

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOSETAKSEL, GLUTAMİN VE SELENYUM
KOMBİNASYONUNUN PROSTAT KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA KEMOPREVANTİF
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

FIRAT SOYARAT

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970214

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOSETAKSEL, GLUTAMİN VE SELENYUM
KOMBİNASYONUNUN PROSTAT KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA KEMOPREVANTİF
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

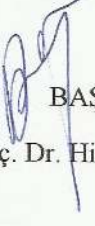
**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

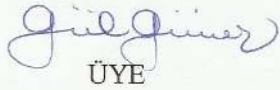
FIRAT SOYARAT

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Hilal KOÇDOR

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970214

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Fırat SOYARAT ‘DOSETAKSEL, GLUTAMİN VE SELENYUM KOMBİNASYONUNUN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA KEMOPREVANTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI’ konulu Yüksek Lisans tezini 20.06.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


BAŞKAN
Doç. Dr. Hilal KOÇDOR


ÜYE
Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN


ÜYE
Prof. Dr. Meral SAKIZLI


ÜYE
Prof. Dr. Güven ASLAN


ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Rüksan ÇEHRELİ

YEDEK ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Mehtap Y. EĞRİLMEZ

YEDEK ÜYE
Prof. Dr. Gülgün OKTAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	3
1.2. Araştırmanın Amacı	4
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Prostat Bezinin Yapısı	5
2.1.1. Prostat Bezinin Embriyolojisi	5
2.1.2. Prostat Bezinin Anatomisi	6
2.1.3. Prostat Bezinin Histolojisi	7
2.1.4. Prostat Bezinin Fizyolojisi	8
2.2. Prostat Kanseri	9
2.2.1. Prostat Kanserinin İnsidansı ve Epidemiyolojisi	9
2.2.2. Prostat Kanserinin Patolojisi	9
2.2.3. Prostat Bezinde Premalign Lezyonlar	11
2.2.4. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	12
2.2.4.1. Yaş	12
2.2.4.2. Heredite	13
2.2.4.3. Irksal Farklılıklar	13
2.2.4.4. Diyet ve Beslenme	13
2.2.4.5. Androjen Reseptörü	15
2.2.4.6. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü	15
2.2.4.7. Hormonlar	15
2.2.5. Prostat Kanserinde Derecelendirme ve Evreleme	15
2.2.6. Prostat Kanserinde Tanı Yöntemleri	17

2.2.6.1. Parmakla Rektal Muayene (PRM)	17
2.2.6.2. Transrektal Ultrasonografi (TRUS).....	17
2.2.6.3. Prostatik Spesifik Antijen (PSA).....	18
2.2.7. Prostat Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Mevcut Yaklaşımlar	18
2.2.7.1. Prostat Kanserinde Kemoprevansiyon- Dosetaksel, Selenyum, Glutamin.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araştırmanın Tipi.....	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	30
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları.....	30
3.4. Çalışma Materyali	30
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	30
3.6. Veri Toplama Araçları.....	30
3.6.1. Kullanılan Cihazlar.....	30
3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler	31
3.6.3. Uygulanan Yöntemler	32
3.6.3.1. Hücre Kültürü.....	32
3.6.3.1.1 Hücre Hattı Özellikleri	32
3.6.3.1.2 Hücre Hatlarında Kullanılan Solüsyonlar	32
3.6.3.1.3 Hücrelerin Kültürde İdamesi.....	33
3.6.3.1.4 Hücrelerin Pasajlanması	33
3.6.3.1.5 Hücrelerin Dondurulması.....	34
3.6.3.1.6 Hücrelerin Çözülmesi	34
3.6.3.1.7 Hücrelerin Sayılması	34
3.6.3.2. Hücre Canlılık Testi	35
3.6.3.2.1. Yöntemin Prensibi	35
3.6.3.2.2. Dosetaksel, Selenyum ve Glutamin'in Hazırlanması	36
3.6.3.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü	36
3.6.3.3. Akım Sitometri Analizleri	38
3.6.3.3.1. Apoptoz Analizi (Annexin V Yöntemi).....	38
3.6.3.3.1.1. Yöntemin Prensibi	38
3.6.3.3.1.1. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü	39
3.6.3.3.2. Hücre Döngüsü Analizi	39

3.6.3.3.1.1. Yöntemin Prensibi	39
3.6.3.3.1.1. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü	39
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	41
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	42
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	42
3.10. Etik Kurul Onayı	42
4. BULGULAR	36
4.1. Hücre Sitotoksosite Testi Bulguları	43
4.1. Apoptoz Analizi Bulguları	49
4.1. Hücre Döngüsü Analizi Bulguları	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR	60
8. EKLER	69

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Projede kullanılan makine ve teçhizat listesi	30
Tablo 3.2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler.....	31
Tablo 3.3. Sitotoksikite deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına verilen dosetakselin 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı	37
Tablo 3.4. Sitotoksikite deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına verilen selenyum ve glutamin'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı	38
Tablo 3.5. Apoptoz ve hücre döngüsü analizi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına verilen dosetaksel, selenyum ve glutamin'in 6 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı	40
Tablo 3.6. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına dosetaksel uygulaması sonucu gruplarda oluşan standart deviasyon (SD) değerleri.....	44
Tablo 3.7. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına L-Selenometiyonin uygulaması sonucu gruplarda oluşan standart deviasyon (SD) değerleri.....	46
Tablo 3.8. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına glutamin uygulaması sonucu gruplarda oluşan standart deviasyon (SD) değerleri.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Normal prostat anatomisi	6
Şekil 2.2. Prostat bezinin zonal anatomisi	8
Şekil 2.3. Gleason derecelendirme sistemi	16
Şekil 2.4. Taxotere (Dosetaksel)'in kimyasal yapısı	21
Şekil 2.5. Dosetaksel'in mikrotübüller üzerindeki etki mekanizması	22
Şekil 2.6. Dosetaksel'in hücre döngüsü aşamaları üzerindeki etkisi.....	22
Şekil 2.7. Dosetaksel'in Bcl-2 üzerindeki etkisi	23
Şekil 2.8. Selenometiyonin'in metabolik yolu	26
Şekil 2.9. Glutamin'in organizmadaki görevlerini açıklayan potansiyel mekanizmalar	28
Şekil 3.1. WST-8'in formazana indirgenme mekanizması	35
Şekil 4.1. PC-3 hücre hattı hücre-absorbans eğrisi.....	43
Şekil 4.2. DU-145 hücre hattı hücre-absorbans eğrisi	43
Şekil 4.3. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 saat dosetaksel uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi.....	45
Şekil 4.4. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 48 saat dosetaksel uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi	45
Şekil 4.5. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 saat L-Selenometiyonin uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi	47
Şekil 4.6. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 48 saat L-Selenometiyonin uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi	47
Şekil 4.7. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 saat glutamin uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi	48
Şekil 4.8. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 48 saat glutamin uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi	48
Şekil 4.9. PC-3 hücre hattının akım sitometrik Annexin V-PI apoptoz analizi sonuçlarının dot plot görüntüleri	49
Şekil 4.10. PC-3 hücre hattı apoptoz analizi sonuçları.....	50

Şekil 4.11. DU-145 hücre hattının akım sitometrik Annexin V-PI apoptoz analizi sonuçlarının dot plot görüntüleri	50
Şekil 4.12. DU-145 hücre hattı apoptoz analizi sonuçları	51
Şekil 4.13. PC-3 hücre hattının hücre döngüsü analizinin PI-Area histogramda akım sitometrik olarak gösterilmesi	52
Şekil 4.14. PC-3 hücre hattı hücre döngüsü analizi sonuçları.....	53
Şekil 4.15. DU-145 hücre hattının hücre döngüsü analizinin PI-Area histogramda akım sitometrik olarak gösterilmesi	53
Şekil 4.16. DU-145 hücre hattı hücre döngüsü analizi sonuçları	54

KISALTMALAR DİZİNİ

GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
DHT	Dihidrotestosteron
PSA	Prostat spesifik antijen
PIN	Prostatik intraepitelyal neoplazi
ASAP	Atipik küçük asiner proliferasyon
HGPIN	Yüksek seviyeli-PIN
LGPIN	Düşük seviyeli-PIN
AR	Androjen reseptörü
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
PRM	Parmakla Rektal Muayene
TRUS	Transrektal ultrasonografi
HIFU	High Intensity Focused Ultrasound
LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone
SLC	Solute carrier
GM-CSF	Granülosit monosit koloni stimüle edici faktör
DI	İyodotironin deiyodinaz
TR	Tiyoredoksin redüktaz
IV	İntravenöz
PSMA	Prostate-specific membrane antigen
DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fetal sığır serumu
Tripsin-EDTA	Tripsin-Etilen diamin tetraasetik asit
PBS	Fosfat tamponlu tuz
CCK-8	Cell counting kit-8
WST	Suda çözünabilen tetrazolium tuzları
NADH	Nicotineamido adenine dinucleotide reduced form
NADPH	Nicotineamido adenine dinucleotide phosphate reduced form
PI	Propidyum iyodür
PS	Fosfatidilserin
SD	Standart Deviasyon

TEŞEKKÜR

Moleküler Tıp Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi, tecrübe ve bilimsel desteği ile bana önderlik ederek bilimsel ufkumu genişleten, laboratuvar deneyimi ile destek olarak bu çalışmayı gerçekleştirebilecek düzeye gelmemi sağlayan proje yürütücüsü ve akademik danışmanım, değerli hocam Sayın Doç.Dr. Hilal KOÇDOR başta olmak üzere,

İki yıl süresince laboratuvarında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve tez çalışmamın hiçbir aşamasında beni yalnız bırakmayan Moleküler Tıp A.D Yüksek Lisans öğrencisi Pınar KEMANLI'ya,

Tezimin oluşturulma aşamalarında klinikle bağdaştırılmasını sağladıkları için Yrd. Doç. Dr. Rüksan ÇEHRELİ, Prof. Dr. İlhan ÖZTOP ve Prof Dr. Güven ASLAN'a,

Bilimsel ve dernek desteğini tezimde kullanmamı sağlayan ve tez çalışmanın istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Prof Dr. Mehmet Ali KOÇDOR'a,

Akım Sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesinde bilgilerini paylaşan ve laboratuvar çalışmalarımızda yardımlarını esirgemeyen Uzman Halil ATEŞ'e, akım sitometrik analizlerin yorumlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Hayri ÖZSAN'a,

Anabilimdalı başkanı olarak devamlı arkamızda olduğunu hissettiğimiz Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a,

Sonsuz destekleri ve sabırları için aileme, en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemelerinin bir bölümü Tıbbi Bilimsel Aktiviteleri Destekleme Derneği tarafından karşılanmıştır.

DOSETAKSEL, GLUTAMİN VE SELENYUM KOMBİNASYONUNUN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA KEMOPREVENTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

**Fırat SOYARAT, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
firatsoyarat@hotmail.com, İnciraltı / İZMİR**

ÖZET

Prostat kanseri gelişen ülkelerde yüksek insidansı ile önemli bir kanser türünü temsil etmektedir. Dosetaksel oldukça toksik bir antineoplastik ajandır. Bu çalışmada androjen reseptörü negatif prostat kanseri hücre hatları olan DU-145 ve PC-3 üzerinde glutamin ve selenyumun dosetakselle kombine kullanımında antikanser etkisi incelendi. Bu amaçla dosetaksel, selenyum ve glutaminin PC-3 ve DU-145 hücre hatları üzerinde preventif etkilerini belirlemek ve etkin dozunu saptamak amacıyla sitotoksikite deneyi yapıldı. Belirlenen etkin konsantrasyonlar, farklı ilaç kombinasyonlarında hücrelere uygulanarak akım sitometrik yöntemle hücre döngüsü ve apoptoz analizleri yapıldı.

Bulgularımız, glutamin ve selenyumun prostat kanseri hücre hatlarının apoptozisini arttırdığını, dosetaksel rejimine bu kombinasyonun eklenmesiyle ise nekrotik hücre ölüm oranını azalttığını göstermiştir. Ayrıca PC-3 hücre hattında dosetaksel rejimine selenyum ve glutaminin eklenmesinin dosetaksel ajanının hücre döngüsüne olan etkisini değiştirmedığı, DU-145 hücre hattında ise dosetakselin hücresel düzeyde hasar vermiş olduğu hücre oranının azaldığı ve bu hücrelerin G0/G1 ve G2+M tutulduğu belirlendi.

Hormonoterapiye dirençli, metastatik prostat kanseri hücrelerinde, klasik dosetaksel tedavisine glutamin ve selenyumun eklenmesinin anti-kanser etkinliği arttırdığı ve dosetakselin sitotoksik etkilerini azalttığı belirlendi. Bu bulgular, prostat kanseri standart dosetaksel tedavisine katkıda glutamin ve selenyumun önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Dosetaksel, Glutamin, PC-3, DU-145, Kemoprevansiyon, Prostat kanseri, Selenyum

INVESTIGATION OF THE CHEMOPREVENTIVE EFFECTS OF DOCETAXEL, GLUTAMINE AND SELENIUM COMBINATION ON PROSTATE CANCER CELL LINES

**Firat SOYARAT, Dokuz Eylül University Institute Of Health Sciences Department of Molecular
Medicine, firatsoyarat@hotmail.com, İnciraltı / İZMİR**

ABSTRACT

Prostate cancer is an important cancer type with its high incidence rate in developing countries. Docetaxel is a quite toxic antineoplastic agent. In this study, anticancer efficiency of glutamine and selenium combination with docetaxel treatment was investigated on androgen receptor-negative prostate cancer cell lines, DU-145 and PC-3. For this purpose, cytotoxicity assays were carried out to determine preventive effects and the efficient doses of docetaxel, selenium and glutamine on PC-3 and DU-145 cells. Then, cell cycle and apoptosis analyses were performed using flow cytometry with the treatment of effective doses at various combinations to the cells.

As a result, glutamine and selenium increased apoptosis of prostate cancer cell lines. Glutamine and selenium supplemented docetaxel decreased the ratio of necrotic cell death. Furthermore, combination of selenium and glutamine to docetaxel did not change the effect of docetaxel on cell cycle arrests on PC-3 cells. Harmful effects of docetaxel on cellular level decreased on DU-145 cells when docetaxel was combined with selenium and glutamine and damaged cells arrest at stage of G0/G1 and G2+M was determined.

It was observed that anticancer effects were increased with glutamine and selenium addition to docetaxel treatment moreover, cytotoxic effects of docetaxel decreased on hormone therapy-resistant, metastatic prostate cancer cells. These results indicate that glutamine and selenium may have a significant role of contribution to standard docetaxel treatment of prostate cancer.

Keywords: PC-3, DU-145, Chemoprevention, Docetaxel, Glutamine, Prostate cancer, Selenium

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Prostat kanseri, prostat bezinde çoğunlukla adenokarsinoma olarak ortaya çıkan, heterojen ve genellikle çok odaklı olarak seyreden bir hastalıktır⁽¹⁾. Batılı ülkelerde erkekler arasında en yaygın kanserdir ve erkeklerde kanser sebebiyle ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır⁽²⁾. Prostat kanseri, başlangıcının uzun süreli latensi, yüksek insidansı ve yüksek mortalite hızlarından dolayı, kemoprevansiyon stratejileri için uygun bir kanser hedefi olabilir. Ayrıca hastalığın tedavisinin maddi boyutu da düşünülecek olursa önleyici faktörlerin önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır⁽³⁾.

Dosetaksel prostat kanserinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajandır. Dosetaksel yaşamsal mitotik ve interfaz hücresel fonksiyonlar için gerekli olan hücrelerdeki mikrotübüler ağı bozmak suretiyle etki gösteren bir antineoplastik ajandır. Dosetaksel tubulinin, stabil mikrotübüllerde toplanmasını teşvik ederken aynı zamanda bunların dağılmasını da inhibe eder⁽⁴⁾. Dosetakselin etkinliğini arttıracak yeni kemoterapotik ajanlar ve hedefe yönelik tedaviler ya da bunların kombinasyonları gündemdedir.

Selenyum, insan sağlığı için esansiyel besin olarak bilinen bir eser elementtir⁽⁵⁾. Antioksidan etkisi, immün fonksiyonları arttırması, apoptosizi indüklemesi, hücre proliferasyonunu inhibe etmesi, karsinojenlerin metabolizmasını azaltması gibi selenyum'un antikanserojenik etkisini açıklamada ileri sürülen çok sayıda potansiyel mekanizma vardır^(6,7). Selenyum bazı metabolik hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesinde rol oynayan antioksidan özellikteki glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin yapısında bulunur. Selenyumun biyolojik önemi bu enzimin bir ko-faktörü olmasından kaynaklanmaktadır⁽⁸⁾. Selenyum'un in vitro olarak insan prostat kanser hücrelerinde büyümeyi durdurduğu gösterilmiştir ayrıca insanlarda oral alınan selenyum'un selektif olarak prostat dokusu tarafından tutulduğunun gösterilmesi dikkatleri selenyum üzerine çekmiştir⁽⁹⁾.

Glutamin, esas olarak esansiyel olmayan aminoasit grubundadır. Vücutta en çok bulunan aminoasittir. Önemli bir enerji kaynağıdır ve protein sentezi ve hücresel koruyucu sistemler için gereklidir. Major antioksidan GSH sentezi için prekürsördür⁽¹⁰⁾.

Dosetaksel prostat kanserinin standart tedavisinde yer alan, oldukça toksik bir ajandır. Tedavi sırasında olgularda sıklıkla glutamin ve selenyum suplementasyonu gerekli olmaktadır. Ancak bu ilavelerin mevcut antikanser etkinliğe katkısı bilinmemektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmanın amacı; hormonal tedavinin etkisiz olduğu, dosetaksel rejimi uygulanan prostat kanseri hücrelerinin gelişmesinin engellemesi işlevinde dosetakselin etkinliğinin artırılması ve toksisitesinin azaltılması amacıyla androjen reseptörü negatif prostat kanseri hücre hatlarında selenyum ve glutamin suplementasyonunun anti-kanser etkinliğinin belirlenmesidir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

H 1: Dosetakselin, in-vitro’da prostat kanseri hücrelerinin gelişimini engellemesi işlevinde, glutamin ve selenyum suplementasyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi yoktur.

H 2: Glutamin ve selenyum suplementasyonu in-vitro’da dosetakselin oluşturacağı toksisitenin azaltılmasında etkilidir.

H 3: Selenyum ve glutamin dosetaksel uygulaması yapılmadığı dönemde tek başına veya kombine kullanımda kanser hücrelerinin in-vitro’da gelişimini engeller.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 PROSTAT BEZİNİN YAPISI

2.1.1 Prostat Bezinin Embriyolojisi

Prostat mezonefrik kanal girişinin hem yukarı hem de aşağısındaki üretral epitelyum tomurcuklarından köken alır. Bu basit tübüler oluşumlar 11. haftanın sonunda 5 ayrı grup halinde gelişir ve 16. haftada (embriyonun 12 mm büyüklüğe eriştiği evre) gelişme tamamlanır. Bu süreçte ortaya çıkan oluşumlar dallanır ve ürogenital sinüsün etrafında farklılaşan mezenkimal hücrelerle karışan karmaşık bir kanal sistemiyle sonuçlanır. Bu mezenkimal hücreler 16. haftada tübüller çevresinde gelişmeye başlar ve periferde daha da yoğunlaşarak prostatik kapsülü oluşturur⁽¹¹⁾.

Verumontanumun her iki yanında ürogenital sinusun posterior tarafında birleşmiş bir şekilde 5 tane epitelyal tomurcuk oluşur ve bunlar daha sonra prostatı oluşturmak üzere mezenkime invaze olurlar. Tomurcuklar tepede birleşerek prostatın mezoderm orijinli iç zonunu oluşturur. Aşağı tomurcuklar ise prostatın dış zonunu oluşturur ve endoderm orijinlidir. Bu potansiyel olarak önemlidir, çünkü kanser primer olarak dış zondan kaynak alırken, Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)'nin orijini iç zondur. Prostatın her iki zonu üretranın etrafında konsantrik bir daire olarak gelişir. Dış yandaki uzun dallanmış kanallar, gerçek prostat dokusunun dıştaki kalın tabakasını oluşturur. Merkez kısmı mukozal ve submukozal glandları, ejakulator kanalları ve prostatik utrikulu içerir⁽¹²⁾.

