlerleyen çalışmalarda protein seviyelerinin Western-Blot ile belirlenmesi, deinoksantin östrojen reseptörü üzerindeki etkinliğinin in silico ve in vitro olarak araştırılması çalışmalarının yapılması ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aihara, M., Wheeler, T.M., Ohori, M., Scardino, P.T. (1994) "Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens", *Urology* 43, 66–67.
- Andreoiu, M., Cheng, L. (2010) "Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications", *Hum. Pathol.* 41, 781–793.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annual Review of Plant Biology*, 55 (1), 373-399.
- Baba, A.I., Cătoi, C. (2007) "Comparative oncology", **Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy.**
- Bancroft, E.K., Page, E.C., Castro, E., Lilja, H., Vickers, A., Sjoberg, D. (2014) "Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the initial screening round of the IMPACT study", *Eur Urol*, 66(3), 489-99.
- Bracarda, S., de Cobelli, O., Greco, C., Prayer-Galetti, T., Valdagni, R., Gatta, G., de Braud, F., Bartsch, G. (2005) "Cancer of the prostate", *Crit Rev Oncol Hematol*, 56(3), :379-396.
- Beer, T.M., Myrthue, A., Eilers, K.M. (2005) "Rationale for the development and current status of calcitriol in androgen-independent prostate cancer", *World J Urol*, 23, 28–32.
- Ben, K.W., Khanfir, A. (2020) "Delayed docetaxel extravasation in case of breast cancer", *Breast J*, 26(9), 1843–1844.
- Bratt, O., Drevin, L., Akre, O., Garmo, H., Stattin, P. (2016) "Family History and Probability of Prostate Cancer, Differentiated by Risk Category: A Nationwide Population-Based Study", *J Natl Cancer Inst*, 108(10).
- Cannarella, R., Condorelli, R.A., Barbagallo, F., Vignera, S.L., Calogero, A.E. (2021) "Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts" *Front Endocrinol*, 22, 554078.
- Che, C.L., Zhang, Y.M., Zhang, H.H., Sang, Y.L., Lu, B., Dong, F.S., Zhang, L.J., Lv, F.Z. (2013) "DNA microarray reveals different pathways responding to paclitaxel and docetaxel in non-small cell lung cancer cell line", *Int J Clin Exp Pathol*, 6,1538–1548.
- Chen, Y.C., Page, J.H., Chen, R., Giovannucci, E. (2008) "Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era", *Prostate*. 68(14), 1582-1591.
- Cheng, J., Zhang, Z., Zheng, Z., Lv, G., Wang, L., Tian, B., Hua, Y. (2014) "Antioxidative and Hepatoprotective Activities of Deinoxanthin-Rich

Extract from *Deinococcus radiodurans* R1 against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice”, **Trop J Pharm Res**, 13, 573-580.

Choi, Y., Hur, J., Lim, S., Jo, M., and Kim, D., (2014), “Induction of Apoptosis by Deinoxanthin in Human Cancer Cells”, **Anticancer Research** 34:1829-1836

Cornford, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., De Santis, M., Gross, T., Henry, A.M., Joniau, S., Lam, T.B., Mason, M.D., Van der Poel, H.G., Van der Kwast, T.H., Rouvière, O., Wiegel, T., Mottet, N. (2017) “Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer” **Eur Urol**, 71(4), 630–42.

Cristofani, R., Marelli, M.M., Cicardi, M.E., Fontana F., Marzagalli, M., Limonta P., Poletti A., Moretti R.M. (2018) “Dual role of autophagy on docetaxel-sensitivity in prostate cancer cells”, **Cell Death Dis**, 9(9), 889.

Cuzick, J., Thorat, M.A., Andriole, G., Brawley, O.W., Brown, P.H., Culig, Z., (2014) “Prevention and early detection of prostate cancer” **Lancet Oncol**, 15(11), 484-492.

Çapık, C. (2013) “Investigating the Factors That Affect the Barrier Perception in Attending Prostate Cancer Screenings” **Turk J Geriatrics**, 16(2), 185–191.

