

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DEXPANTHENOL'ÜN PROSTAT KANSERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selen SOYTORUN YETKİNEL

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. F. Peyman ERTUĞ**

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DEXPANTHENOL'ÜN PROSTAT KANSERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selen SOYTORUN YETKİNEL

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANI
Doç. Dr. F. Peyman ERTUĞ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2019-11749
Nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2022

KABUL VE ONAY

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

“Dekspantenol’ün Prostat Kanseri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Araştırılması”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: / /

TEZ SINAV JÜRİSİ

Doç. Dr. F. Peyman ERTUĞ
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. R. Nalan TİFTİK
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. İsmail ÜN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Mahir KAPLAN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim boyunca çalışmanın planlanması ve uygulanmasında büyük desteği ve yardımı olan Sayın Doç. Dr. F. Peyman ERTUĞ'a ve Sayın Doç. Dr. H. Mahir KAPLAN'a teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki birbirinden değerli başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK ve Öğretim Üyelerimize, eğitimim süresince mesleki tecrübe, deneyim ve bilgilerini benimle paylaştıkları için teşekkürü borç bilirim. Ayrıca, Dr. Gülşah EVYAPAN'a tez çalışmama yapmış olduğu yardım ve katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Beraber çalışma fırsatı bulduğum çalışma arkadaşlarım ve ayrıca emeği geçmiş tüm teknik ve idari personele yardımları ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak her zaman karşılıksız sevgi ve destekleri ile yanımda olan, beni bugünlere getiren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Selen SOYTORUN YETKİNEL

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Prostat Bezinin Morfolojisi	2
2.2. Prostat Bezinin Anatomisi	2
2.3. Prostat Bezinin Fizyolojisi	3
2.4. Prostat Kanseri	3
2.5.1. Prostat kanseri epidemiyolojisi	3
2.5.2. Prostat Kanseri İnsidansı	4
2.5.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	5
2.5.4. Prostat Kanserinde Tanı	6
2.5.4.1. Parmakla Rektal Muayene	6
2.5.4.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)	6
2.5.4.3. TRUS (Transrektal Ultrasonografi)	7
2.5. Dekspantenol	7
2.6. Apoptozis	9
2.6.1. Apoptozis Morfolojisi ve Mekanizması	9
2.6.1.1. İntrinsik (Mitokondriyal) Yol	10
2.6.1.2. Ekstrinsik Yol	11
2.7. Bcl-2 Ailesi	12
2.8. Bax	13
2.9. Kaspaz-3	14

2.9.1. Apoptozisin Prostat Kanseri ile İlişkisi.....	14
2.9.2. Apoptozisin Dexpanthenol ile İlişkisi.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Hücre Kültürü.....	17
3.2. Kültür İçin Yapılan Hazırlıklar	17
3.3 Hücrelerin Ekimi ve Yaşatılması	17
3.4. Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	18
3.5 Dekspantenol Konsantrasyonunun Hazırlanması	18
3.6. Hücre Homojenizasyonu.....	18
3.7. Protein Miktar Tayini.....	19
3.8. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi	19
3.9. ELİSA Bax Protein Miktar Tayini	19
3.10. ELİSA Bcl-2 Protein Miktar Tayini.....	20
3.11. ELİSA Kaspaz-3 Protein Miktar Tayini	20
3.12. Sitotoksosite (MTT) Testi.....	21
3.13. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. ELİSA Bcl-2 Enzim Miktar Tayini.....	22
4.2. ELİSA Kaspaz-3 Enzim Miktar Tayini.....	22
4.3. ELİSA Bax Protein Miktar Tayini	23
4.4. Sitotoksosite Bulguları.....	24
5. TARTIŞMA.....	25
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Coğrafi bölgelere göre, yaşa standardize edilmiş prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları	4
Şekil 2.2. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) kapsamında ABD’de izlenen prostat kanseri vakaları	5
Şekil 2.3. Dekspantenol’ün kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4. Pantotenik asit’in kimyasal yapısı	7
Şekil 2.5. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar.....	12
Şekil 4.1. Dekspantenol’ün prostat kanseri hücrelerindeki bcl-2 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student <i>t</i> test (Kontrolle göre $p>0.05$).....	22
Şekil 4.2. Dekspantenol’ün prostat kanseri hücrelerindeki kaspaz-3 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student <i>t</i> test (Kontrolle göre $p>0.05$).....	23
Şekil 4.3. Dexpentanol’ün prostat kanseri hücrelerindeki Bax proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student <i>t</i> test (Kontrolle göre $P>0.05$).....	23
Şekil 4.4. Dexpentanol’ün prostat kanseri hücrelerindeki sitotoksosite etkisi	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Apoptozu regüle eden proteinler	13
Tablo 4.1. Dekspantenol'ün Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon üzerindeki etkileri	24



KISALTMALAR DİZİNİ

FBS:	Fetal Bovine Serum
DMEM:	Dulbecco's modification of Eagle's medium
RIPA:	Radio-İmmünopresipitasyon Tahlili
SMAC:	Kaspazın 2.mitokondriyal aktivatörü
DIABLO:	Apoptoz Bağlayıcı Proteinin Doğrudan İnhibitörü
HtrA2 (Omi):	Serin proteaz Omi protein A2
PMSF:	Fenilmetilsülfonil florür
BPH:	Benign Prostat Hiperplazisi
PSA:	Prostat Spesifik Antijen
TRUS:	Transrektal Ultrasonografi
PA:	Pantotenik Asit
ATP:	Adenozin 3'-trifosfat
CoA:	Koenzim A
TNF:	Tümör Nekroz Edici Faktör
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
Apaf-1:	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
MOMP:	Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği
TNFR:	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
IAP:	Apoptoz Proteinini İnhibitörü
ICAD:	İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
TRAILR:	TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü
FADD:	Fas ilişkili ölüm domaini
TRADD:	TNF ilişkili ölüm domaini
MTT:	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum
ELİSA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
CAD:	Kaspaz Aktive Edici DNaz
DDP:	Sisplatin
TLP:	Tempol
GSH:	Redükte Glutasyon

ÖZET

Dexpanthenol'ün Prostat Kanseri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Organizmanın değişen koşullarda homeostazının devamlılığına katkıda bulunan apoptoz, insanlardaki patojenlerin tedavisi yönünden umut verici bir mekanizmadır. Apoptotik yollar, kanser hastalıklarında ve kanser gelişiminde kemoterapötiklere karşı direnç göstermesi yönüyle de önemlidir. Prostat kanseri ise erkeklerde en sık teşhis edilen ve mortalitede 2 . sırada yer alan kanser türüdür. Pantotenik asit ve indirgenmiş türevi dekspantenol, antiinflamatuar ve antioksidan etkilere sahip tedavi edici önemli bir ajandır. Dekspantenolün hücre ölümünü tetikleyen inflammatuar yollar ve apoptotik yollar üzerindeki etkileri merak uyandırmaktadır. Ayrıca son yıllarda bazı antioksidanların çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılması ve olumlu etkilerinin tespit edilmesi, bu alanda yeni çalışmaların yapılmasını teşvik etmiştir. Çalışmamızda insan prostat kanseri hücrelerinin dexpanthenol ile tedavisinde kaspaz-3, bax, bcl-2 protein düzeylerini nasıl etkileyeceği amaçlanmıştır.

Hücre kültürü yöntemiyle insan prostat kanseri hücreleri PC3 (ATCC CRL1435), kullanıldı. Homojenize edilmiş hücrelerin protein miktar tayini yapıldı. Kaspaz-3, bax ve bcl-2 gibi inflammatuar ve apoptotik yollardaki araçların protein seviyeleri ELISA ile analiz edildi.

Çalışmamızın bulguları, Dekspantenolün PC-3 prostat kanseri hücrelerinde bax, bcl-2 protein ekspresyonu düzeylerini istatistiksel olarak azaltmadığını ve kaspaz-3 protein miktarını ise istatistiksel olarak arttırmadığını göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları PC-3 hücrelerinin çoğalmasında dekspantenolün hücre içi apoptotik yollar üzerinden anlamlı bir etkisi gösterilememiştir.

Anahtar Sözcükler: Dekspantenol, Apoptosis, Prostat Kanseri

ABSTRACT

Investigation of Apoptotic Effects of Dexpanthenol on Prostate Cancer

Apoptosis maintains the homeostasis of the organism in varying conditions. It is a promising mechanism for the treatment of pathogens in humans. Apoptotic pathways are also important in cancer diseases and cancer development in terms of resistance to chemotherapeutics. Prostate cancer is the most frequently diagnosed in men and the second in mortality is the leading type of cancer. Pantothenic acid and its reduced derivative dexpanthenol is an important therapeutic agent with anti-inflammatory and antioxidant effects. The effects of dexpanthenol on inflammatory pathways and apoptotic pathways that trigger cell death are intriguing. In addition, the use of some antioxidants in the treatment of various types of cancer and the detection of their positive effects in recent years have encouraged new studies in this area. In our study, it was aimed to determine how it will affect caspase-3, bax, bcl-2 protein levels and activities in the treatment of human prostate cancer cells with dexpanthenol.

Human prostate cancer cells PC3 (ATCC CRL1435) were used by cell culture method. Protein quantification of homogenized cells was performed. Protein levels and activities of mediators in inflammatory and apoptotic pathways such as caspase-3, bax and bcl-2 were analyzed by ELISA. The findings of our study showed that Dexpanthenol did not statistically decrease bax, bcl-2 protein expression levels in PC-3 prostate cancer cells and did not statistically increase the amount of caspase-3 protein.

As a result, it was shown that dexpanthenol did not have a significant effect on the proliferation of PC-3 cells on intracellular apoptotic pathways.

Key Words: Dexpanthenol, Apoptosis, Prostate Cancer

1. GİRİŞ

Hücre sayısındaki denge yeni hücre oluşumu ve sabit bir ölüm hızıyla sağlanır. Tüm memeli dokularında bu hassas dengenin devam ettirilmesinde hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptozun rolü büyüktür. Kontrolsüz ve pasif bir hücre ölüm tipi olan nekrozun aksine apoptoz; aktif, kontrollü, komşu hücrelere zarar vermeyen, morfolojik değişikliklerle ilerleyen çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarla başlatılan programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır.

Prostat, erkek genital sisteminin en büyük aksesuar bezidir. Prostat karsinomu erkek cinsinde en çok görülen internal malignitedir. Kanserle ilgili ölümlerde ise ikinci sırada yer alır. Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptozisin de malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen ve bundan dolayı beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında mutasyonların daha sonra malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar.