Prostatın büyümesi ve gelişmesi, gestasyonun aşağı yukarı 8. haftasında başlayan, fetal testislerden androjen üretimine bağlıdır. Wolf kanalından köken alan organların gelişimi sadece testosterona bağlı olduğu halde, ürogenital sinusun diferansiasyonu, 5 α -redüktaz ile testosterondan üretilen dihidrotestosterona (DHT) bağımlıdır. DHT, ürogenital sinusun pelvik kısmından prostatın büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Gebeliğin 4. ayında prostat iyice farklılaşır^(13,14).

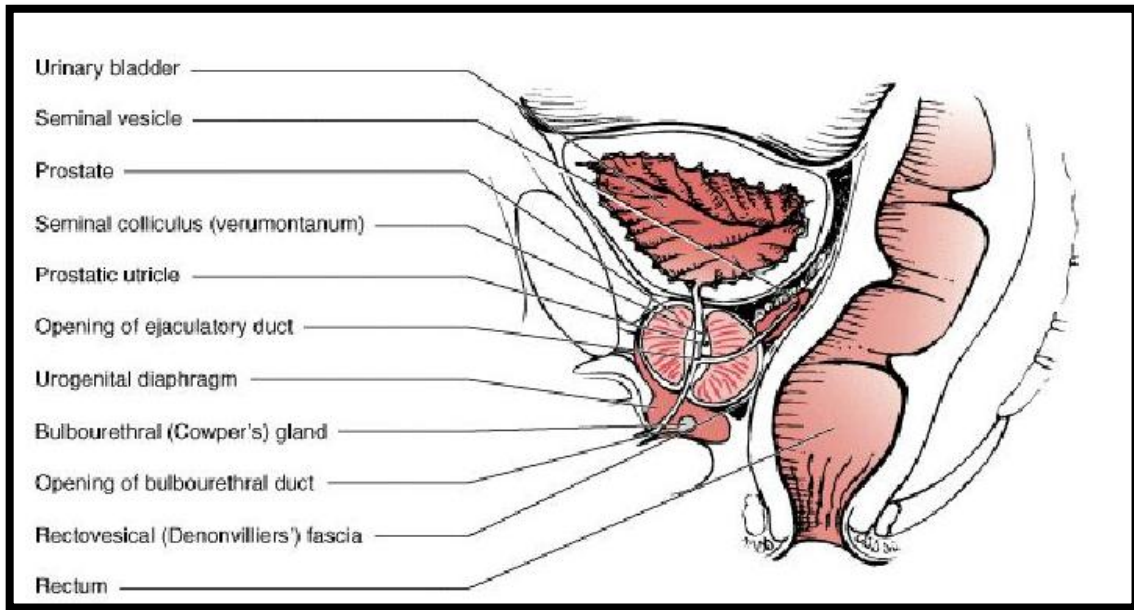
Doğumdan 6-7 hafta sonrasına dek glandda belirgin duktal hiperplazi ve duktal epitelde skuamöz metaplazi oluşur. Bu değişiklikler fetal dolaşımda bulunan maternal östrojenlere bağlanmaktadır. Bu süre sonunda puberteye dek prostat boyutlarında yavaş fakat devamlı bir artış gözlenir. Pubertede ise gland boyutları altı ay gibi kısa bir zamanda iki misline katlanmaktadır. Bu hızlı boyut artışının ana nedeni glandüler dokudaki testesterona bağımlı hiperplazidir. Sonuçta stromal elemanların prostattaki oranı azalmakta ve prostat

erişkin formunu almaktadır. Böylece prostat yaklaşık 18-20 gr. ağırlığa ve 3x2,5x2,5 cm (transvers x antero-posterior x sagittal) boyutlara ulaşır⁽¹⁵⁾.

2.1.2 Prostat Bezinin Anatomisi

Anatomik kesişme bölgesinin merkezinde bulunan ve bir salgı bezi olan prostat mesanenin altında yer alarak üretrayı çevrelemekte ve rektumun önünde bulunmaktadır⁽¹⁶⁾. Normal prostat bezi yaklaşık olarak 18 gr ağırlığında ve 4x3x2 cm boyutlarında olup prostatik üretrayı içermektedir. Ovoid bir yapı göstermekle beraber anterior, posterior ve lateral yüzler, aşağıya doğru daralan bir apeks ve yukarıda mesane ile devamlılık gösteren düz bir tabana sahiptir. Kollajen, elastin ve düz kastan oluşan bir kapsül ile çevrilidir⁽¹⁷⁾.

Prostat bezinin posterior yüzü, rektum ampullasından, prostatik kapsül ve Denonvilliers fasyası aracılığıyla ayrılırken, her iki vesikula seminalis ve duktus deferensin ampullası ile komşuluk yapar. Anterior yüz dar ve konveks olup simfizis pubisten 2 cm uzaklıkta bulunurken, arada kalan boşluk ise zengin ven pleksusu (Santorini pleksusu) ve gevşek bağ dokusu ile doludur. Anterior yüz iki adet puboprostatik ligaman yardımıyla pubis kemiğine tutunur iken, inferolateral yüzlerin levator ani kasıyla komşuluğu bulunmaktadır. Arada prostatik kılıflarla sarılı olan zengin ven pleksusu (lateral pleksus) bulunur⁽¹⁸⁾. Prostatın apeksi üretral sfinkter ile devamlılık gösterir. Mesaneye komşu kısmında sirküler ve longitudinal kaslar prostatik üretraya doğru uzanarak preprostatik sfinkteri oluşturur⁽¹⁷⁾.



Şekil 2.1. Normal prostat anatomisi⁽¹⁷⁾

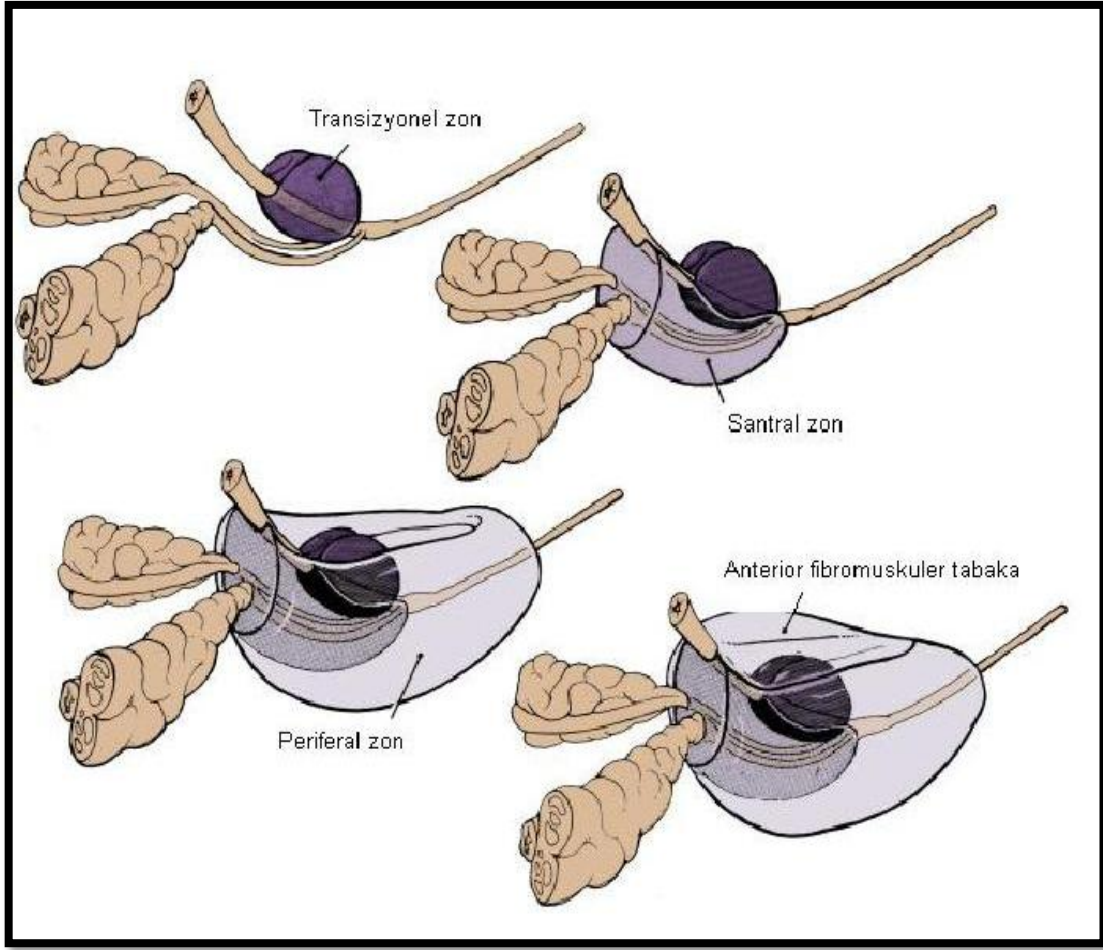
2.1.3 Prostat Bezinin Histolojisi

Prostat yaklaşık %70 glandüler elemanlar ve %30 fibromusküler stromadan ibarettir. Fibroblastlar, düz kas hücreleri, sinir hücreleri ve lenf damarlarından oluşan stroma prostat bezini sarmaktadır ve prostatın glandüler bölümünü çevreleyerek ejakulasyon esnasında kasılmak suretiyle prostatik sekresyonların üretraya geçişini sağlar^(16,17). Prostat bezi kısmen basit dallanmalara sahip tübüloalveolar bezdir ve kuboidal ya da kolumnar epitel ile döşelidir. Sekretuar hücreler arasına saçılmış fonksiyonu bilinmeyen nöroendokrin hücreler mevcuttur. Her asinüste epitelyal hücrelerin altında, sekretuar epitelin kök hücreleri olarak kabul edilen bazal hücreler yer alır⁽¹⁷⁾.

Home 1906 yılında orta lobu tanımlamadan önce prostatın 2 lateral loptan oluştuğu düşünülmekteydi. 1912'de Lowsley, embriyolojik bulgular doğrultusunda 2 yan, 1 arka ve 1 orta lob olmak üzere 5 prostatik lobun olduğunu savunmuştur. Bu görüş 50 yıl boyunca kabul gördü. 1954'te Fransk zonal anatomi fikrini ortaya atmış, McNeal'de 1968'de günümüzün zonal anatomi kavramını geliştirmiştir^(19,20).

McNeal ve arkadaşları prostatın normal ve patolojik anatomisi ile ilgili detaylı çalışmalar yürütmüşler ve prostatı tanımlamak için “anatomik zon” kavramını ortaya atmışlardır. Normal prostat içinde periferik zon, santral zon, transizyonel zon ve fibromusküler stroma olmak üzere 4 dört önemli zon bulunmaktadır⁽²¹⁾.

Prostatın apikal, lateral ve posterior kısımlarını saran en büyük parçası olan periferik zon total glandüler dokunun %75'ini içermektedir. Karsinomların %75-80'i bu zondan kaynaklanmaktadır. Ayrıca kronik prostatitide de en çok etkilenen zondur. Transizyonel zon, proksimal ve distal üretranın birleştiği bölgede küçük bir grup glanddan oluşur ve tüm prostatın %5'inden azını oluşturur. BPH'nın tümü buradan kaynaklanır. Prostat kanserinin %10-20'si transizyonel zondan çıkar. Santral zon, glandüler fonksiyon yapan prostatın %25'lik bölümüdür ve ejakülasyon kanallarını çevrelemektedir. Prostat kanserlerinin %5-10'u bu zondan kaynaklanır. Fibromusküler stroma ise kalın, glandular yapıda olmayan koruyucu bir kılıf olarak prostatın tüm ön yüzeyini oluşturur^(22,23).



Şekil 2.2. Prostat Bezinin Zonal Anatomisi ⁽²¹⁾

2.1.4 Prostat Bezinin Fizyolojisi

Prostat bezi sitrat iyonları, kalsiyum, fosfat iyonları, bir pıhtılaşma enzimi ve fibrinolizin içeren ince, süte benzer bir sıvı salgılar. Emisyon sırasında, prostat bezinin kapsülü, vas deferensle eş zamanlı olarak kasılırlar. Böylece ince, sütümsü prostat sıvısı, semen kitlesine eklenir. Prostat sıvısının hafif alkalik özelliği, ovumun başarılı bir şekilde döllenmesi için çok önemlidir. Çünkü vasa deferens sıvısı spermin metabolik ürünleri ve sitrik asit varlığında, göreceli olarak asidik özelliktedir. Bu nedenle, spermin fertilite özelliği baskılanabilir. Ayrıca, kadının vajinal salgıları da asidiktir (pH=3,5-4,0). Sperm, ortam pH'sı 6.0 ile 6.5' a ulaşana kadar optimal hareketliliğini göstermez. Sonuç olarak, prostat sıvısının, diğer ejakülat sıvılarının asiditesini nötralize etmesi ve bu yolla spermin hareket ve fertilizasyon yeteneğinin artması olasıdır⁽²⁴⁾.

2.2 PROSTAT KANSERİ

2.2.1 Prostat Kanserinin İnsidansı ve Epidemiyolojisi

Prostat kanseri, Avrupa ve Amerika’da en sık tanı konulan kanserdir ve erkeklerde kansere bağlı mortalitede ikinci sırada yer almaktadır⁽²⁵⁾. İnsidans ve mortalite oranları ırk, diyet alışkanlığı, yaşam tarzı, coğrafya, tarama çalışmaları ve önleyici tedavi gibi nedenlerden dolayı farklı etnik popülasyonlarda ve ülkelerde değişkenlik gösterir. 1990’ların başından itibaren yeni tanısal yöntemler ve gelişen tedaviler sayesinde hastalığın insidansında, tanı anındaki evresinde ve mortalite oranlarında anlamlı düzelmeler olmuştur⁽²⁶⁾.

Prostat spesifik antijenin (PSA) prostat kanseri tanısında kullanılmaya başlanmasından sonra prostat kanseri insidansında ciddi bir artış olmuştur. PSA testinin yaygınlaşması ile lokal-bölgesel hastalık insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmaktadır⁽²⁷⁾. Prostat kanserlerinin yaklaşık %95’inde tanı 45 ile 89 yaşları (ortalama; 72 yaş) arasında konulmaktadır. Prostat kanseri insidansı yaşla birlikte artmaktadır. Erkeklerde 39 yaşın altında prostat kanseri gelişme oranı 1/10.000 iken, 40 ile 59 yaşları arasında bu oran 1/103, 60 ile 79 yaşları arası ise 1/8 dir⁽²⁸⁾. Prostat kanseri taraması modern onkolojideki en tartışmalı konulardan biridir. Bazı uzmanlar tarama ile erken tanının mümkün olduğunu ve lokal tedavi ile kür sağlanabilecek hasta sayısının arttığını söylemektedir. Karşı düşüncede olanlar ise erken tanı ile prostat kanser mortalitesinin değiştiğine dair bir kanıt olmadığını ve fazla tedavinin yarardan çok zarar verebileceğini ileri sürmektedir. Ortak düşünce şudur ki; prostat kanseri insidansındaki artış ile tanının geç evrelerden erken evrelere kayması büyük oranda taramaya bağlıdır⁽²⁹⁾.

2.2.2 Prostat Kanserinin Patolojisi

Prostat kanseri, tümörün baskısı sonucu sık idrara çıkma, hematüri, hematospermi ya da postejakülatör ağrı gibi semptomlarla ortaya çıkar. İleri evrede lenf nodlarına, kemiğe ya da diğer organlara metastazı tipiktir⁽³⁰⁾. Prostat kanserleri pek çok tip göstermektedir. Bunlar; adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamoz ve adenoskuamoz kanserler, sarkomatid karsinoma, (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler, prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP)’dır. Bunlardan en sık görüleni %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlardır⁽³¹⁾.

Prostat kanserleri prostat asiner hücrelerinden kaynaklanır. İyi farklılaşmış prostat adenokarsinomları sırt sırta vermiş aralarında çok az stroma bulunan glandüler hücreler çevresinde normal miyoepitelyal hücre tabakasının kaybolduğu küçük bez gruplarıdır⁽³²⁾.

Prostat kanserleri patolojik olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır;

A. Periferik duktus ve asinuslerin adenokarsinomu

B. Büyük duktusların karsinomu

1. Büyük (prostatik) duktus adenokarsinomu
2. Endometrial tip (endometrioid) adenokarsinom
3. Primer transizyonel hücreli (üretelial) karsinom
4. Miks adenokarsinom-transizyonel hücreli karsinom

C. Diğer mikroskobik tipleri;

1. Nöroendokrin özellikli karsinoma
2. Musinöz (musin-secreting) adenokarsinoma
3. Adenoskuamöz karsinoma
4. Skuamöz hücreli karsinoma
5. Taşlı yüzük karsinoma
6. Adenoid bazal hücreli (adenoid kistik benzeri) karsinoma
7. Bazaloid karsinoma
8. Lenfoepitelyoma benzeri karsinoma
9. Tübülökistik berrak hücreli adenokarsinoma
10. Sarkomatoid karsinoma

Morfolojik ayırım klasik olarak iki tümörün farklı orijin yeri temel alınarak yapılır ve her iki patern sıklıkla birarada görülür. Tümörlerin çoğu birinci gruptadır. Grade, evre, prognoz ve tedavi konusundaki çalışmaların çoğunda bu gruptaki kanserler referans alınır⁽³³⁾.

A. Periferik duktus ve asinusların karsinomu:

Prostat kanserlerinin en sık görülen formudur ve prostatta posterior lob yerleşimlidir. Makroskobik olarak tümörü görmek zor olabilir. Tümör gri sarımsı renktedir ve sınırları net olarak seçilemez. Erken dönemlerde tümör çok küçüktür ve radikal prostatektomi materyallerinde gözden kaçabilmektedir. Mikroskopik olarak çok iyi diferansiye görünümünden

anaplastik formlara kadar değişkenlik gösterir. İyi diferansiye karsinomları benign epitelden ayırmak zordur.

Prostat karsinomları, rektal muayenede sıklıkla unilateral gözükmele birlikte, patolojik incelemede %70'inden fazlası bilateralidir. Olguların %85'inden fazlasında multifokal adenokarsinom mevcuttur. Bunlar tümörün intraglandüler yayılımından çok gerçek multisentrik özelliğini gösterir. Santral bölgede lokalize olan tümörlerde multisentrisite daha az görülür. Tümör morfolojik olarak 4 majör görünüm sergiler ve bu görünümünün hepsi bir arada görülebilir;

- Orta çaplı glandlar,
- Küçük glandlar,
- Diffüz tek hücre infiltrasyonu,
- Kribriform yapı

Tümör adaları etrafındaki stroma hiperselüler ve bazende bazofilik buzlu cam görünümünde olabilir. Bu görünüme müsinöz fibroplazi ve kollajen mikronodülleri neden olur. Karsinomda sitoplazma genellikle granülerdir fakat lipid akümülyasyonuna bağlı olarak berrak da görülebilir⁽³³⁾.

B. Büyük duktusların karsinomu (Primer):

Periüretal bölgede bulunan büyük duktuslardan köken alır ve çoğunlukla verumontanumda veya etrafında yerleşim gösterir. Prostat karsinomlarının % 0,4-0,8'i duktuslardan köken alır⁽³³⁾.

2.2.3 Prostat Bezinde Premalign Lezyonlar

1935 yılında Moore prostatta yaşlanma ile birlikte küçük odaklar halinde ortaya çıkan atrofinin sıklıkla invaziv kanserlere eşlik ettiğini gözlemleyerek bunun premalign bir değişiklik olduğunu öne sürmesini takiben pek çok araştırmacı bu tip değişiklikler ile Prostat kanseri arasında benzerlikler ortaya konmuştur⁽³³⁾.