Edwards, S.M., Kote-Jarai, Z., Meitz, J., Hamoudi, R., Hope, Q., Osin, P., (2003) “Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene”, **Am J Hum Genet**, 72(1), 1-12.

Eeles, R.A., Olama, A.A., Benlloch, S., Saunders, E.J., Leongamornlert, D.A., Tymrakiewicz, M. (2013) “Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array” **Nat Genet**, 45(4), 385-391

Extra, J.M., Rousseau, F., Bruno, R., Clavel, M., Bail, N.L., Marty M. (1993) “Phase I and pharmacokinetic study of Taxotere (RP 56976; NSC 628503) given as a short intravenous infusion” **Cancer Res**, 53, 1037-1042

Farci, D., Esposito, F., Alaoui, S., Piano, D. (2016) “The S-layer protein DR_2577 Binds Deinoxanthin and under Desiccation Conditions Protects against UVRadiation in *Deinococcus radiodurans*” **Frontiers in Microbiolog**, 16(7), 155

Ganju, A., Yallapu, M.M., Khan, S., Chauhan, S.C., Jaggi, M., (2014) “Nanoways to overcome docetaxel resistance in prostate cancer”, **Drug Resist Updates** 17, 13–23.

Guillen, K.P., Restuccia, A., Kurkjian, C., Harrison, R.G., (2015) “Annexin V-Directed enzyme prodrug therapy plus docetaxel for the targeted treatment of pancreatic cancer” **Pancreas**, 44, 945–952.

Haller, D.G., Misset, J.L., (2002) “Docetaxel in advanced gastric cancer”, **Anti Canc**

Drugs, 13(5), 451–460.

- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) “Hallmarks of cancer: The next generation”, *Cell*, 144, 646-674.
- Huang, Q., Whittington, T., Gao, P., Lindberg, J.F., Yang, Y., Sun, J., Vaisanen, M.R., Szulkin, R., Annala, M., Yan, J. (2014) “A prostate cancer susceptibility allele at 6q22 increases RFX6 expression by modulating HOXB13 chromatin binding”, *Nat Genet*, 46, 126–135
- Jemal, A., Ward, E.M., Johnson, C.J., Cronin, K.A., Ma, J., Ryerson, B. (2017) “Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival”, *J Natl Cancer Inst*, 109(9).
- Huang, H., Liu, T., Guo, J., Yu, L., Wu, X., He, Y., Li, D., Liu, J., Zhang, K., Zheng X., Goodin, S. (2017) “Brefeldin A enhances docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cells in monolayer and 3D cultures,” *Bioorg Med Chem Lett*, 27(11), 2286-2291.
- Jewett HJ. (1975) “The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer”, *Urol Clin North Am*, 2, 105–124.
- Ji, H., (2010) “Insight into the Strong Antioxidant Activity of Deinoxanthin, a Unique Carotenoid in *Deinococcus radiodurans*“, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 4506-4510.
- Krinsky, N.I., Johnson, E.J. (2005) “Carotenoid actions and their relation to health and disease” *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516
- Kuzgunbay, B., Yayıcıoğlu, O. (2015) “The Role of Radical Prostatectomy in the Treatment of Patients with High-Risk Prostate Cancer”, *J Urol Surg*, 2(3), 120–123.
- Lange E.M. (2010) “Identification of genetic risk factors for prostate cancer: analytic approaches using hereditary prostate cancer families. In Male reproductive cancers: epidemiology, pathology and genetics” (ed. Foulkes WD, Cooney KA), 203–228. Springer, New York.
- Lemee, L., Peuchant, E., Clerc, M. (1996) “Deinoxanthin: A new Carotenoid Isolated from *Deinococcus radiodurans*”, *Elsevier Science*, 53, 919-926
- Leongamornlert, D., Mahmud, N., Tymrakiewicz, M., Saunders, E., Dadaev, T., Castro, E. (2012) “Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk” *Br J Cancer*, 106(10), 1697-1701.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. (2000) “Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland”, *N Engl J Med*, 343, 78–85.
- Lijun, M., Haiyuan, Y., Sai, M., Ziyang, X., Fukun, W., Chunhua, Y., Junnian, Z.