Genel sağkalım süresini uzatabilen günümüz klinik başarılarla rağmen, prostat kanserine (PK) bağlı mortalite halen önemli bir sorundur. Metastatik kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri de, apoptozise dirençli olmaları ve nihayetinde progresif hastalığın gelişmesine neden olmalarıdır. Metastatik kastrasyona dirençli PK tedavisinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkili sitotoksik olmayan etken maddelerin yeni nesil ajanların etkin yaşam avantajları göstermesi umut verici olmakla birlikte; primer ve sekonder tedavi direncinin en iyi nasıl yönetileceği halen kaçınılmaz bir sorundur. Çalışmamızda kullandığımız dexpantenol de antioksidan ve antiinflamatuvar etkilidir. PK tedavi direncinin üstesinden gelmek için, apoptotik etkileri arttırmayı hedefleyen antioksidanlar her geçen gün önem kazanmaktadır. Apoptotik yolağı indükleyen mekanizmaları konu alan yeni bilimsel araştırmalar, sinerjistik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin önemi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Gelecekte kemoterapötiklerin yerini, apoptozis gibi fizyolojik mekanizmaları çalıştıran, yan etki profili düşük moleküllerin alması öngörülmektedir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Bezinin Morfolojisi

İnsan prostat bezi; mesanenin hemen altında bulunur, proksimal üretrayı koni şeklinde sarar ve ejakülasyona katkıda bulunan sıvıların ve spermin salgılanmasından sorumlu erkek cinsiyet aksesuar bezidir (1).

Embriyolojik olarak prostat bezi gebeliğin 12. haftasında endodermden köken alan ürogenital sinüsün epitelyal büyümesi ile oluşur. Epitelyal tomurcuklar prostatı oluşturmak üzere mezenkime penetre olurlar, epitel hücreleriyle ilişkili mezenşimden ise organın stroması ve düz kasları meydana gelir. Tam prostat morfogenezi için dihidrotestosteronun (DHT) olması gerekir ve testosteron; 5- α redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona dönüştürülür. 5- α redüktaz enzimi, ürogenital sinüste prostat gelişimi öncesi ve sırasında mevcuttur (2).

2.2. Prostat Bezinin Anatomisi

Prostat yaklaşık 10-15 gr ağırlığında olup 50 yaşından sonra 30 grama kadar çıkabilir (3). Prostat bezi erkeklerde kemik pelvis boşluğunda prostatik üretranın etrafını sarar. Tabanı mesane boynuyla, tepesi ise üretra ve detrusor kası ile devamlılık gösterir. Apeksi ise çizgili üretral sfinkter ile devam eder.

Prostat, superiordan mesaneye, inferiordan ise eksternal üriner sfinkter ve membranöz üretraya bağlıdır. Prostatın dört yüzü vardır. Bunlar posterior yüz, anterior yüz ve iki adet inferolateral yüzdür. Anterior yüzü simfizis pubisin arkasında yer alır Posterior yüz rektumla yanyanadır ve rektumdan Denonvilliers' fasyasıyla ayrılır (2).

Prostatın glandüler zonal anatomisi 3 bölgeye ayrılır; periferik zon (PZ), santral zon (CZ), transisyonel zon (TZ) olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Bu bölgelerin farklı embriyolojik kökenleri vardır ve histolojileri, biyolojik işlevleri, patolojik bozukluklara yatkınlıklarıyla ayırt edilebilirler. Prostat kanserinin % 70 i ürogenital sinüsten üretilen PZ' den kaynaklanır. Wolf kanalından türetilen CZ ise oldukça düşük prostat kanseri insidansına sahiptir. CZ ve PZ 'nin benzersiz embriyolojik kökenleri göz önüne alındığında karsinogeneze olan duyarlılıklarının farklılık gösterdiği bilinmektedir (4). Transisyonel zon ise glandüler dokunun %5'ini oluşturmaktadır. Benign Prostat

Hiperplazisi (BPH) ile genişleyen prostat kanserlerinin %40 ı bu bölgede görülmektedir (5).

2.3. Prostat Bezinin Fizyolojisi

Prostatik kas dokusu sempatik sinirlerin kontrolündedir. Bu doku düz kas lifi içeren elastik bağ dokudan ibarettir. Bu kasların kontraksiyonları ile ejakülasyon sırasında prostat salgısının atılımını sağlar (6). Prostat sıvısı alkalidir yani bazik haldedir (pH: 7.5). Prostat sıvısı; su, sitirik asit, asit fosfataz, amilaz, kolesterol, kalsiyum, çinko, tamponlayıcı tuzlar, fosfolipidler, prostaglandinler, fibrinojen, seminaplasmin adı verilen antibiyotik ve prostat spesifik antijen (PSA) içerir (7). Prostat sıvısı semen hacmine % 20-30 oranında katkıda bulunur ve fertilizasyonda kadın vaginası asidik olduğu için ortamı alkali hale getirerek spermilerin zarar görmemesini sağlar (8).

2.4. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, prostat dokusunu oluşturan bazı hücrelerin ihtiyaç olmadığı halde kontrolsüz çoğalmaya devam ederek komşu dokulara sıçrayabilen kötü huylu (malign) tümör yapıları oluşturması sonucu meydana gelmektedir. Prostat kanseri genellikle yavaş büyüme eğiliminde olan fakat daha sonra hızlı ilerleyebilen ciddi bir hastalıktır. Prostat kanserlerinin çoğu erken dönemde asemptomatiktir. Hastalığın ilerlemesiyle; geceleri sık idrara çıkmak, idrar yapma esnasında yanma ve ağrı hissi, idrar veya menide kan görülmesi gibi bulgular prostat kanseri için ipucu olabilmektedir(9).

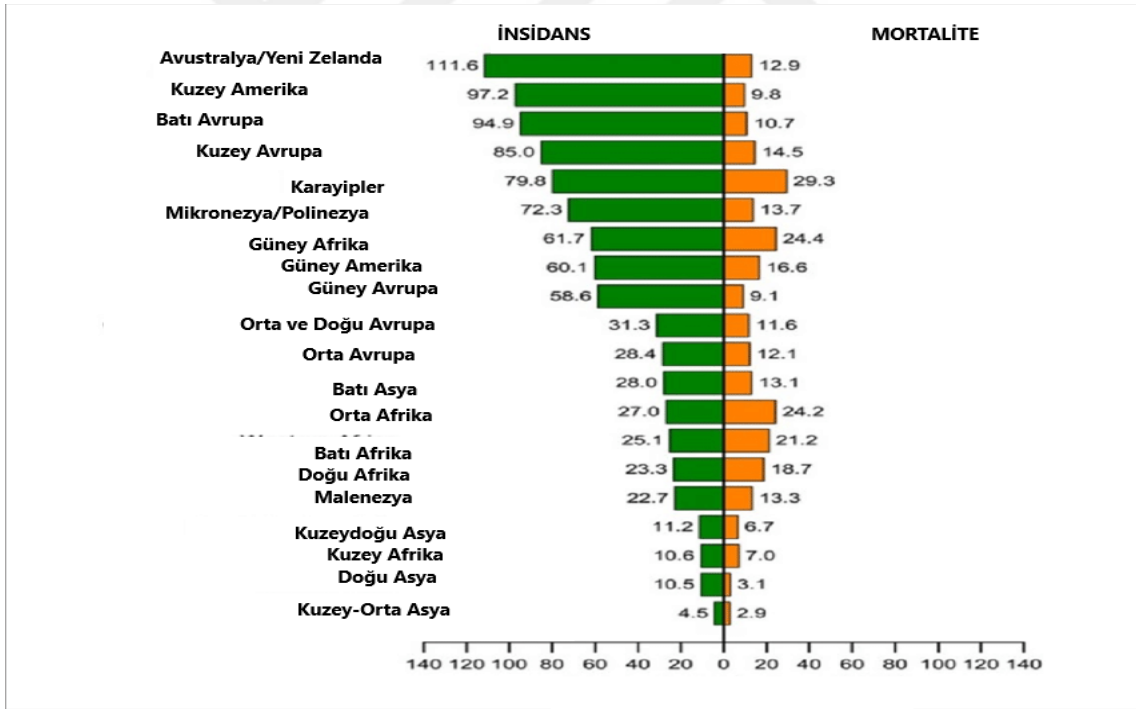
2.5.1. Prostat kanseri epidemiyolojisi

Prostat kanseri; erkeklerde akciğer kanserinden sonra dünya çapında en çok görülen ikinci kanserdir (2). Prostat kanserinin dünya genelinde en yüksek oranda görüldüğü toplum Afrika kökenli Amerika'lılardır (10).

2.5.2. Prostat Kanseri İnsidansı

Küresel olarak prostat kanseri erkekler arasında çok yaygın olup ölüme yol açabilmektedir. 2018 yılında 1.276.106 kişiye yeni prostat kanseri tanısı konmuş ve 358.989 kişi prostat kanseri nedeniyle kaybedilmiştir.

Prostat kanseri insidansı yaşla birlikte artmaktadır ve en çok tanı konulan ortalama yaş 65-69 aralığındadır. Irk farklılığı da prostat kanseri insidansını oldukça etkilemektedir; en yüksek Afro-Amerikan erkeklerde görülmektedir. Siyah ırkta prostat kanseri insidansı beyaz ırka göre yaklaşık bir buçuk kat daha fazla olup, kanser daha erken yaşta tespit edilmekte ve daha yüksek mortalite oranına ulaşmaktadır(11). Prostat kanseri insidansının en yüksek olduğu bölgeler Afrika ülkelerinin çoğu, Avustralya-Yeni Zelanda, Kuzey ve Batı Avrupa ile Amerika, en düşük olduğu bölgeler ise Kuzey Asya, Orta Asya ve Güneydoğu Asya'dır. Bu eşitsizliğin nedeni sosyal, çevresel ve genetik faktörlere dayanmaktadır(12).



Şekil 2.1. Coğrafi bölgelere göre, yaşa standardize edilmiş prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları(13).

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Prostat kanseri İnsidansı

İrk/Etnik	Erkekler
Tüm Irklar	156.0 (100.000'de)
Kafkaslar	149.5 (100.000'de)
Afro-Amerikanlar	233.8 (100.000'de)
Asyalılar	88.3 (100.000'de)
Yerli Amerikalılar	75.3 (100.000'de)
Hispanic	107.4 (100.000'de)

Şekil 2.2. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) kapsamında ABD’de izlenen prostat kanseri vakaları (14).