BPH istenmeyen ancak kansere neden olmayan prostat büyümesidir. Teorik olarak prostattaki mikroskobik değişimleri tanımlar. Hiperplazi hücrelerin aşırı çoğalmasını, benign ise çoğalan hücrelerin bez içerisinde kalarak yayılma göstermediğini ifade eder. BPH geçiş

bölgesini etkilemektedir dolayısıyla üretraya çok yakın bir bölgede büyüme olduğundan üriner semptomlara yol açmaktadır⁽¹⁶⁾.

Atipik Adenomatöz Hiperplazi glandüler BPH nodüllerine benzer ancak BPH'den strüktürel yapı olarak farklıdır. Bez yapıları sıklıkla çok küçük ve sıkışık yerleşimli olup düzgün yuvarlak oval konturludur. İyi diferansiye prostat kanserinden nükleer anaplazi olmaması ve lümen etrafında nükleusların düzenli yerleşim göstermesi özellikleri ile ayrılır. Karsinomlara sitolojik benzerliği ve sıklıkla karsinomlarla bir arada izlenmesi bu lezyonların malign potansiyeli olduğunu düşündüren esas faktörlerdir. Küçük mikroskopik büyütme alanında iyi diferansiye (Gleason grade 1 ve 2) prostat kanseri gibi görülürler. Bezlerin lümenlerinde asidik müsin vardır. Sıklıkla transizyonal zon yerleşimlidirler.

Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN), invaziv kanserin öncüsü olduğuna dair bulguların en yoğunlaştığı lezyondur. Duktus-asiner hücre proliferasyonu ve displazisi ile karakterize bu lezyonun en belirgin özelliği hücrelerin anaplastik nükleus içermeleridir. Hücre yoğunluğunda artış, pseudostratifikasyon ve sitoplazmik boyanma farklılıkları, görülen diğer sitolojik değişikliklerdir. Sıklıkla çevredeki normal bezlerden belirgin olarak ayırt edilebilen prolifer ve koyu boyanan epitel içeren fokal alanlar şeklinde izlenir. Kanserle birlikte olduğu durumlarda PIN multifokaldır^(33,34).

PIN lezyonlarının üç derecesi vardır. Birincisi hafif ya da düşük-skorlu, ikincisi orta dereceli, üçüncüsü ise şiddetlidir. İkinci ve üçüncü dereceli lezyonlar genel olarak yüksek seviyeli-PIN (HGPIN), birinci dereceli lezyon ise düşük seviyeli-PIN (LGPIN) olarak değerlendirilir. Yüksek-seviyeli PIN lezyonları, çoğu kez çok odaklı kanserler şeklinde görülür⁽²³⁾.

2.2.4 Prostat Kanseri Risk Faktörleri

2.2.4.1 Yaş

Prostat kanserinin en önemli risk faktörlerinden birisi yaşlanmadır. Prostat kanseri insidansı diğer epitel tümörlerine göre yaşla birlikte daha hızlı bir şekilde artmaktadır. Prostat kanserinin 50 yaşından sonra görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır Prostat kanserinin %95'i 45-89 yaşları arasında görülür. Bu oran 30'lu yaşlarda %27 ve 40' lı yaşlarda ise %34 düzeyindedir^(22,35). Tanı sırasında medyan yaş 72 olarak belirlenmiştir. Ayrıca prostat kanseri genç yaşlarda görüldüğünde daha hızlı progresyon göstermektedir⁽³⁶⁾.

2.2.4.2 Heredite

Yakın akrabalarında prostat kanseri olan erkeklerde hastalığın insidansının artmış olduğu birçok çalışmada bildirilmektedir. Brott ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada etkilenen aile bireylerinin sayısı, bunların akrabalık derecesi ve tanı anındaki yaşlarıyla rölatif riskin ve nüks oranının arttığı bildirilmiştir⁽³⁷⁾. Birinci dereceden akrabasında prostat kanseri olan bir erkekte bu hastalığın gelişme riski 3-4 kez artmaktadır. Eğer birinci dereceden iki akrabasında prostat kanseri mevcut ise risk 5-6 kat artmaktadır⁽²⁹⁾.

2.2.4.3 Irksal Farklılıklar

Prostat kanserinin ırklar arası insidansında farklılıklar bulunmaktadır. Prostat kanserinin insidansı Amerika Birleşik Devletler' inde diğer ülkelere özellikle Asya ülkelerine göre oldukça yüksektir. Afrika kökenli Amerikalı erkekler dünyada en fazla risk oranına sahiplerdir ve ölüm oranları beyazlara göre daha yüksektir. ABD' de yaşayan siyah erkeklerde hastalığın insidansı beyaz ırka göre daha yüksek bulunmuştur^(21,36). Klinik olarak prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi doğu ırklarında düşüktür. İskandinav kökenlilerde doğu ırklarına göre bu oran daha yüksektir⁽²⁸⁾.

2.2.4.4 Diyet ve Beslenme

Coğrafi değişiklikler ve göçebeler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar prostat kanseri gelişiminde diyetin önemini vurgulamıştır⁽²⁸⁾. Değişik ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar prostat kanseri progresyon ve ölüm oranlarının diyetteki toplam yağ tüketimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir⁽³⁸⁾. Prostat kanseri olan erkeklerin diyetleri sağlıklı erkekler ile karşılaştırıldığında, bu hastalarda genel olarak yağların ve doymuş yağ asitlerinin (özellikle oleik asit) tüketiminin daha fazla olduğu saptanmıştır⁽³⁹⁾. Bunlara ek olarak, yaşları 40-75 arasında değişen 47,855 erkek üzerinde gerçekleştirilen “United States Health Professionals Follow-up Study” çalışmasında kalori alımının, toplam yağ ve özellikle hayvansal yağ tüketiminin ileri dönem prostat kanseri gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ileri evre prostat kanseri gelişimi için en önemli risk faktörü olarak kırmızı et tüketimi saptanmıştır⁽⁴⁰⁾. Genel olarak diyetteki yağların prostat kanseri gelişim riskini artırdığı düşünülmekle beraber, özellikle balık yağında bol miktarda bulunan uzun zincir omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin tam tersine koruyucu etki gösterdiklerine dair kanıtlar bulunmaktadır⁽⁴¹⁾.

Yapılan bazı araştırmalar antioksidan etkiye sahip yiyeceklerin prostat kanseri gelişimini ve progresyonunu engelleyebileceğini göstermiştir. Yapılan araştırmalarda domates tüketimi ve kan likopen düzeyleri ile prostat kanseri riski arasında belirgin derecede tersine bir ilişki olduğunu ortaya konulmuştur^(42,43).

Selenyum'un prostat kanseri ve BPH üzerindeki etkileri değişik araştırmaların konusu olmuştur. Prostat kanseri tanısı almış ve bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiş hastalarda plazma selenyum düzeylerinin, aynı yaşı ve ırk grubundan kontrol grubu bireylerine göre daha düşük olduğu gösterilmiştir⁽⁴⁴⁾.

E vitamini (alfa tokoferol), hücre zarlarını serbest radikallere karşı koruyan yağda çözülebilen antioksidandır. Prostat kanseri insidansı ve mortalitesi üzerinde α -tokoferolün etkileri “ α -Tocopherol and β -Carotene Cancer Prevention Study (TCCPS)” çalışması ile araştırılmıştır. Bu çalışmada 29.133 sigara içen erkeğe günde 50 mg E vitamini (α -tokoferol) ve 20 mg β -karoten tek tek ya da birlikte 5-8 yıl süreyle verilmiştir. Sadece E vitamini verilen grupta plaseboya göre prostat kanseri insidansı ve mortalitesi daha düşük bulunmuş, buna karşılık β -karoten grubunda %32 daha fazla prostat kanserine rastlanılmış ve mortalite plaseboya göre %15 daha yüksek gözlenmiştir. E vitamini verilen erkeklerde serum androstenedion ve testosteron konsantrasyonları daha düşük bulunduğundan, E vitamininin koruyucu etkilerinin seks hormonlarının konsantrasyonlarındaki azalmaya bağlı olduğu öne sürülmüştür⁽⁴⁵⁾. Selenyum, vitamin E veya her ikisinin kombine kullanımının prostat kanserini önleme üzerindeki etkinliği SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevantion Trial) çalışması ile araştırılmıştır. Hastalar selenyum, vitamin E ve her ikisinin kombine verildiği ve plasebo olmak üzere dört gruba randomize edilmişlerdir. Afro-Amerikalılarda 50 yaşı ve üzeri, beyaz Amerikalılarda 55 yaşı ve üzeri toplam 35.553 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Ortalama 5,5 yıllık takip süresinin ardından selenyum, vitamin E ve kombine kullanımın prostat kanseri gelişimi üzerine anlamlı etkileri olmadığı gösterilmiştir⁽⁴⁶⁾.

D vitamini ve kalsiyum'un antioksidan özellikleri olmamakla beraber, mevcut veriler özellikle D vitamininin prostat kanserinin önlenmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Vitamin D3 [1,25(OH)2D3 veya calcitriol] ultraviyole ışığı etkisi ile deride sentez edilen bir hormondur. Prostat kanseri güneşin çok az görüldüğü Kuzey ülkelerinde, ekvatora yakın olan bölgelerle karşılaştırıldığında çok daha sık görülmektedir⁽⁴⁷⁾.

2.2.4.5 Androjen Reseptörü

Androjenler prostatın gelişimini, maturasyonunu ve devamlılığını sağlayan başlıca hormondur. AR (Androjen reseptörü)'nin polimorfizmi ve androjen metabolitleri, epidemiyolojik olarak prostat kanseri gelişimi ile ilişkilidir. Hormon refrakter tümörlerde AR geni amplifikasyonunun varlığı bildirilmiş ve androjenden bağımsız tümör progresyonunda AR kopyasının artmasının bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Benzer şekilde, androjenden-bağımsız tümörlerde bir takım AR mutasyonları da bildirilmiştir. Bu mutasyonlar AR'yi androjenik olmayan ligandlara karşı cevap verir konuma getirir ve prostat kanseri progresyonuna da katkıda bulunabilir^(48,49).

2.2.4.6 İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) hem normal hem transforme prostat epitelyal hücrelerinde mitojenik ve antiapoptotik etkileri vardır. Androjen reseptörleri büyütücü etkilerinin bir kısmını IGF-1 üzerinden yapmaktadırlar. Androjenler serumda IGF bağlayıcı proteinleri azaltarak serumdaki serbest IGF-1 düzeyini arttırırlar. Yapılan bir prospektif çalışma serumdaki IGF-1 miktarındaki 100 ng/ml'lik bir artışın prostat kanseri riskini 2 kat arttırdığını göstermiştir⁽⁵⁰⁾.

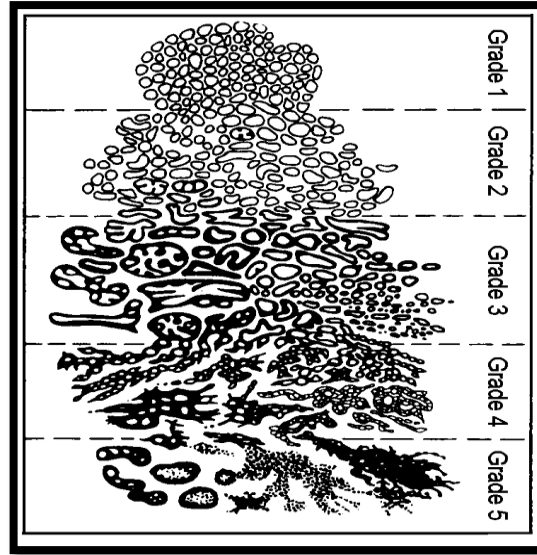
2.2.4.7 Hormonlar

Prostat androjen bağımlı bir organdır. Testosteron prostat epitelinin büyümesi için vazgeçilmez bir unsurdur ve erken evre prostat kanseri endokrin bağımlıdır. Steroid hormonların aktivasyonunun prostat kanseriyle ilişkisi tam olarak gösterilememiştir. Muhtemelen hormon metabolizmasındaki değişiklikler histolojik prostat kanserinin klinik aktif forma dönüşmesine sebep olmaktadır⁽⁵¹⁾. Prostat kanserli hastalarda testosteron dolaşımdaki yüksek seviyeleri devamlı olarak gözlenmemektedir. Ancak diğer hormonların özellikle de prolaktin ve östrojenin prostat bezi metabolizmasında henüz tanımlanmamış roller oynadıkları düşünülmektedir⁽²⁸⁾.

2.2.5 Prostat Kanseri Derecelendirme ve Evreleme

Prostat kanserinin histopatolojik olarak derecelendirilmesinde çok sayıda sistem mevcuttur. Gacta, Böcking, M.D. Anderson Hospital ve Mostofi bunlardan bazılarıyken, Gleason derecelendirme sistemi tüm dünyada giderek daha fazla oranda kabul görmektedir⁽⁵²⁾.

Gleason sistemi; tümörün, küçük büyütmede tespit edilen, glandüler diferansiyasyon ve büyüme paterninin, stroma ile ilişkisine dayanır. Sitolojik özellikler tümör derecelendirmesinde rol oynamaz. Primer (en sık) ve sekonder (ikinci en sık) yapısal paternler belirlenip, 1'den 5'e kadar derecelendirilir. Gleason dereceleri 1 ile 5 arasında değişmekte olup, en sık görülen derece ile ikinci sıklıkta görülen derecenin toplamı Gleason skor'unu oluşturur. Gleason skor 2 ile 10 arasında değişmektedir. Birinci derece tümörler normale yakın bir özellik gösterirken, 5. derecede herhangi bir glandüler yapı görülmemektedir. Küçük ve iyi diferansiye tümörler (1. ve 2. derece) genelde organa sınırlı iken, büyük (4 cm³'ten büyük) ve kötü diferansiye tümörler (4. ve 5. derece) genellikle lokal ileri evre ya da metastatiktirler. Gleason skor 2-4 iyi diferansiye tümör, Gleason skor 5-7 orta derecede diferansiye tümör, Gleason skor 8-10 ise kötü diferansiye tümörü temsil eder⁽⁵³⁾.



Şekil 2.3. Gleason derecelendirme sistemi ⁽⁵²⁾

Prostat Kanserinin evrenmesi klinik muayene, yardımcı tanı yöntemleri ve muayene bulgularına göre yapılır. Prostat karsinomunun evrelemede iki amaç vardır; prognozu tayin etmek ve hastalığın yaygınlığına göre uygun tedaviyi belirlemek. Günümüzde iki farklı evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bunlar ABD'deki birçok klinikte kullanılan ABCD sistemi (Jewet-Withmore sistemi) ile IUAC (İnternational Union Against Cancer) tarafından ortaya konulan TNM (Tumor, Node, Metastaz) sistemidir. Bu iki temel yöntemin kriterleri tablolarda ayrıntılı olarak verilmiştir^(54,55).

2.2.6 Prostat Kanserinde Tanı Yöntemleri

Prostat kanseri heterojen bir hastalıktır ve özellikle ileri evrede ve metastatik hastalıkta mevcut tedavi yöntemleri, hastaların yaşam sürelerini uzatmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle prostat kanserinin erken teşhisi, tedavide yüksek başarı açısından son derece önemlidir⁽⁵⁶⁾. Prostat kanseri tanısında kullanılan en önemli tanı araçları, serum PSA ölçümü, Parmakla Rektal Muayene (PRM) ve transrektal ultrasonografi (TRUS) dir. Testlerin tek veya beraberce kullanımı ile erken evredeki tedavi edilebilir Prostat kanserinin tanınması mümkün olmuştur⁽⁵⁷⁾.

2.2.6.1 Parmakla Rektal Muayene (PRM)

Bilinen en eski tanı yöntemidir. Erken tanıda ve tarama testi olarak kullanımını sınırlayan en önemli özelliği lokalize prostat kanseri vakalarını tanımlamadaki düşük duyarlılığıdır. Periferik zonda yerleşen tümörlerin palpasyonu mümkündür. Belli bir boyutun altında olanlar ve transizyonel zonda yerleşen tümörler PRM ile saptanamazlar. Bu nedenle PRM ile yapılan klinik evrelemenin doğruluk oranı %45-65'tir⁽⁵⁸⁾. TRUS ve PSA ile belirli oranda karsinom saptanan olguların bazılarında PRM'nin negatif olduğunun gösterilmesi diğer önemli bir noktadır. Lee, TRUS ile tanımladığı 1,5 cm' den küçük tümörlerin %41'inin bu yöntemle tespit edilemeyeceğini saptamıştır. Lee, TRUS ile PRM' ye oranla iki kat daha fazla kanser olgusunun tespit edilebileceğini belirtmiştir⁽⁵⁹⁾.

2.2.6.2 Transrektal Ultrasonografi (TRUS)

Transrektal Ultrasonografi (TRUS) ile ilgili yapılan çalışmalar ultrasonografi eşliğindeki sistematik biyopsilerin, kanseri en doğru biçimde evrelendirip, derecesinin belirlenmesini sağladığını göstermiştir⁽⁶⁰⁾. TRUS'un prostat kanseri tanısında duyarlılığı %80, özgüllüğü %60'tır. TRUS'un en önemli özelliği, PRM ile tanınamayan birçok kanser odağını tanımasıdır. Lee, prostat kanserinin tanısında TRUS'un tanısal duyarlılığının, PRM'ye göre iki kat daha fazla olduğunu savunmuştur. İyi prognostik özelliklere sahip tümörlerin hepsinin TRUS ile tanındığı, PRM ile ise %41'inin tanımlanabildiği belirtilmiştir⁽⁵⁹⁾.

2.2.6.3 Prostat Spesifik Antijen (PSA)

Son yıllarda prostat kanserinin erken teşhisindeki en önemli ilerlemelerden biri, bir kanser belirleyicisi olan Prostat Spesifik Antijenin (PSA) keşfidir. PSA, prostat hücrelerinde bulunan 33.000 Da ağırlığındaki bir glikoprotein ve bir serin proteazdır. Genç yetişkinlerde PSA' nın normal değerleri 0 – 4 ng/ml arasındadır. Prostat kanserli olguların çoğunda serum PSA miktarı yükselmekle birlikte, organa sınırlı olanların % 20 – 25' inde 4 ng/ml' nin altında seyreder⁽⁶⁰⁾. Farklılaşmamış androjen bağımsız prostat kanser hücreleri PSA üretemez. Bu durum, hormona dirençli hastaların bir kısmında PSA artışının görülmemesini açıklamaktadır. Her Prostat kanseri vakasında serum PSA değeri yüksek (>4.0ng/ml) değildir ve yüksek olan her vakada Prostat kanseri anlamına gelmemektedir. Prostat kanserinin erken tanısında serum PSA seviyesi PRM ile kombine edildiği zaman yararı daha da artmaktadır⁽⁶¹⁾.

2.2.7 Prostat Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Mevcut Yaklaşımlar

Prostat kanserinde tanıda belirlenen histolojik derecelere göre hastalar farklı stratejiler ile tedavi edilmektedir. Hastalığın organa sınırlı olarak seyrettiği erken evrelerde, tedavide genellikle operasyon ve/veya radyasyon tedavisi uygulanır. Ayrıca bu evrede radikal prostatektomi, kryoterapi ve HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) tedavi yöntemleride kullanılabilir^(62,63). Tümörün artık prostat bezi ile sınırlı olmadığı, ancak metastatik yayılıma dair belirtiye rastlanılmayan aşama, lokal ileri evre olarak tanımlanır. Lokal ileri evre hastalığın tedavisinde amaç, metastatik yayılım ve doku invazyonu riskini düşürmektir. Bu evrede, tedavide genellikle radyoterapi ve hormon tedavisinin birlikte kullanıldığı yaklaşımlardan yararlanılır. Ancak, hastalık erken evrede teşhis edilemediğinde ya da agresif formlarda, seminal vesiküllerin lokal invazyonu ile karakterize olan ileri evrelere geçiş, ve çoğunlukla kemiğe olmak üzere metastaz gerçekleşir. Metastatik hastalığın tedavisinde amaç, hastanın yaşam süresini uzatabilmek ve metastazın kemik ağrısı gibi başlıca semptomlarını önleyerek ya da kontrol altına alarak hastanın yaşam kalitesini artırmaktır. Bu evrede hastalara genellikle hormon tedavisi uygulanır. Bunlar orşiektomi, LHRH analogları ve maksimal androjen blokajı (LHRH analogları + Antiandrojenler)'dir⁽⁶⁴⁾. Androjen sentezini bloke edici ajanlarla muamele, hastalığın gelişimini bir süre geriletse de, bu tümörlerin hemen hemen hepsinde androjen yokluğunda tümör progresyonu devam eder^(65,66). Bu aşamada hastalığın progresyonunu yavaşlatmak amacıyla sitotoksik kemoterapi veya glukokortikoidlerle birlikte uygulanan radyoterapiden yararlanılır⁽⁶⁵⁾.