- (2021) “Combination of oncolytic adenovirus targeting SATB1 and docetaxel for the treatment of castration-resistant prostate cancer,” *J Cancer*, 12(6), 1846–1852.
- Litwin, M.S. Tan, H.J. (2017) “The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review”, *JAMA* 317, 2532–2542.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Long, H.J. (1994) “Paclitaxel (Taxol): a novel anticancer chemotherapeutic drug”, *Mayo Clin Proc*, 69(4), 341–345.
- Loyd, T., Hounscome, L., Mehay, A., Mee, S., Verne, J., Cooper, A. (2008) “Lifetime risk of being diagnosed with, or dying from, prostate cancer by major ethnic group in England 2008-2010”, *BMC Med*, 13, 171
- Mackay, J., Jemal, A., Lee, N.C., Parkin, D.M. (2006) “The Cancer Atlas”, American Cancer Society, Atlanta.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V., Daly, M.J., (2001) “Genome of the Extremely Radiation-Resistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* Viewed from the Perspective of Comparative Genomics”, *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 44–79.
- McGregor, B., Tulloch, A.G., Quinlan, M.F., Lovegrove, F. (1978) “The role of bone scanning in the assessment of prostatic carcinoma”, *Br J Urol*, 50, 178–181.
- Merey, S. (2002), “Breast Cancer Screening Behavior in Women”, University of Istanbul, Istanbul.
- NCI (2022). National Cancer Institute Website, <https://www.cancer.gov/types> (erişim tarihi. 01.01.2022).
- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B. (2003) “Prostate cancer” *N. Engl. J. Med.* 349, 366–381.
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., and Van Loo, P. (2016), “Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer wholegenome sequences”. *Nature* 534.7605: 47-54.
- O’Donoghue, E.P., Constable, A.R., Sherwood, T., Stevenson, J.J., Chisholm, G.D. (1978) “Bone scanning and plasma phosphatases in carcinoma of the prostate”, *Br J Urol*, 50, 172–177.
- Partin, A.W., Kattan, M.W., Subong, E.N., Walsh, P.C., Wojno, K.J., Oesterling, J.E., Scardino, P.T., Pearson, J.D. (1997) “Combination of prostate specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update”, *JAMA*, 277, 1445–

- 1451 Pound, C.R., Partin, A.W., Eisenberger, M.A., Chan, D.W., Pearson, J.D., Walsh P.C. (1999) "Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy", *JAMA*, 281, 1591–1597.
- Pritchard, C.C., Mateo, J., Walsh, M.F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., Garofalo, A., Gulati, R., Carreira, S., Eeles, R., (2016) "Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer" *N Engl J Med*, 375, 443–453.
- Rao, A.V., Rao, L.G. (2007), "Carotenoids and human health", *Pharmacol Res* 55: 207-216.
- Sabzehzari, M., Zeinali, M., Naghavi, M.R.(2020) "Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: advances and future perspectives", *Biotechnol Adv*, 43, 107569.
- Sharoni. Y., Danilenko, M., Walfisch, S., Amir, H., Nahum, A., Ben- Doe, A., Hirsch,K., Khanin, M., Steiner, M., Agemy, L., Zango, G., and Levy, J. (2002), "Role of gene regulation in the cancer activity of carotenoids", *Pure and Applied Chemistry* 74: 1469-1477. Sartor, O., de Bono, J.S. (2018) "Metastatic prostate cancer", *N. Engl. J. Med.* 378, 645–657.
- Shim, J.S., Matsui, Y., Bhat, S., Nacev, B. A., Xu, J., Bhang, H. E. C., et al. (2010). Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1855–1873
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. (2014) "Cancer statistics", *CA Cancer J Clin*, 64(1), 9–29.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. Jemal, A. (2018) "Cancer statistics", *CA Cancer J. Clin.* 68, 7–30.
- Small, E.J. (2001) "Docetaxel in prostate cancer" *Anti Canc. Drugs* ,12, 17–20.
- Singh, A., Thakur, S., Singh, N., Kaur, S., Jain S.K (2021) "Novel gellan gum-based in situ nanovesicle formulation of docetaxel for its localized delivery using depot formation", *AAPS Pharm Sci Tech*, 22(5), 165.
- Sun, Z., Shen, S., and Tian, B., (2009). "Functional analysis of c- carotene ketolase involved in the carotenoid biosynthesis of *Deinococcus radiodurans*." *FEMS Microbiology Letters* 301, 21–27.
- Tan, G., Gyllenhaal, C., and Soejarto, D. (2006). "Biodiversity as a source of anticancer drugs." *Current Drug Targets*, 7(3), 265–277.
- Tamatani, T., Ferdous, T., Takamaru, N., Hara, K., Kinouchi, M., Kuribayashi, N., Ohe, G., Uchida, D., Nagai, H., Fujisawa, K., Miyamoto, Y. (2012) "Antitumor efficacy of sequential treatment with docetaxel and 5-fluorouracil against human oral cancer cells", *Int J Oncol*, 41, 1148–1156.