2.5.3. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Özellikle yaşı ilerlemiş erkeklerde prevalansı oldukça yüksek kanser tipidir. Ayrıca kitle tarama programları prostat kanseri insidansının artmaya devam ettiğini göstermektedir. İrk, yaş ve ailenin prostat kanseri öyküsü, kanıtlanmış risk faktörleridir. Pozitif bir aile prostat kanseri öyküsü, birçok çalışmada önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Tanı konan erkeklerin %10'unda ailede prostat kanseri öyküsü bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ailede prostat kanserine yakalanan kişi sayısı ve yakınlık derecesi hastalık riski ile orantılıdır. Hastalığın potansiyel nedenleri üzerine yapılan çalışmalarda çevresel risk faktörleri, diğer hastalıklarla ilişkisi, yaşam tarzı ve genetik faktörler göz önünde bulundurulmuştur. Prostat kanserinin gelişiminde ve direncinde, diyetin ve beslenmenin rolü bir çok çalışmada dikkate alınmıştır. Beslenmede yağ alımının prostat kanseri ile ilişkisini açıklayan mekanizmada oksidatif stres ve DNA hasarı bulunmaktadır. Yüksek yağ alımı, seks hormonlarının normal sentezini değiştirebilmektedir. Yapılan çalışmalarda A, E ve D vitaminleri, selenyum, izoflavanoidler, soya, lif içerikli ve antioksidan etkili gıdalar prostat kanserine karşı koruyucu faktör olarak rol aldığı incelenmiştir (9).

2.5.4. Prostat Kanserinde Tanı

Prostat kanseri teşhisi için mevcut klinik araçlar ve modaliteler; parmakla rektal muayene (PRM), Prostat Spesifik Antijen (PSA) ölçümü ve transrektal ultrasonografidir (TRUS). Bu yöntemlerle prostat kanseri şüphesi durumunda kesin teşhis koymak için biopsi alınarak histopatolojik olarak incelenmesi gerekmektedir (15). Prostat kanserlerinin % 60'ından fazlası, normal PRM ve yüksek PSA'sı olan asemptomatik hastalarda teşhis edilebilir (16).

2.5.4.1. Parmakla Rektal Muayene

Parmakla rektal muayene, özellikle 40 yaş üzeri erkeklerde prostat kanserinin erken tanısı için başvurulmuş en eski yöntemlerden biridir. PRM prostatın sertliği ve büyüklüğü hakkında bilgi verir. PRM'nin pozitif öngörü değeri %23 ile %56 arasında değişmektedir. Şüpheli bir sertliğin veya bezde anormal boyutun farkedilmesi prostat kanseri açısından kuşku oluşturur ve histopatolojik olarak incelenmesi gerekir(17).

2.5.4.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)

PSA ejakülatın seminal plazmasında bulunan bir proteazdır. %60-80'i tripsin ile kimotripsin benzeri aktiviteye sahiptir. %20-40'ı enzimatik olarak inaktiftir (18). Kallikrein-3 olarak da adlandırılır ve sperm hareketliliğini artırma işlevi görür (19). Prostatik lümen yoğun konsantrasyonda PSA içerir. Ancak bunun dolaşıma geçmesi stromanın bazal membran bariyeriyle engellenir. Bu bariyerlere hasar verecek herhangi bir etken PSA seviyesinde artışa neden olur. Kan testindeki PSA, prostat kanserinde önemli bir biyobelirteçtir. Kabul edilebilir bir duyarlılığa sahip olmasına rağmen spesifik değildir. PSA seviyesinin yüksekliği; BPH (iyi huylu prostat hiperplazisi), prostatit, indolent kanserler (yaşamı boyunca semptom belirtisi çok az görülen ya da hiç görülmeyen ve ölüme neden olması muhtemel olmayan) ve agresif ilerlemiş kanserler arasında güvenilir ayırım yapamaz (20). Prostat kanserini saptamada PSA ile PRM kıyaslandığında genel duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değeri açısından PSA'nın prostat kanserini tespit etme potansiyeli daha yüksektir (21). Prostat kanseri tanısında ve tedavi izleminde en sık başvurulmuş tümör belirleyicisidir(19).

2.5.4.3. TRUS (Transrektal Ultrasonografi)

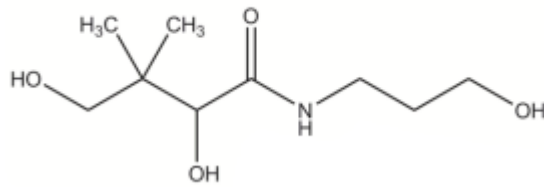
Prostat bezinin görüntülenmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan TRUS prostat biyopsinin incelenmesinde tanıyı doğrulamak için altın standart kabul edilmektedir(16).

Transrektal ultrasonografi PRM nin anormal olduğu ya da PSA değerinin yüksek olduğu hastalar için kullanılır(18).

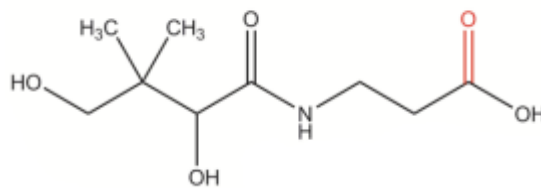
2.5. Dekspantenol

Kolinerjik bir ajan olan Dekspantenol (CAS No. 81-13-0), B kompleks vitaminlerinin (B5 vitamini) bir üyesi olan pantotenik asidin alkollü bir analogudur (22). Dekspantenol'ün moleküler formülü $C_9H_{19}NO_4$ olup, kimyasal yapısı ise; (2R)-2,4-Dihidroksi-N-(3-hidroksipropil)-3,3-dimetilbutiramid'dir(23).

Dekspantenol, sentetik bir formdur, doğal olarak bulunmaz, vücutta pantotenik asite dönüştürülür. B kompleks vitaminlerinin bir üyesi olan pantotenik asit (B5 vitamini) 1931 yılında Roger J. Williams (1893–1988) tarafından mikrobiyal büyüme faktörleri üzerine yaptığı çalışmalar sırasında keşfedilmiştir. 1934'te pantotenik asidin mayadaki hücre proliferasyonu üzerinde derin bir uyarıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve ilk dekspantenol preparasyonunun (Bepanthen™) geliştirilmesine yardımcı olmuştur (24).



Şekil 2.3. Dekspantenol'ün kimyasal yapısı (25).



Şekil 2.4. Pantotenik asit'in kimyasal yapısı (25).

Pantotenik asit (PA), karbonhidratların, yağların ve azot bileşiklerinin metabolizmasında önemli bir rolü olduğu bilinen Koenzim A'nın bir bileşenidir. Yanık ve yaraların yanı sıra ülserin epitelizasyonunu arttırmak için haricen kullanılır (23). Pantotenik asit çeşitli bitki ve hayvanlarda (süt, yumurta, karaciğer, deniz ürünleri, kepekli tahıllar, mantar, brokoli, avokado, yer fıstığı, nohut, ayçiçeği çekirdeği vs.) doğal olarak bulunan bir maddedir ve bağırsak mikroorganizmaları tarafından da sentezlenebilir. Pantotenik asit, hem hayvansal hem de bitkisel gıdalarda bulunan bir bileşeni olduğundan, insanlarda bu vitaminin eksikliği çok nadir görülür. Vücuttaki günlük gereksinimi 4-7 mg kadardır. Deneysel olarak B₅ vitamini eksikliği çalışmasında; yorgunluk, baş ağrısı, halsizlik, kişilik değişiklikleri, uyuşukluk, parestezi, kas/karın krampları, mide bulantısı ve kas koordinasyonunun bozulması gibi semptomların ortaya çıktığı görülmüştür (26). Yapılan çalışmalarda B₅ vitaminin besinsel eksikliği, dokularda büyük ölçüde azalmış CoA seviyelerine yol açabileceği ve bu durumun ise birçok temel reaksiyonu olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir (27).

Pantotenik asit; yağ asitleri, kolesterol, asetilkolin gibi önemli metabolitlerin sentezinde rol alan ve sitrik asit döngüsü dahil olmak üzere birçok metabolik döngü için gerekli Koenzim A' nın biyosentezindeki başlangıç substratıdır (28). Pantotenik asit ve türevlerinin koruyucu etkisi, CoA' nın membran fosfolipidlerinin sentezini güçlendirip lipid peroksidasyonunu önlemesi ve bunun sonucunda hücresel onarım mekanizmasını desteklemesinden gelir. Ehrlich asit tümör hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada pantotenik asit türevi CoA öncüsü olmayan homopantotenik asit, çok daha düşük oranda koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (29). Pantotenik asidin radioprotektif etkisi, sıçanları gamma radyasyonuna maruz kalmaya karşı koruması sonucu görülmüştür (Slyshenkov ve ark, 1999). Yapılan çalışmalarda PA'nın hücre içinde glutatyon düzeylerini arttırarak önemli antioksidan ve koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Pantotenik asit, hücrelerde indirgenmiş glutatyon (GSH), koenzim A (CoA) ve ATP sentezini arttırır (Slyshenkov ve ark, 2004). Glutatyon, apoptozu ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) kaynaklı sitotoksikite türlerini kontrol eden temel bir elementtir(30). Artan metabolik aktivite, mitokondriyal disfonksiyon ve kanserli bir hücrede onkogen aktivitesi hücrelerde ROS'un üretimine kaynak oluşturabilecek faktörlerden bazılarıdır. Glutatyonun, ROS'e karşı hücreyi koruma mekanizması

glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi enzimlerin interaksyonu sonucu şekillenir (31). Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hücre hasarını önleyen koruma sistemleridir. Pantotenik asit, azalmış olan glutasyon ve koenzim A düzeylerini arttırıp, hücrelerde adenozin-5-trifosfat (ATP) sentezini uyarak antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğini gösterir (32). Oksidatif stres ve kontrolsüz serbest radikal oluşumu karsinogeneze neden olmaktadır. Antioksidanların tek başına veya kombinasyon halinde kemoterapotik etkinliğini araştıran klinik çalışmalar, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemlidir (33).

2.6. Apoptozis

Her hücre doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon), ve ölür (apoptozis). Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz; hasarlanan hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı, enerjiye gereksinim duyan, genlerle düzenlenen, organizmadaki doku homeostazisi yani apoptozis/proliferasyon dengesini koruyan bir olaydır (34). Apoptozis; toksik kimyasallar, kemoterapötikler, sitokinler, tümör süpresör genlerin aktif olması, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, iyonize radyasyon ve oksidanların dahil olduğu çeşitli stimülatörlerle başlatılabilir. Reaktif oksijen türleriyle (oksidatif stres) hem mitokondri, hem plazma membranı ve hem de genom üzerinde oluşturdukları hasara bağlı olarak da başlatılabilir (35).

Hem fizyolojik hem patolojik şartlar altında meydana gelebilen apoptozisin, patolojik ölüm olarak bilinen nekrozdan farklı özellikleri vardır. Nekrozda gruplar halinde hücre ölümü olurken apoptoziste tek tek hücre ölümü gerçekleşir. Nekrozun aksine apoptoziste inflamasyon görülmez ve nekrozun oluşması için ATP gerekmez iken apoptoziste ATP gerekir (36).