2.2.7.1 Prostat Kanserinde Kemoprevansiyon- Dosetaksel, Selenyum, Glutamin

Kemoprevansiyon, doğal veya sentetik bileşiklerin invaziv kanser gelişimini engellemesi, geriye çevirmesi veya önlemesi olarak tanımlanır. Farmakolojik veya doğal bileşiklerin kullanımı ile yapılan kemoprevansiyonun amacı, premalign lezyonlarda hasarlı hücrelerde apoptozisi indüklemek, DNA hasarını bloke veya inhibe etmektir. Karsinogenez çok basamaklı bir süreçtir. Neoplastik hücre gelişiminin herhangi bir basamağını etkileyerek bu ilerlemeyi durduracak bir ilaç, kemoprevansiyonda kullanılacak etkili ve ideal bir ilaç olarak kabul edilebilir. Ayrıca Kemoprevantif ajanlar; hücre içi sinyal yollar, onkojen yollar ile hücre dışı inflamasyon, oksidasyon ve kalıtsal genetik mutasyonlar gibi hücrenin kritik homeostatik mekanizmalarını düzenleyen hedeflerde rol oynarlar. Kanser oluşumunun önlenmesine yönelik çalışmalar çok zor ve karışık bir süreçtir. Kemoprevansiyon için geliştirilecek ajan sağlıklı kişiye zararlı olmamalı, kolay uygulanabilmeli ve ucuz olmalıdır^(67,68).

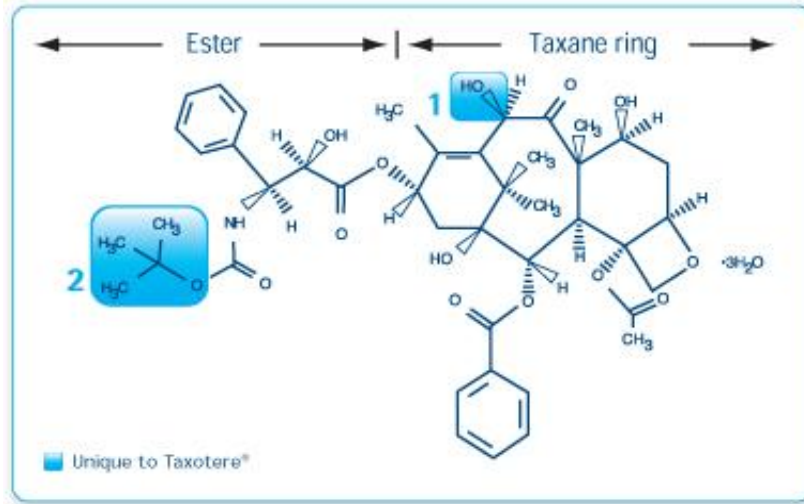
Kemoprevansiyon için en ideal kanserlerden biri de prostattır. Çünkü hastalık toplumda sık görülmekte, yavaş seyretmekte ve tarama yöntemlerinin faydası netleşmemiştir. Prostat kanseri dünya genelinde ikinci sıklıkta görülen yaygın bir kanser türüdür, yılda 900000 yeni vaka ve 258000 prostat kanserine bağlı ölüm söz konusudur⁽⁶⁹⁾. Prostat kanseri, başlangıcının uzun süreli latensi, yüksek insidansı ve yüksek mortalite hızlarından dolayı, kemoprevansiyon stratejileri için uygun bir kanser hedefi olabilir. Ayrıca hastalığın tedavisinin maddi boyutu da düşünülecek olursa önleyici faktörlerin önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır⁽⁷⁰⁾. Prostat kanseri tedavisinde kemoterapi sadece hormona dirençli hastalıkta kullanılmamaktadır. Kemoterapi yüksek riskli lokalize prostat kanserinde radyoterapi ve radikal prostatektomi sonrası veya öncesi rekürrensi azaltmak amacıyla ve hormon ablasyon tedavisiyle indüklenen ve kemoterapi yanıtını azaltabilecek bazı mutasyonlar ortaya çıkmadan önce hormonal tedaviye eklenerek kullanılabilir⁽⁷¹⁾.

Prostat kanserinin kemoprevansiyonu, karsinogenezisi farklı basamaklarda inhibe eden sentetik veya doğal ajanların kullanılması olarak tanımlanır. Amaç; etkili, toksik olmayan metastatik kanser, lokal ileri kanser ve normal epitelden prostat intraepitelyal neoplazi oluşumunu önleyen ajanların kullanımıdır. Bu amaçla NCI tarafından desteklenen çalışmalarla DFMO, DFMO ve/veya casodex, toremifen, vitamin D analogu, selektif COX-2 inhibitörü, sulindak, genistein ve soya proteinleri gibi ajanlar incelenmektedir⁽⁷²⁾. Prostat kanserinde NSAİİ'lerin kullanımı ile ilgili yayınlanan bir meta-analiz, aspirin kullanımı ile

prostat kanseri görülme sıklığının azaltılabileceğini ortaya koymuştur⁽⁷³⁾. 1990'lı yıllarda NCI tarafından 5 α -redüktaz inhibitörü finasterid kullanılarak "Prostat Cancer Prevention Trial" başlatılmıştır. Bununla birlikte, selenyum ve flutamidin birlikte kullanıldığı bir başka çalışma daha dizayn edilmiştir. Cilt kanseri hikayesi olan hastaları içeren, selenyum ve plasebo kullanımı olarak randomize edilen bir diğer çalışmada selenyum kullanımının prostat kanserini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir⁽⁷⁴⁾.

Prostat kanseri tedavisinde kemoterapi uygulamasının ilk adımları 1989 yılında Tannock ve arkadaşlarının sistemik prednizon tedavisinin dirençli hale gelmiş prostat kanseri hastalarında ağrı ve hayat kalitesi üzerinde olumlu etkilerini göstermeleriyle atılmıştır⁽⁷⁵⁾. Bu çalışmadan sonra Tannock ve arkadaşları prednizonla mitoksantron kombinasyonunu sadece prednizon alan hastalarla karşılaştırdıkları diğer çalışmalarında palyatif yararları gösterilebilmiş fakat sağ kalıma herhangi bir olumlu etkisi gösterilememiştir⁽⁷⁶⁾. Daha sonraki yıllarda mitoksantron ile yapılan başka kombinasyon çalışmalarında da sadece palyatif olarak faydalı olduğu gösterilmiştir⁽⁷⁷⁾. Taksan bazlı kemoterapi tedavilerinin hormon dirençli prostat kanserinde sağ kalıma etkisinin gösterilmesiyle birçok yeni kemoterapötik ajanın tek başlarına veya kombine olarak kullanımları araştırılmaya başlamıştır^(78,79).

Dosetaksel, Avrupa'da yetişen *Taxus baccata* bitkisinin yapraklarından ekstre edilen 10-deasetilbakkatin III'den yarısentez sonucu elde edilmiş bir taksoiddir. Dosetaksel yaşamsal mitotik ve interfaz hücresel fonksiyonlar için gerekli olan hücrelerdeki mikrotübüler ağı bozmak suretiyle etki gösteren bir antineoplastik ajandır. Dosetaksel tubulinin, stabil mikrotübüllerde toplanmasını teşvik ederken aynı zamanda bunların dağılmasını da inhibe eder. Dosetaksel'in mikrotubuluslara bağlanması bağlanmış mikrotübüllerdeki protofilament sayısını değiştirmez. Mitozda önemli olan tübülün molekülüne yüksek afinite ile bağlanıp stabil mikrotübül oluşumunu kolaylaştırır ve depolimerizasyonu önleyerek interfaz ve mitotik hücre fonksiyonlarını bozar. Bu bloke etme işlemi mitoz içciklerinin sayısını artırarak fonksiyon görmeyen fazla sayıda mikrotübül oluşumuyla sonuçlanır. Böylece mitoz gerçekleşemez. Proliferasyon durur ve hücre apoptoza gider⁽⁸⁰⁾. Dosetaksel'in çeşitli tümör hücresi dizilerine (meme, akciğer, ovaryum, prostat) ve klonojen tayinlerde yeni eksize edilmiş tümör hücrelerine karşı in vitro olarak sitotoksik olduğu tespit edilmiştir⁽⁸¹⁾.

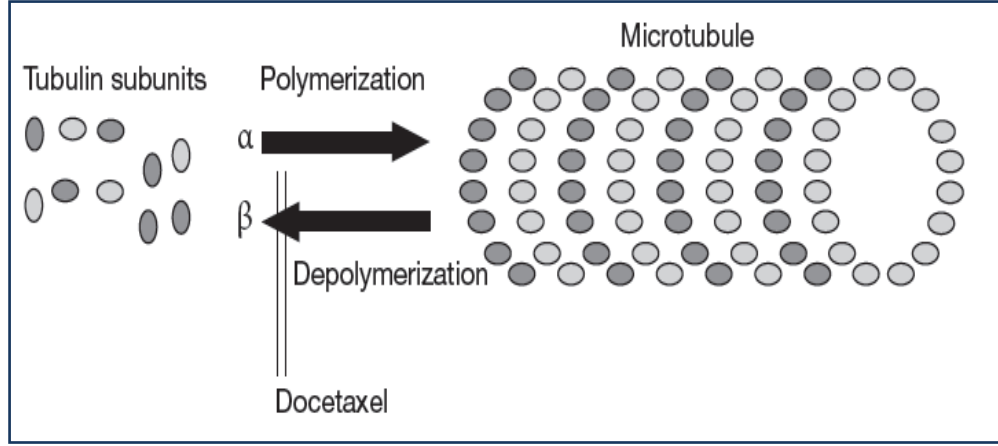


Şekil 2.4. Taxotere (Dosetaksel)'in Kimyasal Yapısı ⁽⁸²⁾

Taxotere hidroksil grubuna sahiptir. Bu ilave hidroksil grubu (şekil 2.4.'de 1 ile işaretli) Cremophor adlı çözücüye gerek kalmadan suda yüksek oranda çözünürlük sağlar. Ayrıca C-13 yan zincir varyasyonları ve özgün bir ester yan zincirine sahiptir (şekil 2.4.'de 2 ile işaretli)⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Lipofilik bir taksan olan dosetakselin hücre içine pasif difüzyon aracılığıyla alındığı bilinmektedir. Son çalışmalar taşıyıcı aracılı taksan transportuna kanıt sağlamıştır. Dosetakselin transporter'ların solute carrier (SLC) süper ailesinin üyeleri tarafından kanser hücresine alındığı tespit edilmiştir. Bu taşıyıcının ise SLC süper ailesinin SLCO ailesine ait OATP1B3 (organic anion transporting polypeptide 1B3/ SLCO1B3/OATP8) olduğu gösterilmiştir⁽⁸⁶⁾.

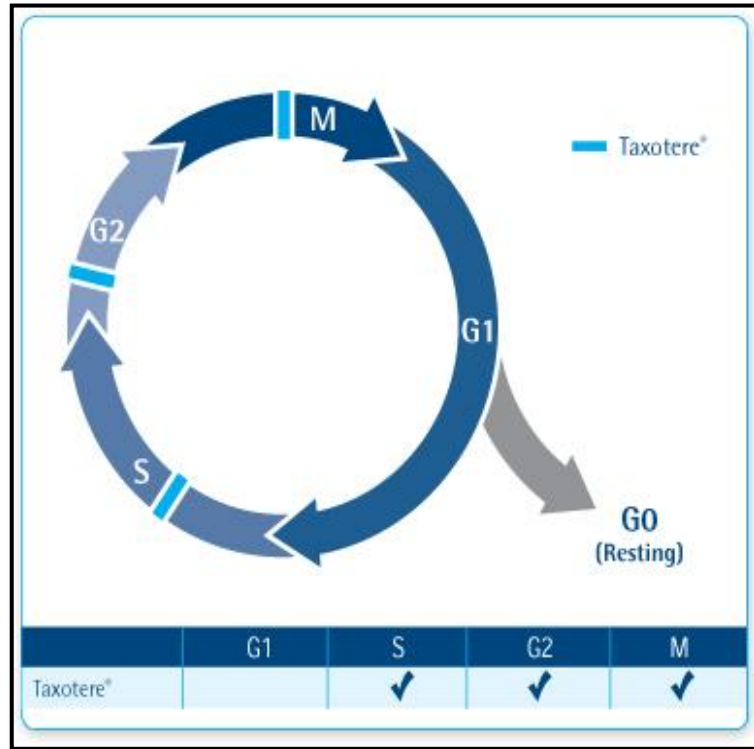
Taxotere (Dosetaksel)' in etki mekanizması apoptozis veya programlanmış hücre ölümüne doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunarak 3 farklı yoldan çalışmaktadır. Dosetakselin terapötik etkisinin asıl işlevi mikrotübül dinamiklerinin baskılanmasıdır. Diğer işlevleri ise; hücre döngüsünün bozulması ve Bcl-2 'nin fosforilasyonudur.

Dosetaksel polimerizasyon oluşmaya devam ederken mikrotübüllerin depolimerizasyonunu engeller. Bu hücre döngüsü arresti ve mitoz inhibisyonu dahil, hücresel faaliyetlerin bozulması ile sonuçlanır⁽⁸⁷⁾.



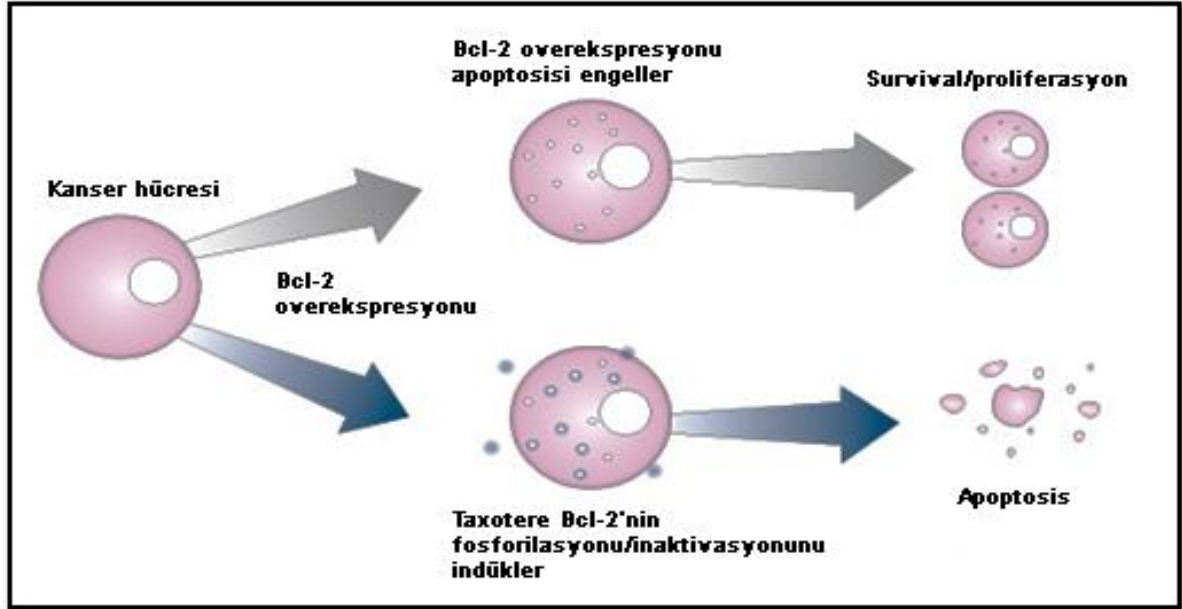
Şekil 2.5. Dosetaksel'in mikrotübüller üzerindeki etki mekanizması⁽⁸⁷⁾

Mikrotübül yapısına olan etkisinin yanı sıra, dosetaksel hücrenin yaşam döngüsünün 3 farklı aşamasını engelleyerek çalıştığı gösterilmiştir. S (sentez) aşamasında, G2 (büyüme-2) fazı ve M (mitoz) aşamasında hücre siklusu durmasına neden olduğu saptanmıştır. S fazında DNA iki katına çıkar, G2 fazında hücreler daha fazla büyür ve M fazında bölünmek için hazır hale gelir. Dosetaksel bu 3 hücre döngüsü fazına müdahale ederek hücrenin bir sonraki faza geçişini engeller ve apoptozise yönlendirir⁽⁸⁸⁾.



Şekil 2.6. Dosetaksel'in hücre döngüsü aşamaları üzerindeki etkisi⁽⁸⁸⁾

Dosetakselin etkisini gösterdiği üçüncü yolak ise; Bcl-2 fosforilasyonu indükleyerek apoptozisi başlatmasıdır. Kanser hücrelerindeki Bcl-2 'nin overekspresyonu apoptozisi engellemektedir. Dosetaksel Bcl-2'yi fosforilleyerek inaktif hale getirir ve hücre ölümünün oluşumunu sağlar⁽⁸⁸⁾.



Şekil 2.7. Dosetaksel'in Bcl-2 üzerindeki etkisi⁽⁸⁸⁾

2004 yılına kadar yapılan çalışmalarda prostat kanseri tedavisinde kemoterapinin yeri palyasyondan öteye gidememiştir. Fakat bu tarihten sonra yayınlanan iki adet faz III çalışmada dosetaksel içeren kemoterapi rejimlerinin sağ kalımı uzatabileceği bildirilmiştir^(25,89). Bu çalışmalardan ilki, hormon dirençli prostat kanserli 1006 hastanın değerlendirildiği TAX 327 çalışmasıdır. Bu çalışmada hastalar 3 gruba ayrılmıştır ve her gruba ayrı dozlar uygulanmıştır. Bu çalışmadaki median sağ kalım süreleri sırasıyla 18,9 ay, 17,4 ay ve 16,5 ay olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre ilk gruptaki sağ kalım istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkinci çalışma Southwestern Oncology Group (SWOG)'un çalışmasıdır. Bu çalışmada 770 hasta randomize edilmiştir ve dosetaksel ile estramustin kombinasyonu, mitoksantron ve prednizon kombinasyonu ile karşılaştırılmıştır. Sağ kalım süreleri 17,5 ay ve 15,6 ay olarak tespit edilmiştir. Fakat dosetaksel kolunda yan etkiler ve tedaviye bağlı ölüm oranı daha yüksek bulunmuştur. Bu yüksek oran tedaviye prednizon eklenmemesine bağlanmıştır⁽⁸⁹⁾.

Bunlara ilave olarak daha birçok klinik çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. Hepsinde temel amaç sağ kalımı uzatmak veya palyatif yararlar sağlamak olsa da çalışmaların büyük bir bölümünde yüksek yan etki oranları dikkati çekmektedir.

Dosetaksel'in şiddetli derecede görülen yan etkileri saç dökülmesi ve kemik iliği baskılanmasıdır. Buna ilave olarak orta derecede mukozit, ödem, hipersensitivite reaksiyonları ve cilt-tırnak değişiklikleri görülebilir. Bunlar arasında en önemli yan etkiler kemik iliği üzerine olan yan etkilerdir. Yan etkinin şiddetine göre doz kısıtlaması, tedaviye ara verilmesi ve granülosit monosit koloni stimüle edici faktörlerin (GM-CSF) kullanılması gerekebilir⁽⁹⁰⁾.

Dosetaksel içeren rejimlerin sağ kalımı uzattığı kanıtlansa da dosetaksel alırken progresyon gösteren hastalarda hala etkili bir ikincil kemoterapi rejimi yoktur. Bu yüzden dosetakselin etkinliğini arttıracak, yan etkilerini azaltacak yeni kemoterapotik ajanlar ve hedefe yönelik tedaviler ya da bunların kombinasyonları gündeme gelmektedir.