- Tian, B., Sun, Z., Xu, Z., Shen, S., Wang, H., and Hua, Y. (2018). “Carotenoid 3,4 - desaturase is involved in carotenoid biosynthesis in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*.” ***Microbiology***, 154(12), 3697-3706.
- UICC. UICC (International Union Against Cancer). (2002) “TNM classification of malignant tumours”. Sobin LH, Wittekind Ch, editors. 6th ed. New York Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss. Book.
- UK CR. Prostate cancer statistics 2017
- Vanhaelen, Q., Mamoshina, P., Aliper, A. M., Artemov, A., Lezhnina, K., Ozerov, I., et al. (2017). Design of efficient computational workflows for in silico drug repurposing. *Drug Discov. Today* 22, 210–222.
- Xu, Z., Tian, B., Sun, Z., Lin, J., Hua, Y. (2007) “Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*”, ***Microbiology***, 153, 1642-1652.
- Verim, L., Yildirim, A., Basok, E.K., Peltekoglu, E., Pelit, E.S., Zemheri, E., Tokuc, R. (2013) “Impact of PSA and DRE on histologic findings at prostate biopsy in Turkish men over 75 years of age”, ***Asian Pac J Cancer Prev***, 14, 6085-6088.
- Vinjamoori A, Jagannathan J, Shinagare A, Taplin, M.E., Oh, W.K., Van den Abbeele, A.D., Ramaiya, N.H. (2012) “Atypical metastases from prostate cancer: 10-year experience at a single institution” ***AJR. Am J Roentgenol***, 199, 367-372.
- Walt, N., Zakeri, Z., and Cronje, M., (2016), “The Induction of Apoptosis in A375 Malignant Melanoma Cells by *Sutherlandia frutescens*.” ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***, 4921067 .
- Wang, P., Henning, S.M., Heber, D., Vadgama, J.V. (2014) “Sensitization to docetaxel in prostate cancer cells by green tea and quercetin”, ***J Nutr Biochem***, 26(4), 408-415.
- Winterich, J.A., Grzywacz, J.G., Quandt, S.A., Clark, P.E., Miller, D.P., Acuña, J., Dignan, M.B., Arcury, T.A. (2009) “Men’s Knowledge and beliefs about prostate cancer: education, race, and screening status” ***Ethn Dis***, 19, 199-203.
- Zhou, Z., Zhang, W., Su, S., Chen, M., Lu, W., and Xu, Y. (2015) “CYP287A1 is a carotenoid 2- β -hydroxylase required for deinoxanthin biosynthesis in *Deinococcus radiodurans* R1” ***Applied Microbiology and Biotechnology*** 99(24), 10539–10546.