2.6.1. Apoptozis Morfolojisi ve Mekanizması

Apoptozis morfolojisi, tek bir hücrede kromatin yoğunlaşması ve komşu hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Apoptoz esnasında hücrenin boyutu elektron mikroskopuyla incelendiğinde küçülür, sitoplazma büzülür ve yoğunlaşır, kromatin nükleer membranı çevresinde toplanıp yoğunlaşır(37). Morfolojik olarak apoptoz, şu şekilde gerçekleşir; sitoplazma ile çevrelenmiş kromatin

parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Bu apoptotik cisimcikler çevre hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Kromatindeki değişimlerden hemen öncesinde sitozolik Ca^{++} düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. (38). Bir hücrede apoptozun başlaması için öncelikle genetik mekanizmayı harekete geçirecek hücre içi veya hücre dışı sinyal gelmelidir. Hücrenin zarar görmesi durumunda (sıcaklık, radyasyon, sitotoksik ilaçlar, hipoksi gibi durumlarda), DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, hücre içi uyaranlar arasında sitokinler ve hepatit gibi viral hastalıklar, apoptozis gelişmesine yol açabilir (39).

Apoptotik hücre ölüm programı; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) proteini olmak üzere 3 temel bileşen içerir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu ile apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu gibi değişikliklerden sorumludur (40).

Apoptozisin düzenleyici mekanizmaları çok karmaşıktır. ROS, kaspazın aktivasyonu, tümör nekroz edici faktör (TNF), protein kinaz ve mitokondriyal yolak apoptozisin temelini oluşturmaktadır (41).

Apoptoz mekanizması iki şekilde gerçekleşir:

I-İntrinsik (mitokondriyal) yol

II-Ekstrinsik yol

2.6.1.1. İntrinsik (Mitokondriyal) Yol

İntrinsik apoptotik yolak (mitokondriye bağımlı); farklı stres koşullarına (radyasyon, kemoterapötik ajanlar, DNA hasarı, mitokondriyal transmembran potansiyelinin bozulması, oksidatif stres, ksenobiyotik zehirlenme, hipoksi vb.) yanıt olarak hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra inaktif halde bulunan Bid proapoptotik proteinini uyarır. Aktif olan Bid proteini (tBid), antiapoptotik ve mitokondri zarına yerleşmiş olan Bcl-2 proteinini inaktive etmektedir. Bu durum mitokondriyal dışı membran geçirgenliğinin (MOMP) bozulmasına yol açmaktadır. Böylece normalde zarlar arası boşlukta bulunan Sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), prokaspaz-9, SMAC/DIABLO proapoptotik proteinleri ve endonükleaz G gibi

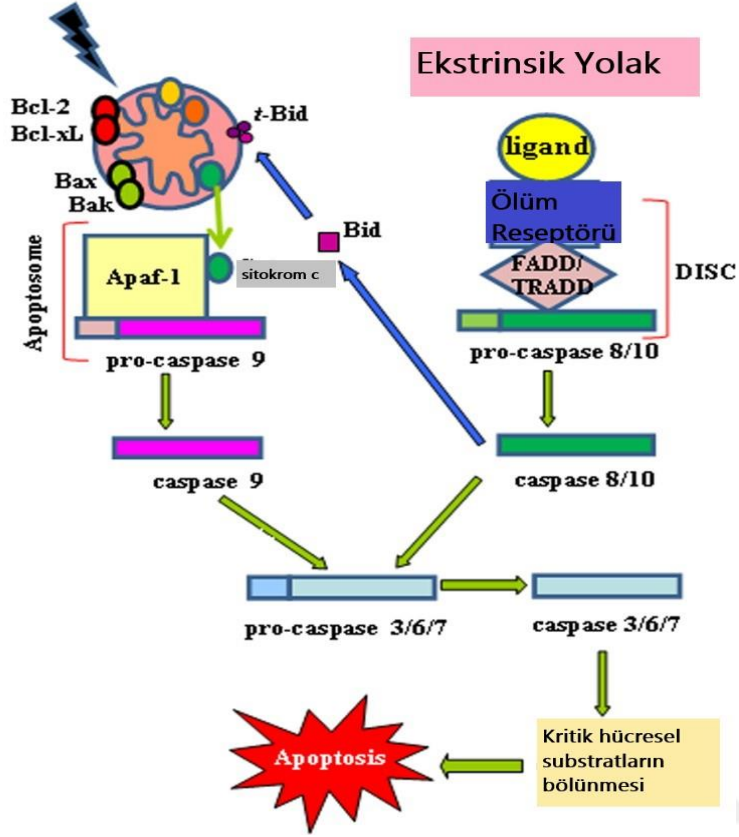
apoptojenik faktörler mitokondri membranlarından sitozole yayılır. Mitokondriye bağlı ölümü aktive etmede çok önemli bir rol oynayan Sitokrom c; sitozolik Apaf-1'e (apoptoz proteaz aktive edici faktör-1) bağlanarak aktive eder ve Prokaspaz-9'un katılmasıyla sitozolde Apoptozom denilen bir kompleks oluşur. Apoptozom Kaspaz-9'u aktifleştirir ve Kaspaz-9 da efektör kaspazları (Kaspaz -3, -6, -7) aktive ederek kaspaz şelalesinin tetiklenmesini sağlar. Sonra; SMAC/DIABLO ve Omi/HtrA2 proteinleri, kaspaz-3 ve kaspaz-9'u inaktive edebilen apoptoz proteini inhibitörlerinin (IAP) baskılayıcı etkisini kaldırarak kaspazların aktivasyonuna katkıda bulunur. Kaspaz zincirinin son basamağında ise sitozole salınan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G, DNA parçalanması ve kromatin yoğunlaşmasına neden olurlar.

2.6.1.2. Ekstrinsik Yol

Ekstrinsik apoptotik yol (ölüm reseptörüne bağımlı), tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesine ait ölüm reseptörlerinin, hücre zarı yüzeyinde yer alan TNF (Tümör Nekroz Ailesi) ligandlarının aktifleşmesiyle başlar. Ölüm reseptörlerine (FAS, TNFR1, DR5) ölüm ligandlarının (Apo1L, CD95L, TRAIL, FasL, TNFalfa) bağlanmasıyla hızlı bir şekilde “ölümü indükleyen sinyal kompleksi” (DISC; death-inducing signaling complex) adı verilen yapı oluşur. Bu aşamadan sonra aktif hale gelen kaspaz-8 ya doğrudan ya da Bid'i keserek kaspaz-9 üzerinden dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktiflenen kaspaz-3, kaspaz aktive edici DNaz (CAD) aktivasyonu ile DNA'nın alt birimlerine fragmente olmasına neden olur (42).

İntrinsik Yolak

Stres sinyali



Şekil 2.5. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar

2.7. Bcl-2 Ailesi

1993 yılında Bcl-2 ailesinin ilk proapoptotik üyeleri rapor edilmiştir. Bcl-2 mitokondri, endoplazmik retikulum, nükleer membranlarda ve reaktif oksijen türlerinin oluşum bölgelerinde lokalize olur (43). Bcl-2 proteinleri mitokondri zarındaki iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparak mitokondriyal hasarı engeller. Apoptozis sürecinde yolların kesiştiği temel nokta mitokondridir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör ise Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkili iki gruptan oluşur. Bunlardan bazıları apoptoz inhibitörü olan antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Bcl-2L, Bcl-2S, Mcl-1 gibi) bazıları ise apoptozu uyaran proapoptotiktir (Bax, bad, bak gibi)(44). Özellikle pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2, sitokrom C salınımı ve ardından kaspaz proteininin aşağı akış aktivasyonu için önemlidir (45).

Çizelge 2.1. Apoptozu regüle eden proteinler (39).

<i>Antiapoptotik Proteinler</i>	<i>Proapoptotik Proteinler</i>
Bcl-2	BAX
BclxL	BAK
Bcl-w	BAD
Mcl-1	Bcl-xS
c-Abl	p 53
Rb	c-Fos, c-Jun

Bcl-2 ailesinin en bilinen etki mekanizması Sitokrom c ve AIF (Apoptozu Başlatan Faktör) gibi maddelerin mitokondriyal porlardan geçiş permeabilitesini düzenlemesidir. Bcl-2 bu porlardan geçişi inhibe ederken Bcl-2 ‘nin proapoptotik üyeleri (Bax ve Bak) Sitokrom c ve AIF salınımını arttırmaktadır. Sitokrom c’nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahip antiapoptotik proteinler, kanser oluşum sürecinde aşırı eksprese olmaktadır (46).

Bcl-2 protein oranındaki artışın, tümör hücrelerindeki radyasyon ve çeşitli anti-kanser ilaçlarının neden olduğu hücre ölümlerini önlediği görülmüştür. Androjene duyarlı insan prostat kanseri hücre dizisinin (LNCaP) kullanılarak yapıldığı gen transfer deneylerinde, bcl-2 aşırı ekspresyonunun in-vivo tümör oluşumuna izin verdiği gösterilmiştir. Bu gözlemler ele alındığında, bcl-2 protein seviyelerinin prostat kanserinin kemoterapiye zayıf yanıtlarla karakterize olan metastatik ve hormona duyarsız bir duruma ilerlemesine neden olacağını düşündürmektedir(47).

2.8. Bax

Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bax proteinleri proapoptotiktir ve bir kez devreye girdiklerinde hücreyi apoptoza yönlendirirler. Bax proteinleri aktivasyonu sonrasında mitokondriyal Sitokrom c salınır, kaspaz aktivasyonu başlar ve hücre sel bozulma ile sonuçlanır(48).

Bax ekspresyonu prostatın epitel hücrelerindedir. Androjen yoksunluğunun neden olduğu apoptoza daha duyarlıdır. İn vivo çalışmalar Bax yukarı regülasyonunun, androjen yoksunluğunda geçici olarak apoptozu indüklediğini göstermektedir(49).

2.9. Kaspaz-3

Apoptozu başlatan bazı hücre içi ve hücre dışı sinyallerle, hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktif olur. Bu proteazlara kaspaz (caspase= cysteine-containing specific proteases) adı verilir. İnsan hücrelerinde 10'dan fazla kaspaz tespit edilmiştir(50).

Proteaz sınıfının önemli bölümünü oluşturan kaspazlar, aktif merkezlerinde sistein amino asiti içeren öncül enzim formunda bulunurlar. İçerdikleri sistein amino asiti sayesinde substratlarına nükleofilik saldırılar yaparak, her aspartik asit kalıntısından sonraki peptit bağlarının parçalanmasına neden olurlar. Kaspazlar, aktif olmayan proenzimler olarak sentezlenir ve aktif enzimi üretmek için bir aspartat kalıntısından sonra seçici olarak bölünürler. Aktive edildiklerinde, efektör kaspazlar çok çeşitli hücresel hedefleri parçalayabilirler ve nihayetinde prostat kanseri hücreleri, diğer tümör hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde apoptoza neden olurlar (51).