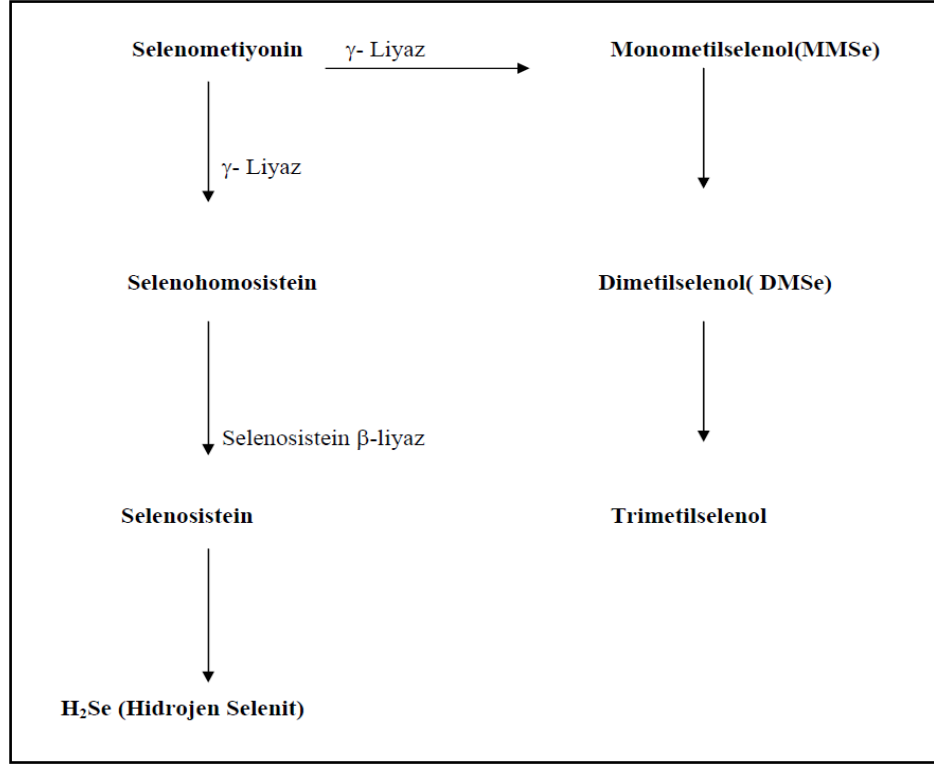
Selenyum, insan sağlığı için esansiyel besin olarak bilinen bir eser elementtir. Selenyum en az dört hücre dışı ve hücre içi glutatyon peroksidaz, üç tiroid ve tiroid dışı iodo-tironin 5 deidonaz, tioredoksin redüktaz ve selenoproteinler için gereklidir. Temel eser bir mineral olan selenyum, küçük miktarlarda serbest radikal hasarından hücreleri ve dokuları koruyan vitamin E ve C gibi çok önemli bir antioksidan, fakat daha büyük miktarlarda toksik olabilen bir mineraldir. Selenyum, periyodik cetvelde sülfür gibi kimyasal ve fiziksel karakterleri benzeyen elementlerin altında yer almaktadır. 1295'de Marco Polo tarafından hayvanlarda selenyum eksikliği ilk olarak rapor edilmiştir. 1930'larda çiftlik hayvanlarında alkali hastalıklara sebep olduğu gösterilmiştir ve 1957'de hayvanlar için temel olduğu saptanmıştır. 1969'da hayvanlarda selenyum yetersizliği ilk olarak tanımlanmıştır. 1973'de Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) enziminin kofaktörü olarak keşfedilmiştir. 1979'da insan sağlığı için öneminin ilk raporları gözlenmiştir. Selenyum, Berzelius tarafından 1817'de tanımlandıktan sonra Ay Tanrıçası Selen'den esinlenerek bu isim verilmiştir⁽⁹¹⁻⁹³⁾.

Prokaryotlarda formik dehidrogenaz ve ökaryotlarda glutatyon peroksidaz'ın bir bileşeni olan selenyum, hücre kültürlerinde hücrelerin büyümesi ve in vivo olarak normal büyüme ve gelişme için gereklidir. En yaygın formları selenit ve selenat olan selenyum, hayvanlarda selenosistein, bitkilerde selenometiyonin şeklinde bulunmaktadır. İnsanın selenyuma maruz kalması, sebze, tahıl ve tohumlarda yer alan organik form olan selenometiyoninin sindirimi ile meydana gelmektedir. Yetersiz selenyum alımı ve birçok

kanser türü riskinin artışı arasında bir ilişki olduğunu yapılan epidemiyolojik çalışmalar öne sürmektedir⁽⁹⁴⁾. Selenyumun yağ açıl peroksitleri ile hidrojen peroksitin yıkılmasında rolünün bulunduğu ve antioksidan bir etken olan E vitamininin de, selenyumun bu etkisini desteklediği düşünülmektedir. Serbest radikal süpürücü olarak rol oynayan selenyum, E vitamini ile birlikte çalışır ve oksidatif hasardan lipitleri koruyarak, hücre membran bütünlüğünün korunmasına yardım eder⁽⁹⁵⁾.

Canlı organizmalarda bulunan selenyum türleri kendi içinde enzim ürünleri ve gen ürünleri olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Enzim ürünleri, selenoaminoasit sentezine yol açan reaksiyonlar ve metilasyon, redüksiyon gibi enzimatik reaksiyonların ürünü olarak bulunurlar. Selenyum, selenosisteinil rezidüllerini kodlayan UGA kodonuna göre gen ürünlerini kapsar. Selenoproteinler, selenosisteinil rezidülleri formunda selenyum içerirler. UGA kodonu, selenosisteinil rezidüllerini kodlayarak, selenofosfat ve selenosisteinil tRNA'sına dönüştürüldükten sonra, büyük bir protein olan selenoprotein P, birçok glutatyon peroksidazlar gibi selenoenzimler, tip1-iyodotironin deiyodinaz (DI) ve tiyoredoksin redüktaz (TR) gibi oksidatif streslere cevap vermede çok önemli olan selenoenzimler olarak, selenoproteinler oluşturulur⁽⁹⁶⁾.

Selenometiyonin vücutta bulunan selenyumun doğal bir formudur. Eğer metiyonin yeterli miktarda bulunmazsa selenometiyonin protein yapımında kullanılamaz. Selenometiyonin, temel metiyonin aminoasitine benzer, fakat sülfür atomunun yerine, selenyum atomu geçmiştir. Vücudun kullanabildiği selenometiyonin formu; L-selenometiyonin'dir. L-selenometiyonin, bilinen diğer herhangi bir selenyum formuna göre, vücut komponentlerine daha iyi katılır ve daha iyi absorbe edilir⁽⁹⁶⁾. Selenometiyonin, selenyumun gerekli bütün 4 formunu sağlayabilir. Hâlbuki inorganik selenyum, selenosistein ve selenometiyonine dönüştürülmek zorundadır. Selenometiyonin, karaciğerde γ -liyaz tarafından ayrışır ve selenohomosistein ve selenosistein vasıtasıyla, metiyonine benzer bir metabolizmayla, hidrojen selenit'e metabolize olur. Ayrıca γ -liyaz enzimi ile direkt olarak da, diğer selenyum formlarının metabolik yolunda olduğu gibi, selenyumun metile formlarına dönüşür⁽⁹⁷⁾.



Şekil 2.8. Selenometiyonin'in metabolik yolu

Başta hücre zarlarını oksidatif zararlardan koruyan glutatyon peroksidaz olmak üzere birçok enzimin ögesidir. Spermatozoanın özel bir proteininin yapısında bulunur, purin ve pirimidin bazlarına bağlanabildiği için RNA'da fonksiyonu vardır, prostaglandin sentezinde, esansiyel yağ asitleri metabolizmasında rol oynar ve bağışıklık mekanizmasında önemlidir⁽⁹⁸⁾.

Selenyum bazı metabolik hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesinde rol oynayan antioksidan özellikteki glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin yapısında bulunur. Selenyumun biyolojik önemi bu enzimin bir ko-faktörü olmasından kaynaklanmaktadır. Her alt ünitesinde selenosistein şeklinde bir adet selenyum atomu içeren GSH-Px, hücre içinde hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya indirgenmesinde rol oynamaktadır. Selenyum, E vitamini ile etkileşerek lipid metabolizması sonucu oluşan peroksitlerin neden olduğu oksidatif hasarlardan hücre membranını korumaktadır⁽⁹⁹⁾.

Selenyumun Prostat kanserini önleyebileceğine ilişkin ilk çalışma Clark ve arkadaşları tarafından tıbbi öykülerinde deri kanseri olan 1312 erkek hastada yapılmıştır. Randomize edilerek günlük 200 µg selenyum verilen hastalar ile plasebo alan hastaların ortalama 4,5 yıllık takipleri sonrasında, selenyum destekli grupta üçte iki oranında prostat kanser insidansında azalma saptanmıştır⁽¹⁰⁰⁾. Selenyum'un in vitro olarak insan prostat kanser hücrelerinde büyümeyi durdurduğu, temel içeriği selenyum olan selenoproteinlerinin bazı

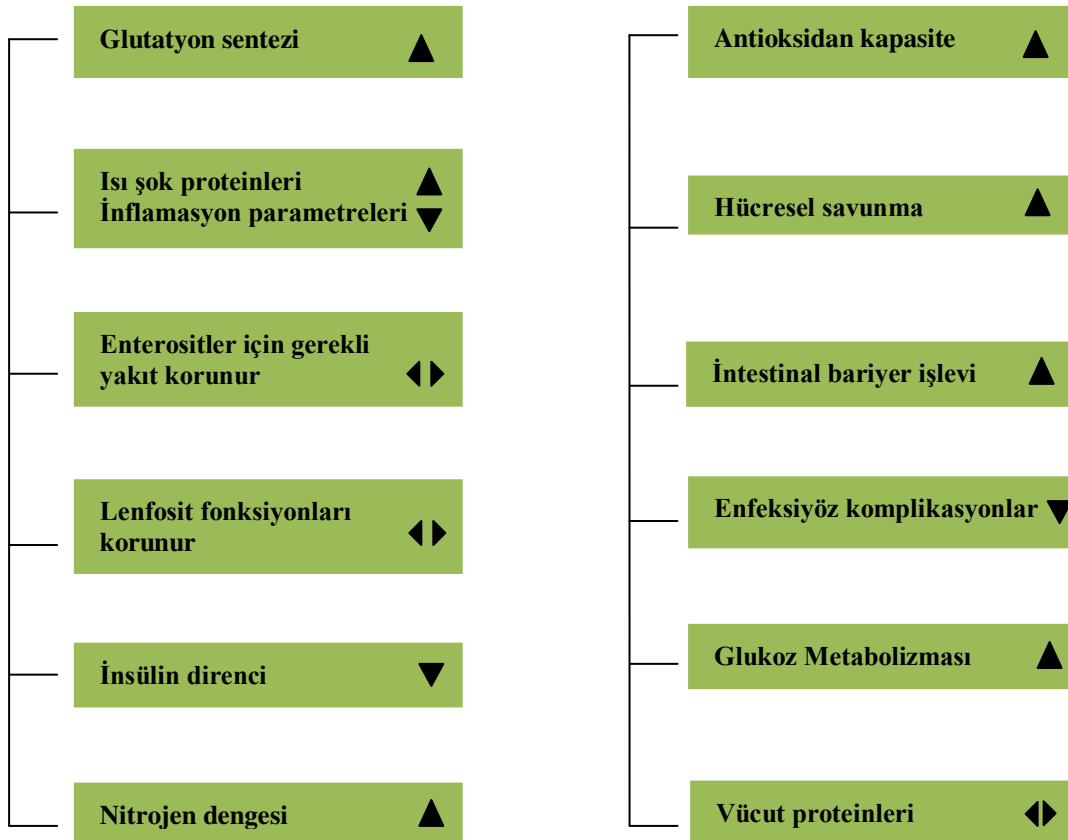
transgenik fare modeli ve insan prostat kanser hücrelerinde baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca insanlarda oral alınan selenyum'un selektif olarak prostat dokusu tarafından tutulduğunun gösterilmesi dikkatleri selenyum üzerine çekmiştir⁽¹⁰¹⁾. Anti oksidan etkisi, immün fonksiyonları arttırması, apoptosizi indüklemesi, hücre proliferasyonunu inhibe etmesi, karsinojen metabolizmasını azaltması gibi selenyum'un antikanserojenik etkisini açıklamada ileri sürülen çok sayıda potansiyel mekanizma vardır^(6,7).

Glutamin, esas olarak esansiyel olmayan aminoasit grubundadır. Ancak, deneysel çalışmalar, katabolik durumlarda esansiyel hale geçtiğini göstermiştir. Vücutta en çok bulunan amino asittir. İskelet kası serbest aminoasit havuzunun % 60'ını, plazmadaki serbest amino asit havuzunun ise % 20'ini oluşturur. Diğer amino asitlerin aksine sadece glutamin'in iki nitrojen atomu vardır ve nitrojen mekiği olarak bilinir. Vücudun en çok hangi bölgesinde gereksinim varsa o bölgeye nitrojen taşır⁽¹⁰²⁾. Glutamin; vücutta hızlı çoğalan hücrelerin önemli bir metabolik substratıdır ve sistemik dolaşıma büyük oranda iskelet kasından sentez edilip salınır. İntrasellüler glutamat organlar arası nitrojen ve karbon taşıyıcısı olarak rol alır. Önemli bir enerji kaynağıdır ve protein sentezi ve hücresel koruyucu sistemler için gereklidir. Major antioksidan GSH sentezi için prekürsördür. Glutamin, enterositler, kolonositler ve immün sistem hücreleri tarafından ana yakıt ve substrat kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ısı-şok proteinlerinin sentezini uyarır⁽¹⁰²⁾. Bunlara ek olarak, glutamin hücre volümünün osmotik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hem hücre içi protein sentezini uyarır hem de proteinlerin fosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu aminoasidin eksikliği sonucu, lenfositlerde antijenlere karşı gelişecek aktivasyon sinyalinin oluşmadığı; monositlerde ise antijenleri tanıma ve fagositozda bazı aksaklıklara neden olabileceği ileri sürülmüştür⁽¹⁰³⁾.

Glutamin ile zenginleştirilmiş ND verilen erişkin hastaların, kemik iliği transplantasyonu, şiddetli travma ve yanık sonrası hastane enfeksiyonu oranlarının daha düşük olduğu, benzer olumlu etkinin yoğun bakım desteğine gereksinimi olan prematüre bebeklerde de görüldüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte, glutaminin nozokomiyal enfeksiyon riskini azaltma mekanizmaları kesinlik kazanmamıştır. Potansiyel mekanizmalardan biri glutaminin immün sistem hücreleri tarafından yakıt veya regülatör substrat olarak kullanılmasıdır. Rat ve insan lenfosit proliferasyonunun glutamine bağımlı olduğu açıkça gösterilmiştir. Deneysel ve klinik olarak elde edilen diğer veriler de glutamin desteğinin immün sistem hücre sayısı ve fonksiyonundaki potansiyel etkilerini ortaya çıkarmaktadır. Parenteral nütrisyon ile yüksek

doz glutamin verilen allojenik kemik iliği alıcılarında nötrofil fonksiyonları etkilenmezken, taburcu olduktan sonraki iki haftalık süreçte total lenfosit, T-lenfosit, CD4 ve total CD8 fonksiyonlarında, glutamin verilmeyen kontrol grubuna oranla anlamlı fonksiyon artışı saptanmıştır. Hastaların postoperatif döneminde alanil-glutamin dipeptid içeren parenteral ND ile operasyondan altı gün sonra plazma lenfosit düzeylerinde ve polimorfonükleer nötrofil granüositlerinde lökotrienlerin oluşumunda artış saptanmıştır⁽¹⁰⁴⁾. İnsan immün sistem hücreleri ile yapılan deneysel çalışmalar, sitokin üretimi, lenfosit proliferasyonu ve lenfokin ile aktive olan öldürücü hücre aktivitesinin dışarıdan verilen glutamine bağlı olduğunu düşündürmüştür⁽¹⁰⁵⁾.

Bugüne kadar elde edilen veriler, glutaminin insan immün sistem hücreleri için önemini kuvvetle desteklemektedir. Glutamin içermeyen standart intravenöz (IV) beslenme ürünlerinin bazı hastalardaki belirgin immünsüpresif etkisi göz önünde tutularak, glutaminin immün sistem hücreleri üzerinde gösterdiği etkinin önemi vurgulanabilir⁽¹⁰⁶⁾.



Şekil 2.9. Glutamin'in organizmadaki görevlerini açıklayan potansiyel mekanizmalar⁽¹⁰⁷⁾

N(2)-L-alanil-L-glutamin dipeptidi endojen olarak kendiliğinden glutamin ve alanin aminoasitlerine parçalanır, böylelikle infuzyon solüsyonu parenteral beslenme için gerekli glutamini sağlar. Açığa çıkan aminoasitler besin maddesi olarak kendilerine ait vucut depolarında toplanırlar ve organizmanın ihtiyaçları doğrultusunda metabolize edilirler. Parenteral beslenmenin endike olduğu birçok hastalıkta vücudun glutamin depoları boşalır. Glutamin içeren infuzyon uygulamaları bu bozukluğu düzeltir. Bazı araştırmacılar doxorubicin, methotrexate ve 5-fluorouracil ile yapılan kanser kemoterapi tedavilerinin yan etkilerinin azaltılmasında ve etkinliğinin artırılmasında glutamin suplementasyonunu önermektedir. Ön klinik çalışmalar glutamin suplementasyonunun meme ve diğer kanser türleri için kullanılan paklitakselin oluşturduğu sinir hasarını engellemede yararlı olduğunu ortaya koymuştur⁽¹⁰⁸⁾.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Araştırma invaziv olmayan deneysel çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırma Mart 2011- Mart 2012 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Onkoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları:

-

3.4. Çalışma Materyali:

Araştırmada çalışma materyali olarak DU145 (insan prostat karsinomu beyin metastazı yüzeye bağımlı) ve PC-3 (insan prostat karsinomu kemik metastazı-yüzeye bağımlı) hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları ticari olarak Mart-2011’de ATCC firmasından temin edildi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Araştırmanın bağımlı değişkeni prostat kanseri hücre hatları, bağımsız değişkenleri ise dosetaksel, selenyum ve glutamin’dir.

3.6. Veri Toplama Araçları:

3.6.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1. Projede kullanılan mevcut makine - teçhizat listesi

ADI/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Air-flow kabinet - (Kojair)	Hücre kültürü çalışmaları için kullanıldı.
CO ₂ inkübatörü - (Thermo Forma Steri-cycle)	Hücrelerin belli sıcaklık ve CO ₂ içeren ortamda saklanması amacıyla kullanıldı.
Otoklav - (Hirayama Hiclave)	Pipet vb. malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanıldı.
Etüv - (Thermo Heraeus)	Steril edilmiş malzemeleri kurutmak için kullanıldı.
Distile su cihazı (uv plus ultra pure water system)	Su banyosu ve temizlik amacıyla kullanıldı.
İnverted mikroskop - (Olympus CKX41)	Hücrelerin kontrolü ve hücre sayımı amacıyla kullanıldı.
Su Banyosu - (GFL)	Hücre ortamları ve kimyasallar için kullanıldı.
Soğutmalı Santrifüj - (Sigma 3-16K)	Hücre kültürü ve Flow sitometri çalışmalarında kullanıldı.
Elisa Plate Reader-(Thermo Multiskan ascent)	Hücre canlılık testi sonuçlarının alınması için kullanıldı.
Sıvı Nitrojen Depolama Tankı - (MVEXLC)	Hücre hatlarının saklanması için kullanıldı.
Derin dondurucu (-80) - (Sanyo)	Hücre hatlarının saklanması için kullanıldı.
Buzdolabı (-20,+4) - (Siemens)	Kimyasalların saklanması için kullanıldı
Flow Sitometri - (BD FACSCalibur)	Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanıldı.
Pipetör - (Holtel PIA)	Hücre Kültürü çalışmasında kullanıldı.
Mikropipet(10-100-1000µl) - (Eppendorf)	Küçük miktarda solüsyonlarla çalışmak için kullanıldı.

3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler

Tablo 3.2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler

Hücre Kültürü, Hücre Canlılık Testi, Hücre Döngüsü Analizi, Apoptoz Tayini için Kullanılan Malzemeler		
Maddenin Adı	Özellği	Markası-Lot No:
D-MEMF-12 (1:1) (1X)	liquid with L-Glutamine, 15 mM HEPES, 500ml	Invitrogen - 1025441
RPMI 1640 Medium (1X)	liquid with L-glutamine, 500ml	Invitrogen - 931397
Foetal Bovine Serum	Heat Inactivated Origin: EU Approved 500ml	Invitrogen – 07Q7218K
Trypsin 0.25% (1X) with EDTA 4Na	liquid 100ml	Invitrogen - 1089202
Penisilin / Streptomisin	5ml, lyophilized	Biochrom AG – 0110M01345
Amfoterisin B	50 mg 1 flakon	Ambisome
Cell Counting Kit-8	3000 testlik	Sigma – BCB0129
Microtest 96 Well Plate	Steril	Becton Dickinson – 2014-90
Tubes with round bottom, Polystyrol	5ml, 125 Pieces/sterile bag	BD Falcon
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	40 Testlik	BD Pharmingen - 77077
CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit	40 Testlik	Cycle TEST PLUS - 85098
Cell Strainer-System	35µm cell strainer in 5ml round bottom Tubes, sterile	BD Biosciences
1000 µl ‘lik Filtreli Pipet ucu	Steril, DNase/RNase yok	Expell Plus
200 µl ‘lik Filtreli Pipet ucu	Steril, DNase/RNase yok	Expell Plus
100 µl ‘lik Filtreli Pipet ucu	Steril, DNase/RNase yok	Expell Plus
10 µl ‘lik Filtreli Pipet ucu	Steril, DNase/RNase yok	Expell Plus
Parafilm	4 in x 125FT	American National Can
Otoklav Bandı	Beyaz çizgili	SUSSEX
12ml’lik steril tüp	Steril, non pyrogenic, DNase RNase Free	Cell Star
Lateks Eldiven	Pudrasız	Beybi
10ml’lik pipet	Steril	Santa Cruz - 110513070
5ml’lik pipet	Steril	Greiner bio-one – R49
25 cm ² ’lik Flask	Steril, Filtreli	Greiner bio-one - 05460140
75 cm ² ’lik Flask	Steril, Filtreli	Greiner bio-one - 06040142
50ml’lik Falkon	Sterilized by gamma irradiation non pyrogenic	Santa Cruz
2ml’lik Cryovial	Steril, Non pyrogenic, DNase-RNase Free	Cell Star
Tripan Blue	% 0.4	Sigma – 82K2368
DMSO	10x10ml Multi dose container	CryoSure-DMSO
L-Glutamin	100ml	Fresenius Kabi
Taxotere	20mg, IV infüzyon çözeltisi içeren flakon	Sanofi Aventis- 338966
Microtest 6 Well Plate	Steril	Becton Dickinson – 96180134
PBS(Phospate Buffered Saline)	Tablet	Sigma – 095K8210
L-Selenometiyonin	100 mg	Sigma - A1810
Dipeptiven	100 ml, solüsyon	Fresenius Kabi – 16DK0207
DMSO	10ml, Steril	Cryosure – USP020910A2
Bakır sülfat(CuSO ₄)	25g	Sigma - A736291651
Savlon	100 lt	Sigma
ES 7X	1 galon	MP Biomedicals - 090559

3.6.3. Uygulanan Yöntemler

3.6.3.1 Hücre Kültürü

3.6.3.1.1 Hücre Hattı Özellikleri

Denemeler 2 adet yüzeye bağımlı (monolayer hücre kültürü) prostat kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi.

PC-3 hücre hattı insan prostat adenokarsinomu androjen bağımsız kemik metastazı hücre hattıdır. PC-3 düşük testostosterone-5-alpha reductase aktivitesine sahiptir ayrıca PSA ekspresyonu yoktur ve PSMA (Prostate-specific membrane antigen) negatiftir. PTEN ve p53 mutasyonu vardır.

DU-145 hücre hattı ise prostat karsinomu epitelyal hücre hattıdır. Androjen bağımlı beyin metastazından köken almıştır. PSA eksprese etmemektedir ve 5-alpha reductase aktivitesine sahip değildir, p53 mutasyonu vardır. Her iki hücre hattı da ATCC'den satın alındı⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.1.2 Hücre Hatlarında Kullanılan Solüsyonlar

Ortam ve içeriği

- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture Ham's F-12 (DMEM / F-12) medyumunu invitrogen'den satın alındı ve +4 °C 'de saklandı.
- Fetal Bovine Serum-heat inactivated (fetal sığır serumu), L-glutamin (200mM-100X), Penisilin/streptomisin, Amfoterisin B invitrogenden satın alındı ve - 20 °C'de saklandı.

Diğer Solüsyonlar

- Trypsin-EDTA % 0,25'lik (Trypsin-Etilen diamin tetraasetik asit) ve PBS (Fosfat tamponlu tuz) invitrogenden alındı. DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Trypan Blue ise sigmadan temin edildi⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.1.3 Hücrelerin Kültürde İdamesi

DU145 ve PC-3 hücre hatları % 5 oranında FBS, % 1 L-glutamin içeren DMEM/F-12 (1:1) medyumunda kültüre edildi. Ayrıca bakteri kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisinden oluşan antibiyotik solüsyonundan %1 oranında; mantar kontaminasyonunun engellenmesi amacıyla ise amfoterisin B solüsyonundan da %1 oranında kültür medyumuna ilave edildi. Hücreler 75cm² kültür flasklarına ekildi. 37 °C'de 5 % CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Kültür flasklarında üretilen her iki hücre hattı da %80 yoğunluğa ulaşana kadar iki günde bir beslendi. Bu yoğunluğa gelen flasklardaki hücrelerin çoğaltılması amacıyla pasajlama işlemi uygulandı⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.1.4 Hücrelerin Pasajlanması

Steril cam pastör pipetleri kullanarak ortam hücrelerden uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca ve Mg⁺ içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 75cm² 'lik flasklar için 5ml, 25 cm² 'lik flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu hücreleri yapıştıkları flaskın yüzeyinden kaldırmak amacıyla ilave edildi. Flasklar 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 1-2 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerin tamamen flask yüzeyinden kalktığından emin olmak amacıyla inverted mikroskop altında kontrol edildi. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldığında tripsinin inhibisyonu amacıyla konulan tripsin hacminin en az 2 katı kadar ortam flaska ilave edildi. Flask içindeki ortam, tripsin ve hücre içeren süspansiyon aspire edilerek falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst faz (supernatant) atıldı. Falkon tüpünün dibinde gözlenen hücre peleti üzerine 10 ml kültür ortamı ilave edildi ve pipet ucuyla hücreler süspanse edildi. Pasajlamanın 1:5 oranında olması amacıyla her flaska 2 ml süspanse haldeki kültür ortamından paylaştırılarak üzerelerine gerekli miktarda ortam eklendi. Çoğalması için 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.1.5 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Tripsin-EDTA aracılığıyla flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine dondurma medyumunu konularak resüspanse edildi ve 2ml'lik cryoviallere dağıtıldı. Hücrelerin dondurma medyumunu içerisinde kademeli olarak dondurulması amacıyla önce -20 °C de 2 saat, -80 °C'de 1 gün bekletildikten sonra -196 °C'deki sıvı nitrojene alındı. Her iki hücre hattı içinde dondurma medyumunu olarak % 5 DMSO içeren complete medyum kullanıldı. Cryovialler üzerine tarih, hücre hattı ismi, pasaj no, çalışan kişi adı kodlandı⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.1.6 Hücrelerin Çözülmesi

Hazırlanan ortam 37 °C'de su banyosu ya da pastör fırınında inkübe edildi. Kabinette steril ortamda flasklar üzerine tarih, pasaj no, hücre hattı ismi, kişi adı kodlandı ve flask içine inkübe edilmiş kültür ortamından gerekli miktarda konuldu. Hücre sıvı nitrojen tankından çıkarılarak hızlı bir biçimde 37 °C' ye getirilmiş olan su banyosunda çözüldü. Cryovial steril edildikten sonra kabinete alındı ve içindeki hücre süspansiyonu çekilerek hazırlanmış olan flask içine ilave edildi. Flask 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilerek idamesi sağlandı⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.1.7 Hücrelerin Sayılması

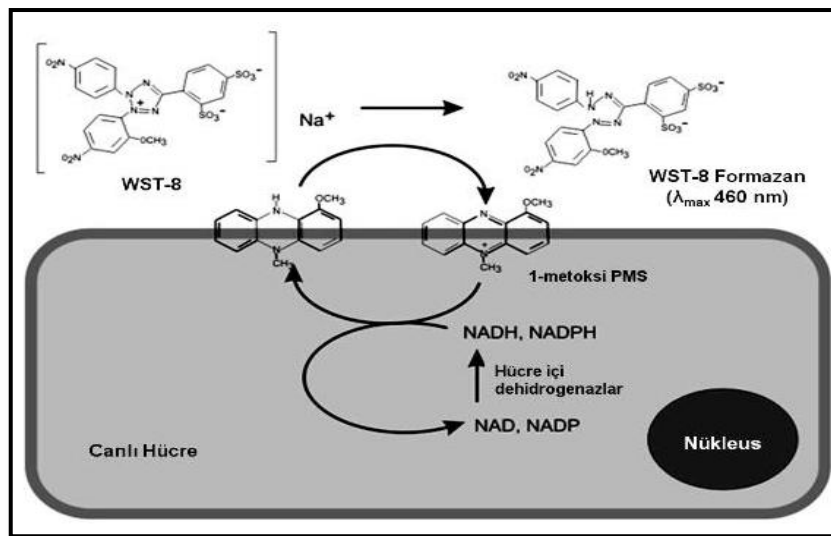
Thoma lamı distile su, alkol ve tekrar distile su sıralamasıyla temizlendi. Mikroskop altına konulan thoma lamının üzeri hafifçe ıslatılarak lamele yapıştırıldı. Santrifüj sonrası elde edilmiş olan pellet üzerine hücre sayısına bağlı olarak ortam (2, 5, 10ml) ile resüspanse edildi. 1:1 oranında tripan mavisi ile hücre süspansiyonu steril eppendorf içinde birleştirildi (50µl:50µl). Thoma lamının her iki tarafındaki lam ve lamelin birleştiği ortadaki kapiller boşluklara 10'ar µl tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyonu verildi. 16 büyük kareyi barındıran thoma lamının yüzeyinde tüm hücreler sayıldı (10x'lik büyütmede). Sayılma esnasında üst ve sol dahil sağ ve alt çizgi hariç olarak sayıldı. Thoma lamının her iki tarafındaki karelerde sayılan hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Sayılan ortalama hücre sayısı x Dilüsyon faktörü x 10⁴ formülü ile 1ml'deki hücre sayısı bulundu⁽¹⁰⁹⁾.

3.6.3.2 Hücre Canlılık Testi

3.6.3.2.1 Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada hücre canlılık testi olarak Dojindo Laboratories (Gaithersburg, MD, USA) firmasından temin edilen CCK-8 (Cell Counting Kit-8) kullanıldı. Hücre canlılık testi hücrelerin, dosetaksel, selenyum ve glutamin ile muamelesinin takibinde gelişen sitotoksik cevabının saptanması amacıyla yapıldı.

WST'ler (Suda çözünebilen tetrazolium tuzları) suda çözünebilen formazanları oluşturmaktadır. WST-8 oldukça stabil bir WST'dir ve CCK-8 testinde kullanılmaktadır. Elektron taşıyıcısı oldukça stabil olan 1-Methoxy PMS 'dir⁽¹¹⁰⁾. Tetrazolium tuzu yani WST-8, 1-Methoxy PMS 'nin indirgenmiş formuyla beraber reaksiyona girerek indirgenir. Bu taşıyıcı hücre membranında bulunmaktadır ve NADH (nicotineamido adenine dinucleotide reduced form) ya da NADPH (nicotineamido adenine dinucleotide phosphate reduced form) ile doğrudan reaksiyona girer. NADH ve NADPH laktat dehidrogenaz ve laktik asit gibi dehidrogenaz enzimleri ve substratlarının reaksiyonları ile NAD⁺ ve NADP⁺'den oluşur. Bu nedenle tetrazolium tuzu dehidrogenazın aktivesinin ya da substratının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Canlı hücrelerde bulunan dehidrogenazlar tarafından WST-8'in indirgenip oluşturduğu formazan ürünü solüsyona 460 nm'de pik absorbands veren güçlü bir renk oluşturur ve bu rengin yoğunluğu mikropate okuyucuda ölçülür. WST-8'in hücre sitotoksitesisi ölçümündeki hassasiyeti, diğer tetrazolyum tuzları olan MTT, XTT, MTS veya WST-1'den çok daha yüksektir⁽¹¹¹⁾.



Şekil 3.1. WST-8 ' in formazana indirgenme mekanizması⁽¹¹¹⁾

3.6.3.2.2 Dosetaksel, Selenyum ve Glutamin'in Hazırlanması

- Dosetaksel (MW: 808gr) ilaç çözeltisinin konsantrasyonu 10 mg/ml yani 10.000 μM 'dır. Bu stok solüsyondan seri dilüsyonlar ile 1000 μM , 100 μM , 10 μM ve 1 μM olmak üzere 4 farklı ara stok solüsyonları hazırlandı. 1 μM 'lık ara stoktan 750nM, 500nM, 250nM, 100nM, 10nM ve 1nM'lık solüsyonlar hazırlandı. 100 μM 'lık ara stoktan ise 20 μM , 30 μM , 40 μM ve 50 μM 'lık diğer solüsyonlar hazırlandı.
- L-Selenometiyonin (MW: 196.1gr) hassas terazide 10 mg tartıldı ve üzerine 12,5 ml apirojenik distile su eklendi. Laminer flow kabin içerisinde filtreden geçirilerek sterilitesi sağlandı. Hazırlanan bu 4000 μM 'lık stok solüsyondan 1000 μM 'lık ara stok oluşturuldu. 1000 μM 'lık ara stok solüsyonundan 10 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM ve 750 μM 'lık solüsyonlar oluşturuldu.
- Kullandığımız glutamin (MW: 146gr) (Dipeptiven) çözeltisinin konsantrasyonu 100.000 μM 'dır. Bu stok solüsyondan seri dilüsyonlar ile 10 μM 'lık ara stok solüsyonu hazırlandı. 10 μM 'lık ara stok solüsyonundan 2 μM , 5 μM , 7 μM ve 10 μM 'lık solüsyonlar oluşturuldu.
- Ana ve ara stok solüsyonlar, her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.6.3.2.3 Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Öncelikle hücreler sitotoksisite testine tabi tutulmadan önce farklı sayılardaki hücrelerin absorbans değerleri elde edilerek hücre-absorbans eğrileri oluşturulmuştur. Bunun nedeni her hücre tipi için uygun hücre sayısı ve renklenme zamanının belirlenmesidir.

Sitotoksisite testi için ise; PC-3 ve DU-145 hücreleri adheren (yüzeye yapışan) hücreler olduklarından dolayı tripsinizasyonla kültür flaskından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 96 well-plate'in her kuyucuğuna 200 μl 'de 10.000'er hücre gelecek şekilde verildi. Sonra hücrelerin yapışması için 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat ön inkübasyona bırakıldı.

96 well-plate'lerin kuyucuklarından mediumlar çekilerek, yerine yukarıda belirtilen dosetaksel, selenyum ve glutamin için hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki solüsyonlardan her doz için 200 μl hacimde olacak şekilde ilgili kuyucuğa konuldu. Her grup için 8 kuyucuk olacak şekilde gruplar hazırlandı. Ayrıca ilaç uygulanmadan sadece hücre ve mediumdan oluşan kontrol grubunda oluşturuldu⁽¹¹⁰⁾.

Hücre canlılık testi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına, 96 kuyucuklu steril hücre kaplarında Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de belirtildiği gibi ilaç uygulandı.

Tablo 3.3. Sitotoksosite deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına verilen dosetakselin 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
B	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
C	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
D	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
E	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
F	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
G	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.
H	Kontrol	10nM Doc.	100nM Doc.	250nM Doc.	500nM Doc.	750nM Doc.	1µM Doc.	10µM Doc.	20µM Doc.	30µM Doc.	40µM Doc.	50µM Doc.

Tablo 3.4. Sitotoksosite deneyi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına verilen selenyum ve glutamin’in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
B	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
C	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
D	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
E	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
F	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
G	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln
H	Kontrol	10µM Se	50µM Se	100µM Se	250µM Se	500µM Se	750µM Se		2µM Gln	5µM Gln	7µM Gln	10µM Gln

Dosetaksel, selenyum ve glutamin ile muamele edilen hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. 24 ve 48 saatlik ilaca maruziyet sonucunda ilaç kalıntılarının CCK-8 ile girişim olasılığını ortadan kaldırmak için 2 kere PBS ile yıkandı. Son olarak 100 µl PBS her kuyuya verildi ve 10 µl CCK-8 verildikten sonra 3 saat 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 450nm (Referans dalga boyu-650nm) dalga boyunda canlı hücrelerin ürünü olan formazanın oluşturduğu absorbands ölçümleri mikropate okuyucudan alındı. Elde edilen absorbands değerleride kontrol grubu ile kıyaslanarak canlı hücre oranı belirlendi. Hücre canlılık testi her ilaç grubu için 8 kuyucukta ve birbirinden bağımsız deneyler olarak ise üç farklı zamanda tekrarlandı⁽¹¹⁰⁾.

3.6.3.3 Akım Sitometri Analizleri

3.6.3.3.1 Apoptoz Analizi (Annexin V yöntemi)

3.6.3.3.1.1 Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada apoptoz analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I ile gerçekleştirildi. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı, apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçüldü. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak Propidyum iyodür (PI) eklendi. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile boyanma farklılığına göre hücreler aşağıdaki gibi birbirinden ayrımlandı⁽¹¹²⁾;

- Canlı hücreler (FITC-PI-),
- Erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve
- Geç apoptotik (FITC+PI+)
- Nekrotik hücrelerin (FITC+PI+)

3.6.3.3.1.2 Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

PC-3 ve DU-145 tripsinizasyonla kültür flaskından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan blue sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 6'lı well-plate'lerin her kuyucuğuna 50.000 hücre verildi ve total hacim 3,2 ml'ye tamamlandı. 72 saatlik ön inkübasyondan sonra hücre canlılık testinde dosetaksel, selenyum ve glutamin için belirlenen IC₅₀ dozlar kuyucuklara verildi. 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik ilaca maruziyet sonrasında 6'lı well-plate'lerdeki ortamlar çekilip 17x100 mm'lik tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 500 µl tripsin eklenip hücreler kaldırıldı. 1ml ortamla tripsin inaktivasyonu yapıldı ve çekilip 17x100 mm'lik tüplere ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve supernatant uzaklaştırıldı. Her tüpe 400'er µl binding buffer eklendi ve resüspanse edildi. Tüplere önce 5'er µl AnnexinV daha sonra 5'er µl PI eklendi. Tüpler karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası tüplere 400'er µl binding buffer eklendi ve cihaza verildi. Erken apoptoz, Geç apoptoz, nekroz ve canlı hücre oranları çift lazerli akım sitometrisinde değerlendirildi. Apoptoz analizi için PC-3 ve DU-145 hücrelerine, 6 kuyucuklu steril hücre kaplarında Tablo 3.5. 'de belirtilen dağılımda ilaç uygulandı⁽¹¹²⁾.

3.6.3.3.2 Hücre Döngüsü Analizi

3.6.3.3.2.1 Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada hücre döngüsü analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen Cycle Test Plus DNA Reagent Kit ile gerçekleştirildi. Hücrelerin hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğunun belirlenmesi için yapılan işlemdir. Propidium iodide boyasının hücrelerin DNA'sına bağlanıp ışımaya vermesi temeline dayanır. Bağlanan boya miktarı her bir hücredeki total DNA miktarı ile orantılıdır⁽¹¹²⁾.