Aktif kaspazların hücresel prosesler üzerinde birçok etkileri vardır.

- a) Aktif kaspaz-9: kaspaz-3 ve kaspaz-7 nin nükleusa girebilmeleri için nükleer porlara zarar verir ve genişlemesine yol açar.
- b) Nükleus içine giren kaspaz-3 ise DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive eder. ICAD (İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz)'yi iki yerinden bölerek inhibitör alt birimini bozarak ve nükleozomlar arasındaki DNA'yı böler.(46).

Oksidatif stresin neden olduğu apoptoz, mezenterik iskemide önemli rol oynar. Apoptotik cisimler olarak adlandırılan hücre içi fragmanlar, nükleer kromatinin parçalanması ve kaspazların protein ailesini aktive eden sitoplazma ve çekirdeğin büzülmesiyle oluşur. Bu nedenle kaspaz 3, erken apoptotik faz için bir işaretleyici olarak kullanılır (52). İmmunohistokimyasal boyama yöntemiyle apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığı belirlenebilir ve bu şekilde apoptotik hücreler tespit edilir (53).

2.9.1. Apoptozisin Prostat Kanseri ile İlişkisi

Malign hastalıklar, genel olarak kontrolsüz ve aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Kanserin büyümesi, hücre proliferasyon hızının hücre

ölümü hızından daha büyük olduğu durumlarda devam eder (38). Apoptotik yolaklardaki kusurlar, genetik anomalikleri olan hücrelerin hayatta kalmasına izin verir. Kansere tedavilerinin etkinliği apoptotik mekanizmayı indükleyerek hücre hasarına yol açmasından ileri gelir(54). Son zamanlarda, apoptoz sinyalleme sistemlerinin yeni antikanser ajanların geliştirilmesi için umut verici hedefler sağladığı gösterilmiştir (55).

Apoptozis, fonksiyonel olarak bozulmuş hücrelerin ortadan kaldırılması için pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin zıt etkileşimleriyle düzenlenen programlanmış hücre ölümüdür. Dış yolak hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri tarafından başlatılırken; iç yolak stres, yetersiz sitokin desteği, farklı tipte hücre içi hasarlar gibi olaylar tarafından uyarılır. Ancak, bu iki yolak, efektör kaspazların etki noktasında birleşir. Bir diğer deyişle, apoptozisin içsel ve dışsal yollarında mitokondriyal aktivasyon kesişim basamağıdır. Bundan dolayı, sitokrom C'nin dış mitokondri zarından sitozole salınması ile meydana gelen mitokondriyal aktivasyon apoptotik süreçte çok önemli bir mekanizmadır. Bcl-2 ailesi üyeleri, hem apoptotik hem de anti-apoptotik proteinleri içerir ve apoptozun temel mitokondriyal yolağını düzenler. Bcl-2 protein ailesi apoptozu inhibe eden (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, gibi) veya aktive eden (Bax, Bak, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma, Hrk gibi) birbirleri ile yüksek oranda yapısal homoloji gösteren proteinlerden meydana gelmiş bir ailedir. Sensitizör proteinler (Bad, Bim, Bid, Noxa, Puma, Hrk) hasar sensörleri olarak davranırlar ve stres sinyali gelmedikçe inaktif formdadır. Eğer sensitizör Bcl-2 proteinleri aktive olmazsa, apoptoz başlamaz. Bu sinyal ağı, yeni gelişmekte olan apoptotik ajanların hedeflediği bir tedavi stratejisidir(56). Yapılan bir çalışmada xenograft fare modelinde, dosetaksel ve ABT-737 kombinasyon terapisinin önemli ölçüde PC3 tümör büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. ABT-737; Bcl-2 ailesi üyelerini inhibe etmek için geliştirilmiş küçük moleküllü bir ilaçtır. Ayrıca PC3 hücrelerinde Bcl-xL inhibisyonu ile, dosetaksel dirençli PK hücrelerini dosetaksele karşı duyarlı hale getirdiği ve kaspaz-8 aktivasyonuna bağlı apoptosisi kolaylaştırdığı görülmüştür(57).

2.9.2. Apoptozisin Dexpanthenol ile İlişkisi

Pantotenik asit ve türevlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından üretilen hücre hasarına ve membran hasarına karşı güçlü bir protektif etkisi vardır. Pantotenik asit ile indirgenmiş türevi pantotenol CoA'nın öncüleridir ve bu bileşiklerle ön

inkübasyondan sonra Ehrlich asit tümör hücrelerinde Koenzim A seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle, hücre ve doku hasarına karşı pantotenik asit ve bazı türevlerin gösterdiği koruyucu etkilerinin, CoA ve glutatyon biyosentezinin uyarılmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Pantotenik asit ile ön inkübe edilen hücrelerde glutatyon içeriğinin arttığı ve apoptozun önlendiği veya önemli ölçüde geciktirildiği bulunmuştur(58). İnsan lösemik lenfositlerinin (Jurkat Hücreleri) UV ile indüklendikten sonra lipid peroksit ürünü olan konjuge dienlerde artış gözlenmiştir. Jurkat hücreleri Pantotenik asit ile 3, 6 ve 9 saat inkübasyon sonrası konjuge dienlerde azalma ve Hoechst boyama yöntemi sonucu apoptotik hücre oranında azalma gözlenmiştir. Ayrıca pantotenik asit ve türevlerinin kalp karaciğer gibi dokularda iskemiyle oluşturulan hasara karşı koruyarak apoptozu azalttığı bilinmektedir(58).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü fizyolojik ve patolojik olayların araştırılması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ,hücre ölüm olaylarının aydınlatılabilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızdaki Prostat kanseri hücre hatları (PC-3) (ATCC® CRL1435) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir.

3.2. Kültür İçin Yapılan Hazırlıklar

Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) 500 ml solüsyonu içine 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), 5 ml L-Glutamine (Hyclone), 5 ml Penisilin/streptomisin (Hyclone), eklenerek besiyeri hazırlandı. Pipetle birkaç kez çekilip bırakılarak ortamın homojen olması sağlandı ve +4°C ' de saklandı.

3.3 Hücrelerin Ekimi ve Yaşatılması

Temin edilen ATCC insan prostat kanser hücre hattı (PC-3), kriyotüpler içinde muhafaza edildikleri (-80°C) derin dondurucudan çıkarılarak 37°C deki steril su banyosunda kısa sürede çözündürüldü ve olası kontaminasyonu önlemek için tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar akımlı steril bir kabinde işleme tabi tutuldu. Tüp içerisindeki hücreler, içinde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin olan hücre üremesine uygun DMEM besi ortamı ile hücre kültürü üretme kabına (flask) yerleştirildi, Laminar kabinden alınarak 37°C'deki %5 CO₂ ortamındaki etüvde inkube edildi. Daha sonra İnsan prostat kanseri hücre hattı PC-3 hücreleri hazırladığımız mediumla steril polisitren hücre kültürü flasklarında (Corning) DMEM, %10 FBS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika 5 dakika döndürüldü. Üstteki medium atılarak dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekilerek 37 °C, %5 CO₂ ve %100 nem içeren inkübatöre kondu. İnkübatörde bulunan flasklar, kuluçka süresince inverted mikroskop ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları gözlemlendi. Eskiye besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak, yeni besiyerle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra deneye alındı.

3.4. Hücre Sayısının Belirlenmesi

Tripan mavisıyla boyama yönteminde ölü hücreler tripan mavisini ile boyanırken, canlı hücreler hücre zarları sağlam olduğu için boya ile boyanmamaktadır. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekildi. Hank's balanced salt solution (HBSS) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda kalan hücreler 5 dakika %0,25 tripsin ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve 1200 devir/dk'da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte alan sıvı kısım atıldı Hücrelerin sayılması için 10 µl hücre süspansiyonu 90 µl Tripan Mavisini boyasıyla (Sigma-Aldrich) karıştırılarak mikroskop altında sayım yapıldı. Tripan Mavisini ile boyama yöntemi canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırmada kullanılmakta olan bir yöntemdir. Ölü olan hücrelerin hücre zarları zarar gördüğü için boyayı hücre içine alırken, canlı olan hücreler hücre zarları zarar görmemiş olduğu için boya hücre içine giremez. Bu yöntem sayede canlı olan hücre sayısı ve canlılık yüzdesi belirlenebilir. Hemositometredeki dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon katsayısı x 10^4 ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra %10 serum ve %1 antibiyotikli DMEM medyum ile homojenize edildi ve her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri içerisinde 1×10^5 hücre gelecek şekilde 24 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. 37°C sıcaklıkta ve %5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edildi. Daha sonra bu hücreler 48 saat 3mM dekspantenol ile muamele edildi.

3.5 Dekspantenol Konsantrasyonunun Hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan ve toz halde bulunan Dekspantenol'ün (Sigma-Aldrich) Moleküler formülü C₉H₁₉NO₄, moleküler ağırlığı ise 205.2515 g/mol'dür(59). Stok konsantrasyonu 3mM olacak şekilde 61,5754mg dekspantenol, hazırladığımız stok medyumdan aldığımız 100 ml medyum çözeltisinde çözdürüldü

3.6. Hücre Homojenizasyonu

Dekspantenol ile muamele edilen hücrelerden medium uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için hücre sıyrıcısı kullanılarak 15 ml tüplere (falkon) alındı. Hücrelerin üzerine 30µl PMSF (fenylmetanesulfonilfluoride), 30µl sodyum vanadat, 30µl proteaz

inhibütörü içeren 3µl RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer eklendi ve ultrasonik parçalama cihazıyla buz üzerinde 5 dk bekletildi. Böylece hücreler parçalanarak homojenatlar elde edildi ve lizise uğramış hücreler başka bir tüpe alındı, Homojenatlar 10.000 RPM’de 10 dakika santrifüj edilip üstte süpernatantlar dikkatlice bir Ependorf tüpe alınarak hücre lizatı –80 °C’de çalışılncaya kadar (5 gün) saklandı. Ve alttaki pelletler atıldı. Protein analizleri için ELISA Kiti (Cloud-Clone Corp) kullanıldı.

3.7. Protein Miktar Tayini

Homojenize edilmiş hücrelerin protein miktar tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Sığır serum albumini (1µg/ml) kullanılarak 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10 (µg/ml) konsantrasyonlarda standart hazırlanıp her bir örnekten 10 µl alınarak distile su ile 100 µl’ye tamamlandı. Standart ve örneklerin üzerine 1ml Bradford solüsyonu eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 595 nanometre dalga boyunda absorbans miktarları manuel olarak ölçüldü. Prism programında çizilen standart eğriye göre protein miktar tayini µg/µl cinsinden hesaplandı ve protein miktar tayini ELISA deneylerinin standardizasyonu için yapıldı.

3.8. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Testi

Kaspaz-3, bax ve bcl-2 pg/ml cinsinden protein düzeyleri ELISA testi ile incelendi. Ölçümler ELISA yöntemiyle aşağıda bulunan kit (Cloud-Clone Corp.) deney protokollerine uygun olarak yapılmıştır.

3.9. ELİSA Bax Protein Miktar Tayini

Çalışmamızda kullanılan kit (SEB343Hu, Cloud-Clone Corp.) insan serumu, plazma, doku homojenatları, hücre lizatları hücre kültürü süpernatları ve diğer biyolojik sıvılarda Bax’ın invitro kantitatif ölçümü için bir sandviç enzim immün testidir. Kit içerisinde bulunan 100 µl numune dilüenti üzerine homojenatlardan 100’er µl elisa kuyucuklarına eklendi 10 saniye vorteksle karıştırılarak dilüe edildi. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenerek 1 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Yıkama

sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Son olarak da 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek bax enziminin miktarları tayin edildi.

3.10. ELİSA Bcl-2 Protein Miktar Tayini

Çalışmamızda kullanılan kit (SEA778Hu, Cloud-Clone Corp.) insan serumu, plazma, doku homojenatları, hücre lizatları hücre kültürü süpernatları ve diğer biyolojik sıvılarda Bcl-2’nin invitro kantitatif ölçümü için bir sandviç enzim immün testidir. Kit içerisinde bulunan 100 µl numune dilüenti üzerine homojenatlardan 100’er µl elisa kuyucuklarına eklendi 10 saniye vorteksle karıştırılarak dilüe edildi. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenerek 1 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenip 1 saat 37°C’de inkübe edildi. daha sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Son olarak da 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek bcl-2 enziminin miktarları tayin edildi.

3.11. ELİSA Kaspaz-3 Protein Miktar Tayini

Çalışmamızda kullanılan kit (SEA626Hu, Cloud-Clone Corp.) insan serumu, plazma, doku homojenatları, hücre lizatları hücre kültürü süpernatları ve diğer biyolojik sıvılarda Kaspaz-3’ün invitro kantitatif ölçümü için bir sandviç enzim immün testidir. Kit içerisinde bulunan 100 µl numune dilüenti üzerine homojenatlardan 100’er µl elisa kuyucuklarına eklendi 10 saniye vorteksle karıştırılarak dilüe edildi. Kuyucukların üstü aliminyum folyo ile kapatılıp 2 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerine 100 µl reaktif A solüsyonu eklenerek 1 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponuyla yıkandı, yıkama sonunda kuyucuklara 100 µl reaktif B solüsyonu eklenerek 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 5 kez yıkama tamponuyla yıkanarak içerisine 90 µl substrat solüsyonu

eklenip üstü kapatılarak 30 dakika inkübe edildi. Son olarak da 50 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm’de mikropate okuyucuda kuyucukların optik dansiteleri belirlenerek kaspaz-3 enziminin miktarları tayin edildi.

3.12. Sitotoksisite (MTT) Testi

Hücre proliferasyonu ve sitotoksisite tayini metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) metodu ile yapıldı. Hücrelerin dekspantenol ile muamele edildiği 48 saat sonunda, her kuyucukta 100 µL hücre homojenatı olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara aktarıldı. Daha sonra 100 µL hücre homojenatı bulunan her kuyucuk üzerine 10 µL MTT solüsyonu eklendi. Bu solüsyon ilavesinden sonra 96’lık plak inkübatöre alınarak 37°C’de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonu yapılan hücrelerde MTT solüsyonunun yapay kromojenik ürünü olan formazon kristalleri oluştu. Bu kristalleri çözmek için her kuyucuğa 100’er µL dimetil sülfoksit eklenerek 37°C’de CO² inkübatöründe 10 dk bekletildi. Sitotoksik düzeyi belirlemek için otomatik mikropate okuyucu ile her bir kuyucuk 570 nm dalga boyunda okutuldu.

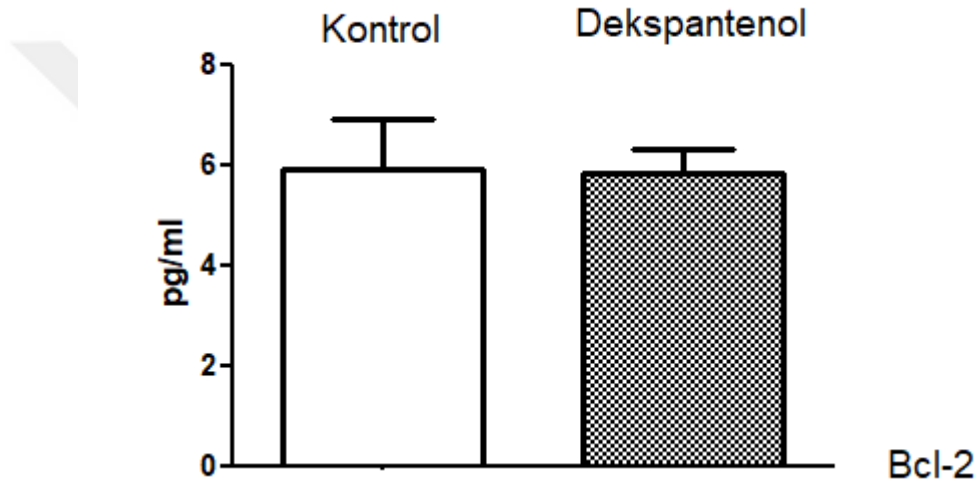
3.13. Bulguların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Elde edilen bulgular, istatistiki anlamda ortalama±standart hata şeklinde değerlendirildi. Bulguların istatistiksel olarak analizi ve karşılaştırmalar için örneklerden elde edilen veriler student *t* testi kullanılarak standart hataları ile birlikte ($\pm$ SEM) gösterildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar sonucu 0,05 ‘den büyük *p* değerlerinin anlamlı olmadığı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. ELİSA Bcl-2 Enzim Miktar Tayini

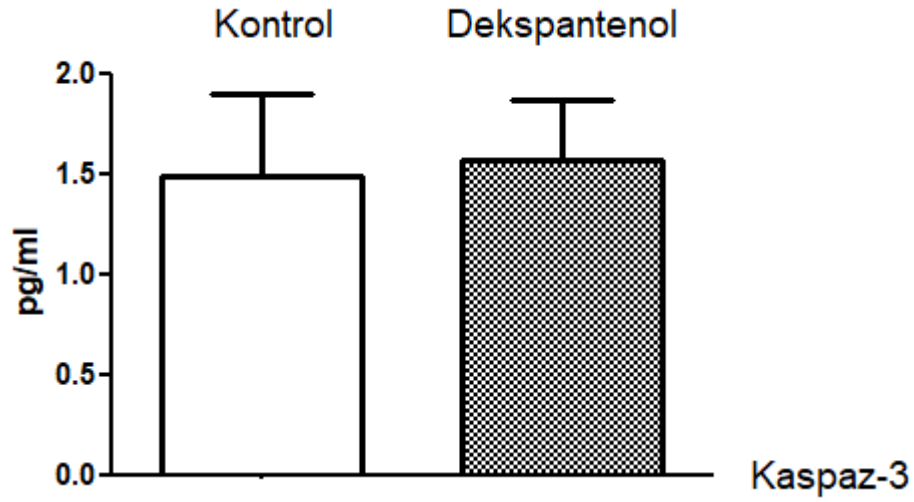
PC-3 hücrelerine 48 saat süre boyunca 3mM dekspantenol uygulaması sonucunda ölçülen bcl-2 protein miktarı 5.833 µg/ml ve kontrol grubunda ise 5.917 µg/ml bulundu. p değeri ise 0.9409 olarak hesaplandı. Prostat kanser hücrelerinin Dekspantenol ile tedavisi, anti-apoptotik protein olan bcl-2'nin expresyonunu kontrole kıyasla anlamlı olarak azaltmadı. ($p>0,05$)



Şekil 4.1. Dekspantenol'ün prostat kanseri hücrelerindeki bcl-2 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student t test (Kontrole göre $p>0,05$).

4.2. ELİSA Kaspaz-3 Enzim Miktar Tayini

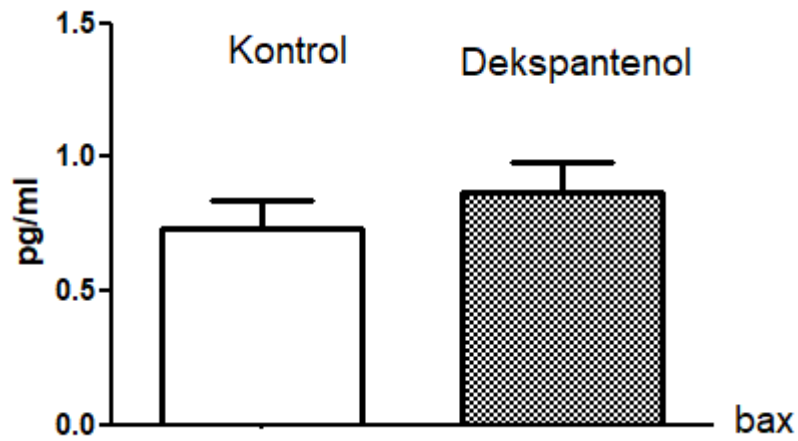
PC-3 hücrelerine 48 saat süre boyunca 3mM dekspantenol uygulaması sonucunda ölçülen kaspaz-3 protein miktarı 1.567 µg/ml ve kontrol grubunda ise 1.485 µg/ml bulundu. p değeri ise 0.8753 olarak hesaplandı. Prostat kanser hücrelerine dekspantenol uygulaması, kaspaz-3 protein miktarını kontrole kıyasla anlamlı olarak artırmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.2. Dekspantenol'ün prostat kanseri hücrelerindeki kaspaz-3 proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student t test (Kontrolle göre $p>0.05$).