3.6.3.3.2.2 Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

PC-3 ve DU-145 tripsinizasyonla kültür flaskından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan blue sayım yöntemi ile Thoma lamında sayılarak 6'lı well-plate'lerin her kuyucuğuna 50.000 hücre verildi ve total hacim 3,2 ml'ye tamamlandı. 72 saatlik ön inkübasyondan sonra hücre canlılık testinde dosetaksel, selenyum ve glutamin için belirlenen IC₅₀ dozlar kuyucuklara verildi ve 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik ilaca maruziyet sonrasında 6'lı well-plate'lerdeki ortamlar çekilip 17x100 mm'lik tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 500 µl tripsin

eklenip hücreler kaldırıldı. 1ml ortamla tripsin inaktivasyonu yapıldı ve çekilip 17x100 mm'lik tüplere ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve supernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml tampon solüsyonu (Dimetilsülfoksit içeren sükröz-sitrat tamponu) eklendi ve hücreler resüspanse edildi (yıkama işlemi). 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve supernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra boyama işlemine geçildi ve bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Yıkama işlemlerinin ardından tampon solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 250 µl solüsyon A (Tripsin içeren sitrat tamponu) her tüpe eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra solüsyon A uzaklaştırılmadan 200 µl solüsyon B (Tripsin inhibitörü ve RNAz içeren sitrat tamponu) tüpelere eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. +4 °C 'de muhafaza edilmiş olan solüsyon C (propidium iyodür boyama solüsyonu) her tüpe 200'er µl olacak şekilde eklendi. Buz üzerinde 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Solüsyon C eklendikten sonra 3 saat içerisinde örnekler çift lazerli akım sitometri cihazında analiz edildi. G0/G1, sentez fazı ve G2+Mitoz fazına ait hücreler ModFitLT3.2 programı kullanılarak yüzde (%) olarak değerlendirildi. Hücre döngüsü analizi için PC-3 ve DU-145 hücrelerine, 6 kuyucuklu steril hücre kaplarında Tablo 3.5'de belirtilen dağılımda ilaç uygulandı⁽¹¹²⁾.

Tablo 3.5. Apoptoz ve hücre döngüsü analizi için PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına verilen dosetaksel, selenyum ve glutamin'in 6 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı

		1	2	3	4	5	6	7	8
Apoptoz Analizi	A	Kontrol	Dosetaksel IC ₅₀	Selenyum IC ₅₀	Glutamin IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Selenyum IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀	Selenyum IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Selenyum IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀
Apoptoz Analizi	B	Kontrol	Dosetaksel IC ₅₀	Selenyum IC ₅₀	Glutamin IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Selenyum IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀	Selenyum IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Selenyum IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀
Hücre Döngüsü Analizi	C	Kontrol	Dosetaksel IC ₅₀	Selenyum IC ₅₀	Glutamin IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Selenyum IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀	Selenyum IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀	Dosetaksel IC ₅₀ + Selenyum IC ₅₀ + Glutamin IC ₅₀

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın hedefleri:

- Dosetaksel, selenyum ve glutamin'in prostat kanseri hücre hatları üzerinde optimal uygulama süresinin ve IC₅₀ dozlarının CCK-8 yöntemi ile belirlenmesi.
- Belirlenen etkin dozların uygulanması ile apoptoz ve hücre döngüsü deneyleri gerçekleştirilerek dosetaksel, selenyum ve glutamin'in IC₅₀ dozlarının ve bu etken maddelerin farklı kombinasyonlarının kemoprevantif etkinliklerinin değerlendirilmesi.

Araştırma takvimi:

YAPILACAK İŞ	AYLAR (MART 2011 – MAYIS 2012)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.Malzemelerin satın alınması														
2.Hücre kültürlerinin oluşturulması														
3.İn vitro deney gruplarının oluşturulması														
4.Kemoprevantif ajanların verilmesi														
5.Hücre canlılık ve ölüm değerlendirilmesi														
6.Apoptosis Tayini														
7.Hücre Döngüsü Analizi														
8.Verilerin istatistiksel Değerlendirilmesi														
9.Literatürlerin gözden geçirilmesi														
10. Makale yazımı														

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyin her bir aşaması tetraplike olarak çalışıldı. İstatistiksel analizler için Sigma Stat version 3,5 programı kullanıldı. Hücre canlılık analizlerinde elde edilen veriler tanımlayıcı istatistik analizi ile standart deviasyonu hesaplanarak değerlendirildi. Hücre canlılık testi tetraplike olarak çalışıldı. Akım sitometrik analiz sonuçlarında grupların karşılaştırılmasında Tek Yönlü ANOVA analizi kullanıldı. Anlamlı sonuçlar Holm-sidak testi ile değerlendirildi. $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Akım sitometrik analizler tetraplike olarak çalışıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Normal Prostat epiteli hücre hattı maliyeti yüksek olduğundan dolayı araştırmaya alınmamıştır. Araştırma steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu koşulların bozulması halinde gruplar çalışma dışı bırakılıp deney koşulları yeniden düzenlenip steril koşullarda çalışma devamlılığının sağlanması planlanmıştır. Böyle bir durum ile karşılaşılmasıdır.

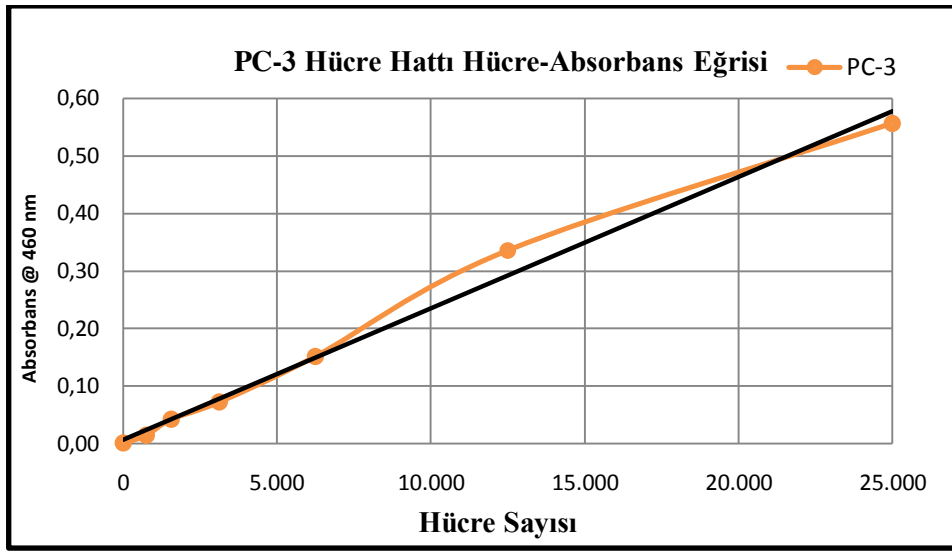
3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışma 25.02.2011 tarihinde 82-GOA protokol numarası ve 2011/05-03 Karar Numarası ile Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından görüşülmüş ve onayı alınmıştır.

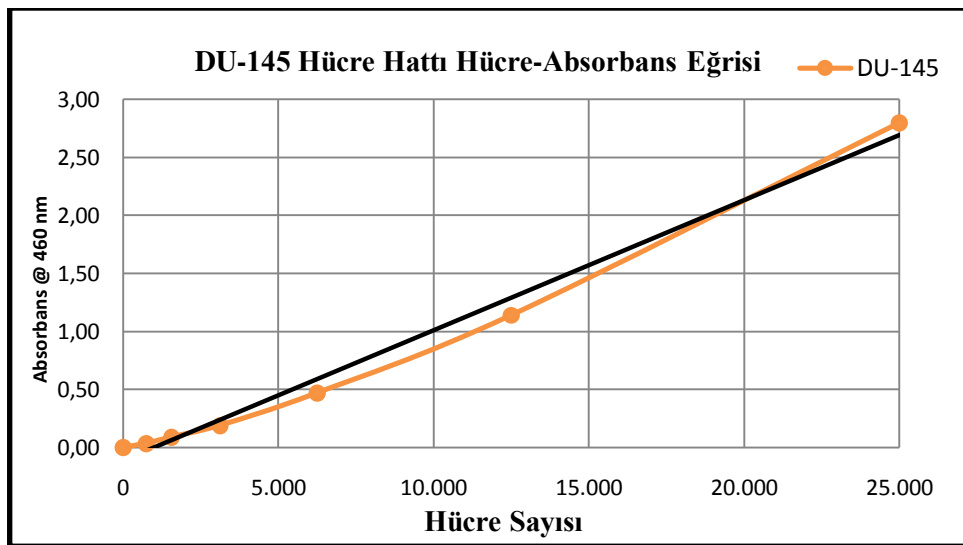
4. BULGULAR

4.1. Hücre Sitotoksosite Testi Bulguları

PC-3 ve DU-145 hücre hatları üzerinde sitotoksosite testi gerçekleştirilmeden önce farklı sayılardaki hücrelerin absorbands değerleri elde edilip Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de belirtildiği gibi hücre-absorbans eğrileri oluşturuldu. Hücre sayısına karşılık gelen absorbands değerleri ile oluşturulan eğriler doğrultusunda ölçüme uygun absorbands aralığı veren hücre sayısı PC-3 hücre hattında 15.000, DU-145 hücre hattında ise 10.000 olarak belirlendi.



Şekil 4.1. PC-3 hücre hattı hücre-absorbans eğrisi



Şekil 4.2. DU-145 hücre hattı hücre-absorbans eğrisi

Akım sitometrik analizlerde kullanılmak üzere IC₅₀ dozlarının (yarı maksimal inhibitör konsantrasyon) belirlenmesi amacıyla PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında sitotoksikite analizleri gerçekleştirildi.

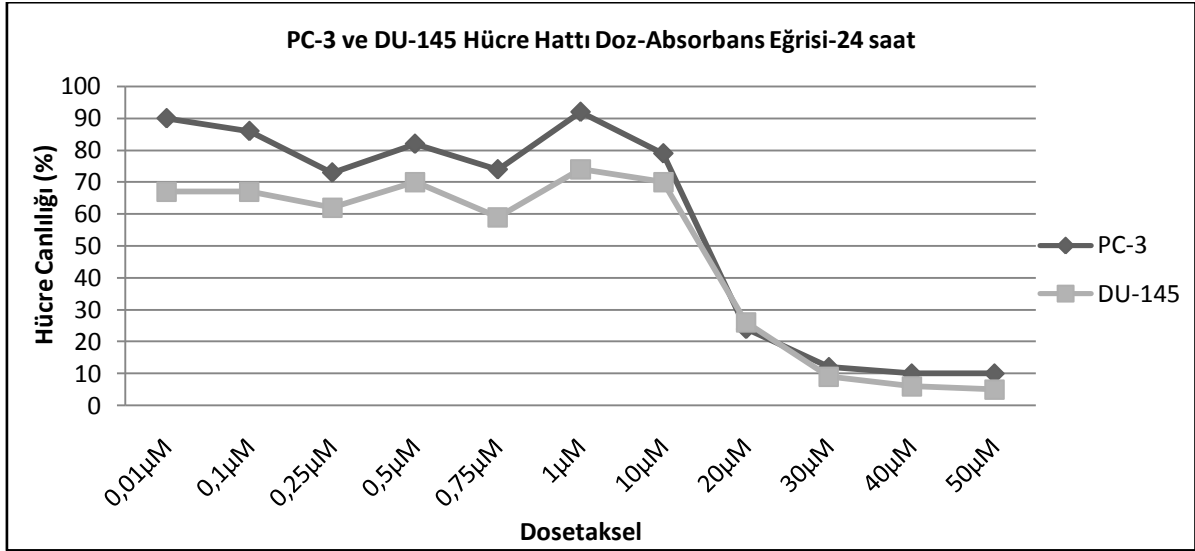
Hücreler 0,01µM, 0,1µM, 0,25µM, 0,50µM, 0,75µM, 1µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM olmak üzere 11 farklı konsantrasyonda dosetaksel ile 24 ve 48 saat süresince muamele edildi. Her doz grubu 8'er kuyucuktan oluşturuldu. Grupların kendi içindeki standart sapmalarının sonuçları Tablo 3.6'da verildi. Dosetaksel uygulanan grupların hücre canlılık oranları dosetaksel uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde olarak değerlendirildi.

Tablo 3.6. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına dosetaksel uygulaması sonucu gruplarda oluşan standart deviasyon (SD) değerleri

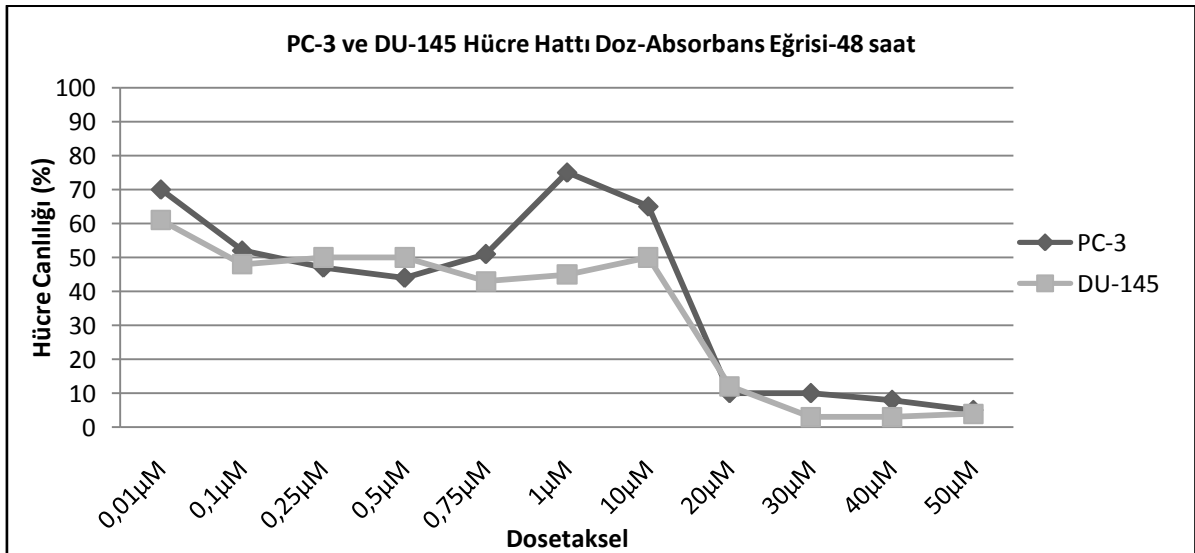
	PC-3 hücre hattı SD değerleri		DU-145 hücre hattı SD değerleri	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	0,0302	0,0251	0,111	0,0201
Doc.- 0,01µM	0,0443	0,0796	0,0990	0,204
Doc.- 0, 1µM	0,0210	0,0574	0,186	0,138
Doc.- 0,25µM	0,0265	0,0368	0,171	0,177
Doc.- 0,50µM	0,0233	0,0286	0,398	0,218
Doc.- 0,75µM	0,0316	0,0392	0,219	0,205
Doc.- 1µM	0,0640	0,0296	0,0483	0,0495
Doc.- 10µM	0,0663	0,0321	0,0557	0,0404
Doc.- 20µM	0,0211	0,00270	0,0577	0,0362
Doc.- 30µM	0,00798	0,00164	0,0162	0,00219
Doc.- 40µM	0,0000837	0,00261	0,0101	0,00217
Doc.- 50µM	0,00192	0,00207	0,00164	0,00239

Dosetakselin her iki hücre hattının canlılığı üzerinde 24 saatlik ölçümlerde 0,01µM ile 1µM doz aralığında herhangi bir etkiye sahip olmadığı, ancak 48 saatlik ölçümlerde ise 0,01µM ile 1µM doz aralığının hücre canlılığı üzerinde %45 ' e kadar inhibe edici özelliğe sahip olduğu saptandı. Hücrelere 24 saatlik dosetaksel uygulaması sonucunda her iki hücre hattında 10 µM ve 20µM dozların sırasıyla %25 ve %75 oranında; 30µM ve 50µM arasındaki doz aralığında ise %90'ndan fazla oranda hücre canlılığını inhibe edici özellik göstererek toksik bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Hücrelere 48 saatlik dosetaksel uygulaması sonucunda her iki hücre hattında da 10 µM'lık dozun %55 oranında inhibe edici özelliğe sahip olduğu tespit edildi. 20µM ve 50µM'lık doz aralıklarındaki dosetaksel uygulamasının ise ortalama %90 gibi yüksek bir oranda canlılığı baskılayarak toksik bir etkiye sahip olduğu

saptandı. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 ve 48 saatlik dosetaksel uygulaması sonucunda hücrelerin proliferasyonunun %50'sinin baskılandığı IC_{50} dozlar belirlendi. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında dosetaksel uygulaması sonucunda belirlenen IC_{50} dozlar 24 saatlik ölçümlerde sırasıyla $16\mu M$ ve $14\mu M$, 48 saatlik ölçümlerde ise $13\mu M$ ve $10\mu M$ olarak belirlendi.



Şekil 4.3. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 saat dosetaksel uygulanması sonucu oluşan doz - absorbans eğrisi



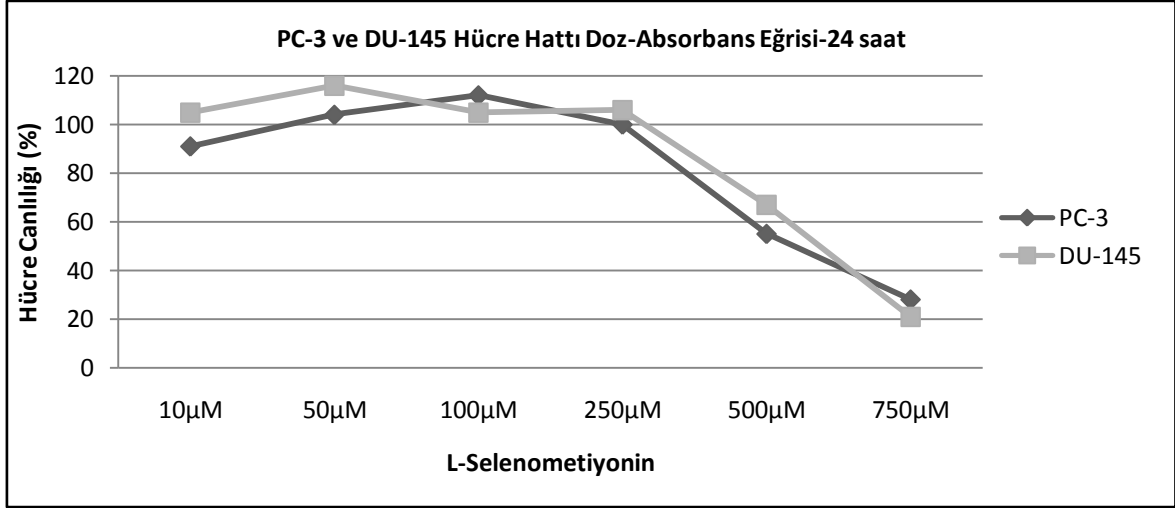
Şekil 4.4. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 48 saat dosetaksel uygulanması sonucu oluşan doz - absorbans eğrisi

L-selenometiyonin ile her iki hücre hattı 10µM, 50 µM, 100µM, 250µM, 500µM, 750µM olmak üzere artan dozlarda 24 ve 48 saat süresince muamele edildi. Her doz grubu 8'er kuyucuktan oluşturuldu. Grupların kendi içindeki standart sapmalarının sonuçları Tablo 3.7'de verildi. L-selenometiyonin uygulanan grupların hücre canlılık oranları L-selenometiyonin uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde olarak değerlendirildi.