4.3. ELİSA Bax Protein Miktar Tayini

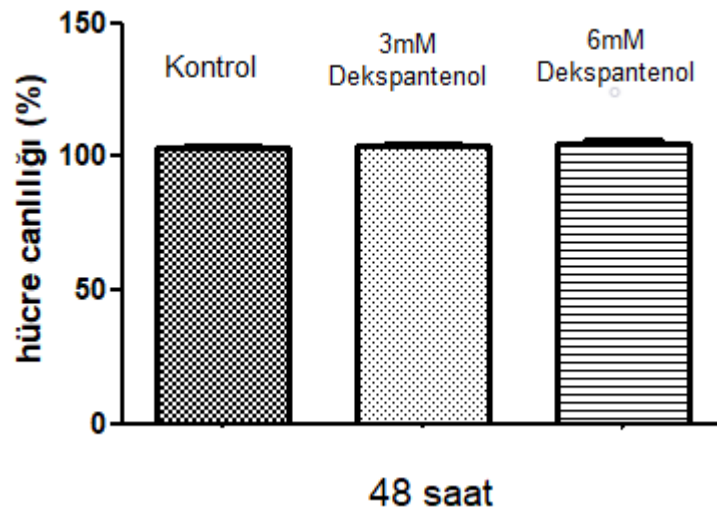
PC-3 hücrelerine 48 saat süre boyunca 3mM dekspantenol uygulaması sonucunda ölçülen bax protein miktarı 0.8667 $\mu\text{g/ml}$ ve kontrol grubunda ise 0.7333 $\mu\text{g/ml}$ bulundu. p değeri ise 0.4054 olarak hesaplandı. Hücrelere dekspantenol uygulaması kontrole kıyasla bax proteinini anlamlı olarak artırmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.3. Dekspantenol'ün prostat kanseri hücrelerindeki Bax proteinine etkisi (n=6). İstatistiksel analiz: student t test (Kontrolle göre $P>0.05$).

4.4. Sitotoksosite Bulguları

Hücre proliferasyonu ve sitotoksosite tayini metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) metodu ile yapıldı. Hücrelerin 3mM ve 6 mM dekspantenol ile muamele edildiği 48 saat sonunda elde edilen yaşayan hücre oranları kontrol grubunda %103 ve 3mM dekspantenol uygulamada %104.3 ve 6mM dekspantenol uygulamada %104.7 bulundu. Sonuç olarak, dekspantenol prostat kanseri hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla çoğalmasını değiştirmemiştir.



Şekil 4.4. Dexpentanol'ün prostat kanseri hücrelerindeki sitotoksosite etkisi

Çizelge 4.1. Dekspantenol'ün Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon üzerindeki etkileri

	Kontrol (ortalama±standart hata)	Dekspantenol (ortalama±standart hata)
Bcl-2	5.917 ± 0.9867 pg/ml	5.833 ± 0.4773 pg/ml
Bax	0.7333 ± 0.1022 pg/ml	0.8667 ± 0.1145 pg/ml
Kaspaz--3	1.485 ± 0.4123 pg/ml	1.567 ± 0.2951 pg/ml

5. TARTIŞMA

İnsan prostat kanseri hücrelerinin dekspantenol ile muamele edildiği çalışmamızda, proapoptotik olan bax ve antiapoptotik olan bcl-2 protein düzeyleri ile proteolitik enzim grubundaki kaspaz-3 protein düzeyleri incelendi. Dekspantenolün bu protein düzeylerini istatistiksel olarak değiştirmedeği ve hücre içi apoptotik yollara etkisinin olmadığı tespit edildi.

Prostat karsinomu erkek cinste en çok görülen internal malignitedir. Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı hücre çoğalması yanında azalmış apoptozis de prostat kanseri başlangıcı veya ilerlemesinden sorumlu olabilmektedir. Apoptoz tümör baskılayıcı kilit bir mekanizmadır. Son zamanlarda apoptozun kanser progresyonunda önemli bir rolü olduğu bilinmekte ve çalışmalar yapılmaktadır. Belirli kemoterapotik ajanların çeşitli apoptotik yollardaki reseptörleri etkileyerek apoptozu indükledikleri bilinmektedir. Dekspantenolün ise apoptotik etkilerinin araştırılmasına karşılık kanser hücresindeki apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkisi yeterince çalışılmamıştır. Günümüzde kanser tedavisinde sitotoksikler ve radyoterapi kullanılmaktadır. Etki mekanizmaları hücre hasarına dayanan sitotoksik ilaçların, tümör hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelere de ciddi zarar vermesi kanser tedavisinde yeni terapotik ajanları arama gereksinimi oluşturmuştur.

Çalışmamızda tercih edilen Dekspantenol, pantotenik asidin biyolojik olarak aktif formudur ve antioksidan özelliği vardır. PA; CoA, hücredeki ATP sentezi ve oksidatif stresin indüklediği lipid peroksidasyonuna karşı önemli bir koruyucu olan redükte glutatyon (GSH) artışına neden olur. Yapılan bir çalışmada Dekspantenol; LPS (lipopolisakkarit) ile indüklenen akut akciğer hasarı sonucu akciğer ödemi ve vasküler sızıntıyı azalttığı akciğer dokularındaki oksidatif stres hasarının iyileşmesini sağlayarak koruyucu etkisi yaptığı gösterilmiştir. ALI fare modelinde LPS inhalasyon sonucu bronkoalveolar lavajdaki artan TNF- α ve IL-6 inflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı, GSH seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Li-Mei ve ark, 2016).. Dekspentanolün oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkisi ve antiinflamatuvar etkisi; ROS oluşumuna yol açan karsinogenlere karşı, apoptotik sinyal yollarına etki ederek tümör oluşumunu ve gelişimini etkileyebilir

İnsan lösemik lenfositlerinin (Jurkat Hücreleri) UV ile indüklenerek Pantotenik asit ile inkübasyonu sonucu glutasyon düzeylerinde artış, Hoechst boyama yöntemi sonucu apoptotik hücre oranında kısmen azalma gözlenmiştir (Slyshenkov ve ark. 2000). Bu çalışmalara karşılık oksidatif hasar görmüş sağlıklı hücrelerde Dekspanthenolün koruyucu rolü olmakla beraber oksidatif hasar görmüş tümör hücrelerinde ise apoptozu azalttığından bahsedilmiştir. Fakat dekspantenolün direkt kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri açık değildir. Son zamanlarda antioksidanların kanser tedavisinde etkinliğinin araştırıldığı bir çok çalışma mevcut olması, Dekspantenolün hem antioksidan hem de apoptotik etkisinin tartışma konusu olması çalışmamızı seçmemizde etkili olmuştur. Dekspantenolün bu etkilerini araştırmak için yaptığımız çalışmamızda incelediğimiz kaspaz-3, efektör kaspazlar grubuna dahil olup hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalayarak tipik DNA fragmentasyonuna neden olan apoptozu indükleyen proteindir. Çalışmamızda PC-3 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonundan sonra 3mM dekspantenol ile tedavide Kaspaz-3 ekspresyonu, kontrole kıyasla prostat kanserinde önemli ölçüde arttırmamıştır ($p > 0.05$). Bcl-2/Bax proto-onkogen ailesinin intrinsik apoptozu (mitokondriyal yol) hem baskılayan hem de indükleyen kritik düzenleyicileridir. Pro-apoptotik Bax proteinleri, mitokondri zarına bağlanırlar. Bu bağlanma mitokondrinin, seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltır ve Sitokrom c sitoplazmaya geçer. Sitokrom c apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9 un aktive olmasını sağlar ve bir dizi kaspaz aktivasyonu başlar. Bcl-2/Bax oranı hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax fazla ise hücre apoptoza gidecektir, bcl-2 fazla ise apoptoz inhibe olacaktır. Çalışmamızda ise Bcl-2/Bax oranı hücreyi apoptozu götürecek düzeyde düşük çıkmamıştır.

Bizim çalışmamız dışındaki bir çalışmada dekspantenol gibi antioksidan etkili olan Lübnan adaçayı türlerinin Prostat kanser hücreleri üzerindeki tedavisi incelenmiştir. (DU-145) insan prostat kanser hücre hattının antioksidan etkili Lübnan adaçayı türlerinden (Salvia aurea, Salvia judaica ve Salvia viscosa) elde edilen esansiyel uçucu yağların aktif bileşenleriyle muamele edilmesinden sonra Western Blot analizi sonucunda bizim çalışmamızda incelediğimiz apoptotik yollardaki Bcl-2 ekspresyonunda azalma, Bax protein düzeylerinde ve Kaspaz-3 enzim aktivitesinde bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar elde edilen esansiyel yağların prostat kanseri

hücrelerinin büyümesini azaltabildiğini, mitokondriyal apoptotik süreci aktive edebildiğini göstermektedir (60).

Yapılan başka bir çalışmada antioksidan olarak bilinen selenyumun bir formu olan metilseleninik asit (MSA), insan prostat kanser hücre hattının (DU-145) sitotoksik olmayan dozlarda H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile maruz bırakılmasından sonra Anneksin V (yeşil floresans) ve propidyum iyodür'ün (kırmızı floresans) boyama yöntemiyle oksidatif DNA hasarlı hücrelerdeki apoptozu daha çok tetiklediği gözlenmiştir. Selenyum antioksidan ve hücre yapısını koruyucu etkisinin yanında DNA hasarlı hücrelerde apoptozu indüklemesi “Homeostatik ev temizliği” terimiyle açıklanabilmektedir. Farklı bir şekilde ifade edilirse hasar görmemiş hücreleri korurken hasarlı hücrelerde apoptozu artırarak hücre homeostazını teşvik etmesiyle anti-kanser yeteneğinin olduğu düşünülmektedir (61). Metilseleninik asitin de çalışmamızda kullandığımız dekspantenol gibi antioksidan etkili olması ve prostat kanser hücrelerindeki oksidatif hasar sonucu ROS oluşumuna karşı apoptozu daha fazla tetiklemesi, antioksidanların kanser tedavisine bilimsel destek sağlamak için kanser hücrelerindeki apoptotik mekanizmaların araştırılabileceğini düşündürmektedir.

Daha önceden yapılan bir çalışmada nitroksit radikali olan Tempol (TPL), klinik olarak genellikle bir antioksidatif ajan olarak kullanılırken, TPL'nin yumurtalık kanseri hücrelerinde (OVCAR3) apoptoz indüksiyonu üzerinde antikanser ilacı olan sisplatinin (DDP) etkisini arttırmadaki rolü araştırılmıştır. Western Blot analiziyle; kombinasyon tedavinin, tek başına DDP ile tedaviyle kıyaslandığında Bcl-2:Bax ekspresyon oranını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. MTT ile ölçülen OVCAR-3 hücreleri için canlılık testi sonucunda hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Belirtilen bu veriler OVCAR3 hücrelerinde TPL'nin DDP'nin apoptozu indüklemesi üzerindeki etkisini arttırdığını göstermektedir (62).

Sonuç olarak yukardaki araştırma bulgularına göre dekspantenolün normal hücrelerdeki oksidatif hasarı azalttığı, oksidatif hasar görmüş tümör hücrelerinde apoptoz oranını kısmen azalttığı, birçok antioksidanların ise kanser hücrelerinde apoptotik sinyal yollarını uyararak apoptozu arttırdığı belirtilmiştir. Son çalışmalarda karsinogeneze karşı normal dokulara zarar vermeyen ve özellikle tümörlü hücrelerde apoptozu indükleyen tedavi edici ajan olarak antioksidanlar dikkat çekmektedir. Apoptoz indüksiyonu, kanser tedavisinin temelidir. Apoptozdaki kusurlar malign

transformasyonu ve tümör gelişimine neden olmasının yanı sıra sitotoksik kanser tedavilerine direnç geliştirebilir. Bu nedenle apoptoza neden olan moleküler yolların keşfedilmesi kanser tedavisindeki yeni arayışlar için önemlidir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Malign hastalıklar, aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinmektedir . Azalmış apoptozis, otoimmün hastalıklar ve birçok kanser türü için karakteristiktir. Kemoterapide, sitotoksik ilaçların normal dokulara da ciddi zarar vermesi sorunu; sağlıklı dokulara zarar vermeyen ve toksik olmayan maddelerin araştırılmasına ihtiyaç göstermektedir. Özellikle son çalışmalarda tümörlerin gelişim sürecinde antioksidan etkili doğal ilaçların uygulanmasıyla meydana gelebilecek apoptotik sinyal yolları incelenmesi ve kanser tedavisine etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda PC-3 prostat kanser hücrelerinin Dekspantenol ile tedavisinde kanser hücrelerinin çoğalmasını değiştirmediği, apoptozu indüklediği ve hücre içi apoptotik yollar üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Toivanen R, Shen M. Prostate organogenesis; tissue induction, hormonal regulation and celltype specification. Development. 2017;144(8):1382-98.
2. YILDIZHAN E. Prostat Kanseri Tanısında Rektal Muayene PSA ve TRUS Ssonuçlarının TRUS-biyopsi Sonuçları ile Karşılaştırılması [Uzmanlık]. Ok Meydanı EAH Radyoloji Kliniği/İstanbul2006.
3. Cox A. JM, Persad R. Prostate Structure and Function. 3 ed. Aboumarzouk OM, editor2019. 509-21 p.
4. Lee C, Akın-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of Prostate Anatomy Histology and Pathology. Endocrinol Metab Clin N Am. 2011;40:565-675.
5. A. Viliersa, A. Stegb, Boccon-Giboda L. Anatomy of the Prostate: Review ofthe Different Models. European Urology. 1991;20(4):261-8.
6. Simon W. Hayward GRC. The Prostate: Development and Physiology. 2000;38(1):1-14.
7. Kosova F, Arı Z. Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi. 2011;2(1):124-31.
8. Brito J. What is The Prostate Gland? Medical News Today. 2020.
9. Jeffrey S. Ross CSF. Molecular Oncology of Prostate Cancer. 2007:36-41.
10. ÇELİK S. Prostat Kanseri Hastalarında Diyet ve Yaşam Stili/Recommendations of Diet and Lifestyle in Prostate Cancer Patients. Üroonkoloji Bülteni/Bulletin of Urooncology 2015;14:88-93.
11. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. World Journal of Oncology. 2019;10(2):63-89.
12. Barsouk A, Padala S, Vakiti A, Mohammed A, Saginala K, Thandra K, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. Medical Sciences 2020:8-28.
13. A. Torre, F. Bray, R. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tievent, Jemal AJ. A Cancer Journal for Clinicians. 2015;65:87.
14. Grozescu T, Popa F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. Journal of Medicine and Life 2017;10(1):5-12.
15. Nguyen-Nielsen M, Borre M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. Seminars in Nuclear Medicine. 2016;46(6):484-90.
16. Descotes J. Diagnosis of Prostate Cancer. Asian Journal of Urology. 2019;6(2):129-36.
17. Lee F, Littrup PJ, Torp-Peterson S, Mettlin C, McHugh T, Gray MJ, et al. Prostate Cancer: Comparison of Transrectal US and Digital Rectal Examination for Screening Radiology. 1988;168:389-94.
18. Önder AÜ. Prostat Kanseri Tanısında Prostat Spesifik Antijenin (PSA) Önemi. Türk Aile Hekimliği Dergisi 1998;2(2):76-9.

19. Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA. *Internal Medicine Journal*. 2014;433-40.
20. Pang B, Zhu Y, Ni J, Thompson J, Malouf D, Bucci J, et al. Extracellular vesicles: the next generation biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis. *Theranostics*. 2020;10(2):2309-26.
21. Mistry K, Cable G. Meta-Analysis of Prostate-Specific Antigen and Digital Rectal Examination as Screen Tests for Prostate Carcinoma. *Screening for Prostate Carcinoma*. 2003;16:95-101.
22. Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I. Topical Use of Dexpanthenol in Skin Disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2002;6:427-33.
23. Kulikov AU, Zinchenko AA. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of dexpanthenol in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;43:983-8.
24. Proksch E, Bony R, Trapp S, Boudon S. Topical use of dexpanthenol: a 70th anniversary article. *Journal of Dermatological Treatment*. 2017;28(8):766-73.
25. Safety Assessment of Panthenol, Pantothenic Acid, and Derivatives as Used in Cosmetics [Internet]. 2017. Available from: <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/PANTS012017.pdf>.
26. Miller JW, Rucker RB. Pantothenic Acid. International Life Sciences Institute 2020.
27. D. NG. Metabolic Functions of Pantothenic Acid. *American Physiological Society*. 1953;33:523-43.
28. Sewell AL, Villa MVJ, Matheson M, Whittingham WG, Marquez R. Fast and Flexible Synthesis of Pantothenic Acid and CJ-15,801. *Organic Letters*. 2010;13:800-3.
29. V. S. Slyshenkov, M. Rakowska, A. G. Moiseenok, Wojtczak L. Pantothenic acid and its derivatives protect ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995;19:767-72.
30. Wojtczak L, Slyshenkov SV. Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals – The role of glutathione. 2003;17:61-73.
31. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. . *Free Radic Res*. 2010;44(5):479-96.
32. Uysal HB, Dagli B, Yilmaz M, Kahyaoglu F, Gökçimen A, Omurlu IK, et al. Protective Effects of Dexpanthenol Against Acetaminofen-Induced Hepatorenal Damage. *Biomedical Research*. 2017;28(2):740-9.
33. Conklin KA. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants. *American Society for Nutritional Sciences J Nutr*. 2004;134:3201-4.
34. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008;19(1):55-63.
35. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*. 1998;138(5):482-91.
36. Celepli S, Bigat İ, Celepli P, Karagin PH. Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi *Güncel Gastroenteroloji*. 2020;24:103-11.
37. Elmore S. Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *National Institutes of Health*. 2007;35(4):495-516.

38. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of Programmed (Apoptotic) Cell Death During the Progression and Therapy for Prostate Cancer The Prostate. 1996;28:251-65.
39. Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apoptoz Fırat Tıp Dergisi. 2006;11(1):6-11.
40. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2003;23(6):499-508.
41. Sanmartín C, Plano D, Palop JA. Selenium Compounds and Apoptotic Modulation: A New Perspective in Cancer Therapy Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2008;8:1020-31.
42. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Anging Albany NY. 2016;8(4):603-19.
43. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: arheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. Seminars in Cancer Biology. 1993;4(6):327-32.
44. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L. Apoptozis Biyokimyası (Biochemistry of Apoptosis). Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2016;25(1):52-69.
45. Russo A, Cardile V, Graziano ACE, Avol R, Bruno M, Rigano D. Involvement of Bax and Bcl-2 in Induction of Apoptosis by Essential Oils of Three Lebanese Salvia Species in Human Prostate Cancer Cells. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(292).
46. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede Apoptoz ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejileri. Türk Kardiyol Dern Arş. 2008;36(2):120-30.
47. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, et al. Immunohistochemical Analysis of bcl-2, bax, bcl-X and mcl-1 Expression in Prostate Cancer. American Journal Pathology. 1996;148(5).
48. R. R. Zielinski, Eigl BJ, Chi KN. Targeting the Apoptosis Pathway in Prostate Cancer. The Cancer Journal &. 2013;19:79-89.
49. Khor L, Moughan J, Al-Saleem T, Hammond EH, Venkatesan V, A.Rosenthal S, et al. Bcl-2 and Bax Expression Predict Prostate Cancer Outcome in Men Treated with Androgen Deprivation and Radiotherapyon Radiation TherapyOncologyGroup Protocol 92-02. Imaging, Diagnosis, Prognosi. 2007;13(12):3585-90.
50. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;9(2):143-8.
51. Winter RN, A. Kramer, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of Caspase-1 and Caspase-3 Protein Expression in Human Prostate Cancer. American Association for Cancer Research. 2001;61:1227–32.
52. Y. F. Cagin, Atayan Y, Sahin N, Parlakpınar H, Polat A, Vardi N, et al. Beneficial effects of dexpanthenol on mesenteric ischemia and reperfusion injury in experimental rat model. Free Radical Research. 2016;50(3):354-65.
53. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;2:73-8.
54. A. G. Renehan, C. Booth, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? British Medical Journal/(Clinical Research Ed) (BMJ). 2001;322:1536-8.

55. Zhang Y, Liu K, Zhang Y, Qi J, Lu B, Shi C, et al. ABL-N may induce apoptosis of human prostate cancer cells through suppression of KLF5, ICAM-1 and Stat5b, and upregulation of Bax/Bcl-2 ratio: An in vitro and in vivo study. *Oncology Reports*. 2015;34(6):2953-60.
56. Karnak D, Xu L. Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins. *Curr Drug Targets* 2010;11(699-707).
57. Tamaki H, Harashima N, Hirak M. Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. *Oncotarget*. 2014;5:11399-412.
58. Slyshenkov VS, Piwocka K, Sikora E, Wojtczak L. Pantothenic Acid Protects Jurkat Cells Against Ultraviolet Light-Induced Apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000;30(11):1303-10.
59. <http://www.chemnet.com/cas/tr/81-13-0/Dexpantenol.html> [Internet].
60. Russo A, Cardile V, Graziano ACE, Avola R, Bruno M, Rigano D. Involvement of Bax and Bcl-2 in Induction of Apoptosis by Essential Oils of Three Lebanese Salvia Species in Human Prostate Cancer Cells. *International Journal Molecular Sciences*. 2018.
61. Chiang EC-C. Studies on the Mechanisms of the Prostate Cancer Protective Effect of Dietary Selenium: Purdue University; 2011.
62. Wang M, Li K, Zou Z, Li L, Zhu L, Wang Q, et al. Piperidine nitroxide Tempol enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Oncology Letters*. 2008;16(4):4847-54.

ÖZGEÇMİŞ

Selen Soytorun Yetkinel 1992 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamlayan Selen Soytorun Yetkinel, 2010 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bölümü’nü kazandı ve 2015 yılında mezun oldu. 2015-2017 yılları arasında Başkent Üniversitesi Dr. Turgut Noyan Eğitim ve Araştırma Hastanesinde kemoterapi ünitesinde çalışmış olup, 2017 yılında Adana Şehir Hastanesin’e atanarak YGAP Eczane biriminde sorumlu eczacı olarak halen görev yapmaktadır. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı ve halen aynı Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime devam etmektedir.