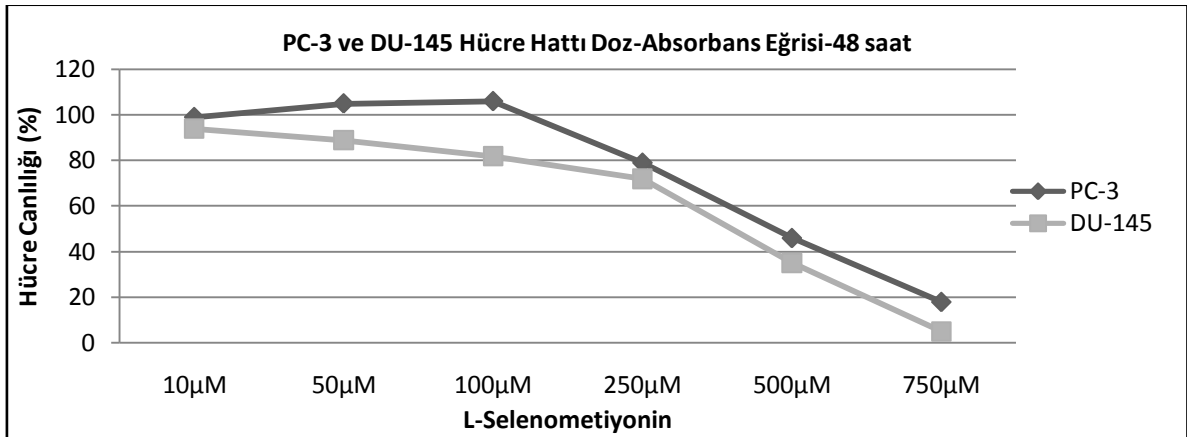
Tablo 3.7. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına L-Selenometiyonin uygulaması sonucu gruplarda oluşan standart deviasyon (SD) değerleri

	PC-3 hücre hattı SD değerleri		DU-145 hücre hattı SD değerleri	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	0,0229	0,0553	0,176	0,203
Se - 10µM	0,0182	0,0287	0,144	0,365
Se - 50µM	0,0270	0,0451	0,218	0,226
Se - 100µM	0,0238	0,0291	0,166	0,145
Se - 250µM	0,0835	0,0277	0,05	0,05
Se - 500µM	0,0146	0,0242	0,0999	0,06
Se - 750µM	0,00916	0,0254	0,0158	0,0414

Hücrelere L-selenometiyonin uygulamasının her iki hücre hattının canlılığı üzerinde 24 saatlik ölçümlerde 10µM ve 250µM doz aralığında, 48 saatlik ölçümlerde ise 10µM ve 100µM doz aralığında herhangi bir inhibe edici özellik göstermediği saptandı. Her iki hücre hattında 24 saatlik L-selenometiyonin uygulaması sonucunda 500µM ve 750µM'lık dozlarda sırasıyla ortalama %40 ve %75 oranında inhibe edici özelliğe sahip olduğu belirlendi. 48 saatlik L-selenometiyonin uygulaması sonucunda ise 250µM, 500µM ve 750µM'lık dozlarda sırasıyla ortalama %25, %60 ve %90 oranında inhibe edici özelliğe sahip olduğu belirlendi. L-selenometiyonin uygulaması sonucunda hücrelerin proliferasyonunun %50'sinin baskılandığı IC50 dozlar belirlendi. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında L-selenometiyonin uygulaması sonucunda belirlenen IC50 dozlar 24 saatlik ölçümlerde sırasıyla 550µM ve 670µM, 48 saatlik ölçümlerde ise 395µM ve 360µM olarak belirlendi.



Şekil 4.5. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 saat L-Selenometiyonin uygulanması sonucu oluşan doz - absorbans eğrisi



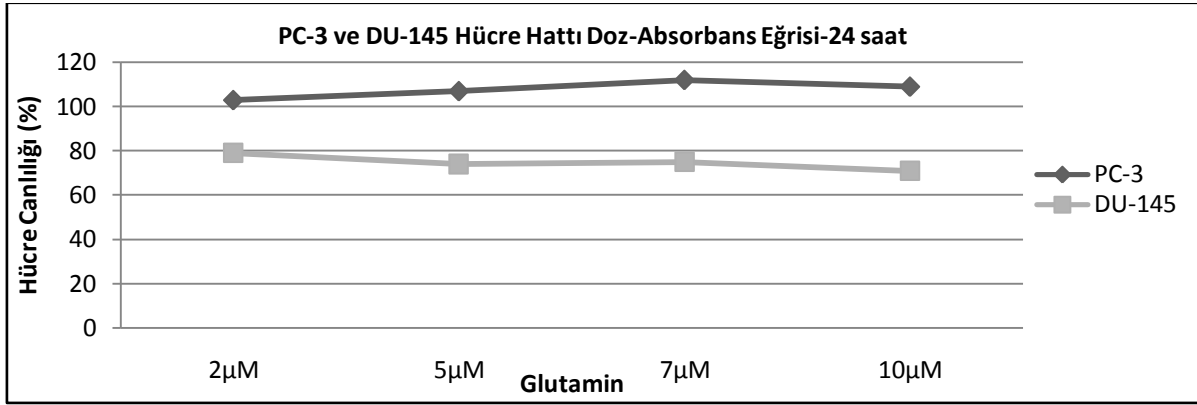
Şekil 4.6. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 48 saat L-Selenometiyonin uygulanması sonucu oluşan doz - absorbans eğrisi

Hücreler 2µM, 5µM, 7µM, 10µM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda glutamin ile muamele edildi. Her doz grubu 8'er kuyucuktan oluşturuldu. Grupların kendi içindeki standart sapmalarının sonuçları Tablo 3.8'de verildi.

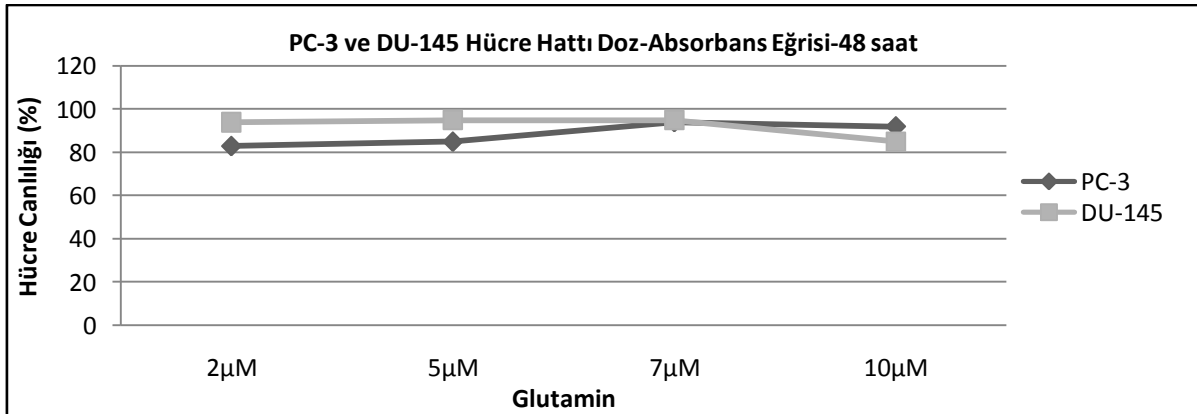
Tablo 3.8. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına Glutamin uygulaması sonucu gruplarda oluşan standart deviasyon (SD) değerleri

	PC-3 hücre hattı SD değerleri		DU-145 hücre hattı SD değerleri	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	0,0302	0,0870	0,0317	0,0628
Gln - 2μM	0,0334	0,0701	0,0170	0,0632
Gln - 5μM	0,0350	0,0304	0,0274	0,0981
Gln - 7μM	0,0229	0,0404	0,0121	0,0566
Gln - 10μM	0,0255	0,0699	0,0132	0,0518

Glutaminin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında her iki hücre hattında da hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde herhangi bir engelleyici ya da arttırıcı bir etkisinin olmadığı belirlendi.



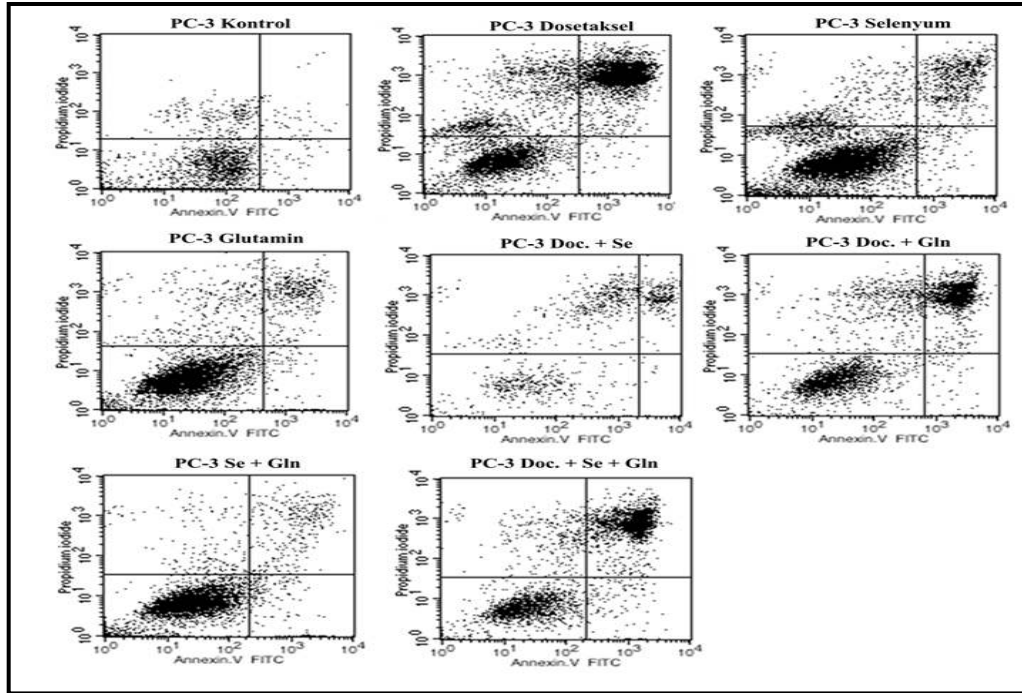
Şekil 4.7. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 24 saat glutamin uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi



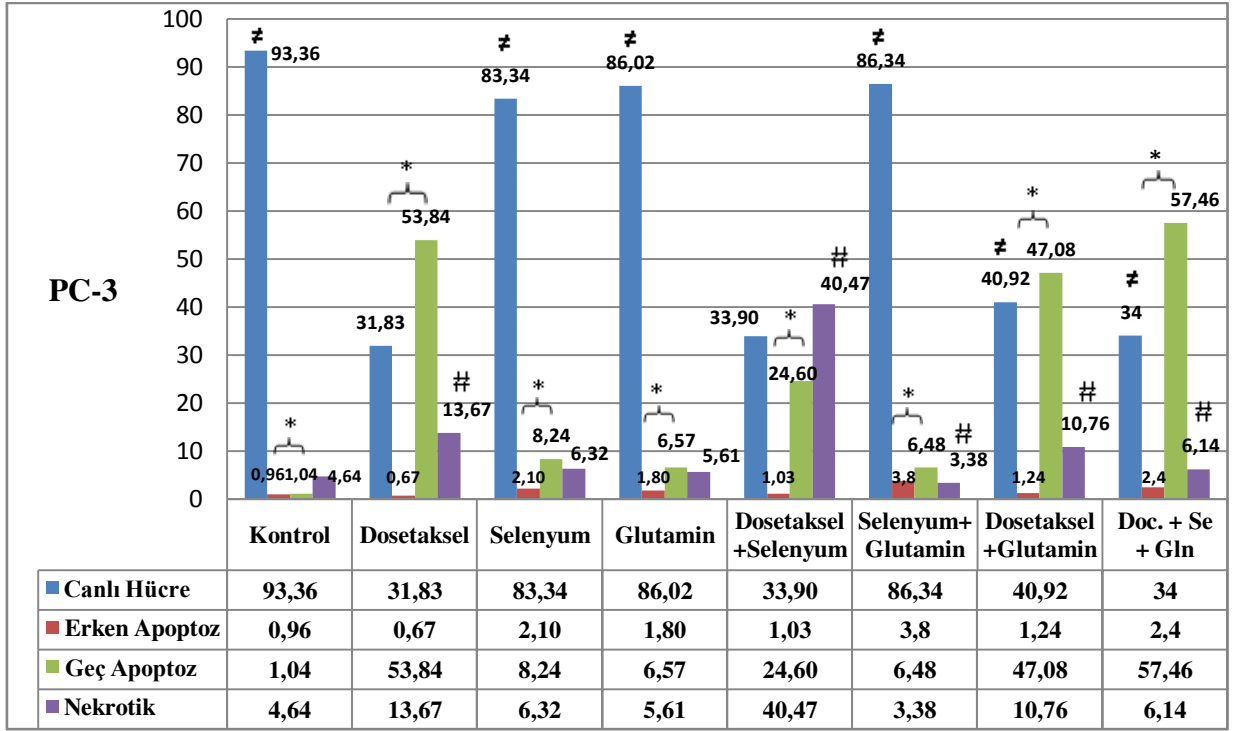
Şekil 4.8. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarına 48 saat glutamin uygulanması sonucu oluşan doz absorbans eğrisi

4.2. Apoptoz Analizi Bulguları

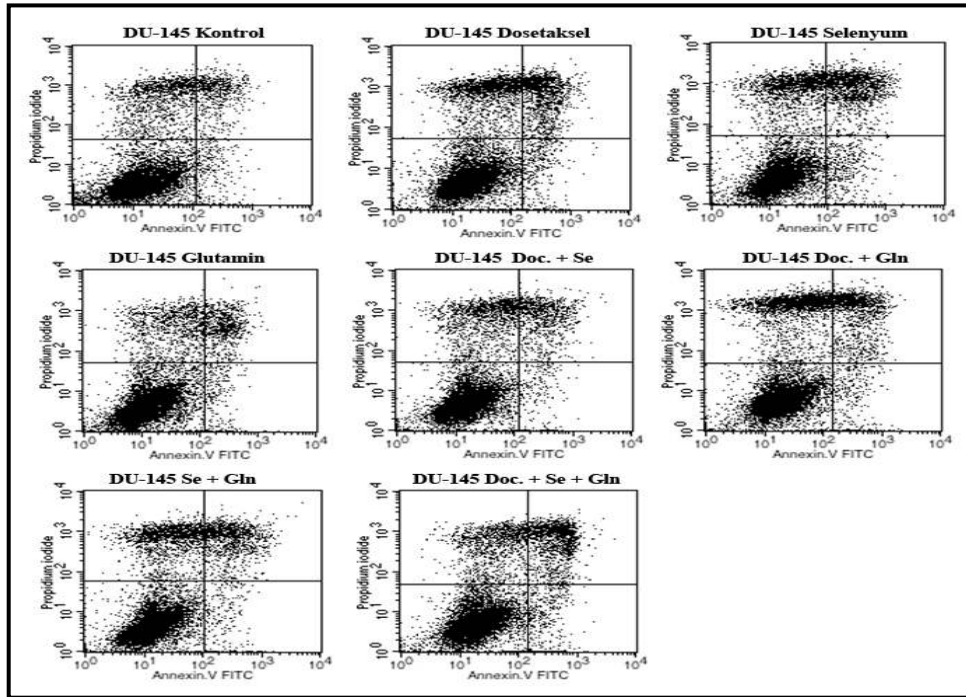
- Dosetakselin her iki hücre hattın da literatürle uyumlu olarak canlı hücre oranını azaltıp apoptotik hücre oranını anlamlı ölçüde arttırdığı belirlendi ($p<0.05$).
- PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında yalnız başlarına ve kombine kullanımlarında glutamin ve selenyum gruplarının kontrol ile kıyaslandığında bu hücre hatlarının proliferasyonunu indüklediği ve geç apoptotik hücre oranını anlamlı ölçüde arttırdığı saptandı ($p<0.05$).
- PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında dosetaksel rejimine selenyum eklenmesinin dosetakselin bu kanser hücrelerinin canlılığını inhibe etme etkisini değiştirmediği ancak PC-3 hücre hattında nekrotik hücre oranını anlamlı şekilde arttırdığı gözlemlendi ($p<0.05$).
- Her iki hücre hattında da dosetaksel rejimine glutamin eklendiğinde ise dosetakselin hücre canlılığı ve hücre ölümüne olan etkisini değiştirmediği saptandı.
- Dosetaksel, selenyum ve glutamin üçlü kombinasyonun kullanımında ise yalnızca dosetaksel grubuyla kıyaslandığında nekrotik hücre ölüm oranının anlamlı olarak azaldığı ($p<0.05$) ve canlı hücre oranının değişmediği her iki hücre hattında da belirlendi.



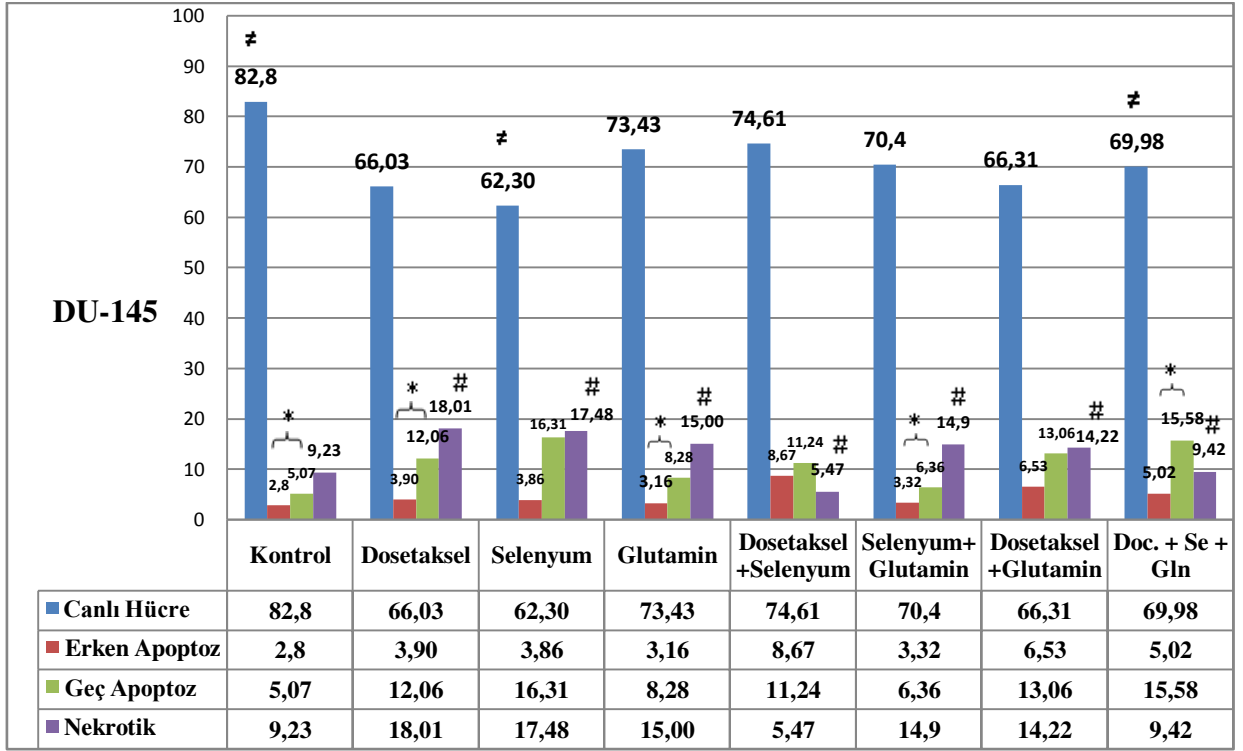
Şekil 4.9. PC-3 hücre hattının akım sitometrik Annexin V-PI apoptoz analizi sonuçlarının dot plot görüntüleri



Şekil 4.10. PC-3 hücre hattı apoptoz analizi sonuçları. Dosetaksel, selenyum ve glutamin kombinasyonu ile diğer gruplar sırası ile canlı hücre oranı ($\neq$), toplam (erken+geç) apoptoz oranı (*) ve nekrotik hücre oranı açısından ($\neq$) karşılaştırıldı (one-way ANOVA, Holm-Sidak testi; $\neq$ p<0,05, *p<0,05, #p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi).



Şekil 4.11. DU-145 hücre hattının akım sitometrik Annexin V-PI apoptoz analizi sonuçlarının dot plot görüntüleri

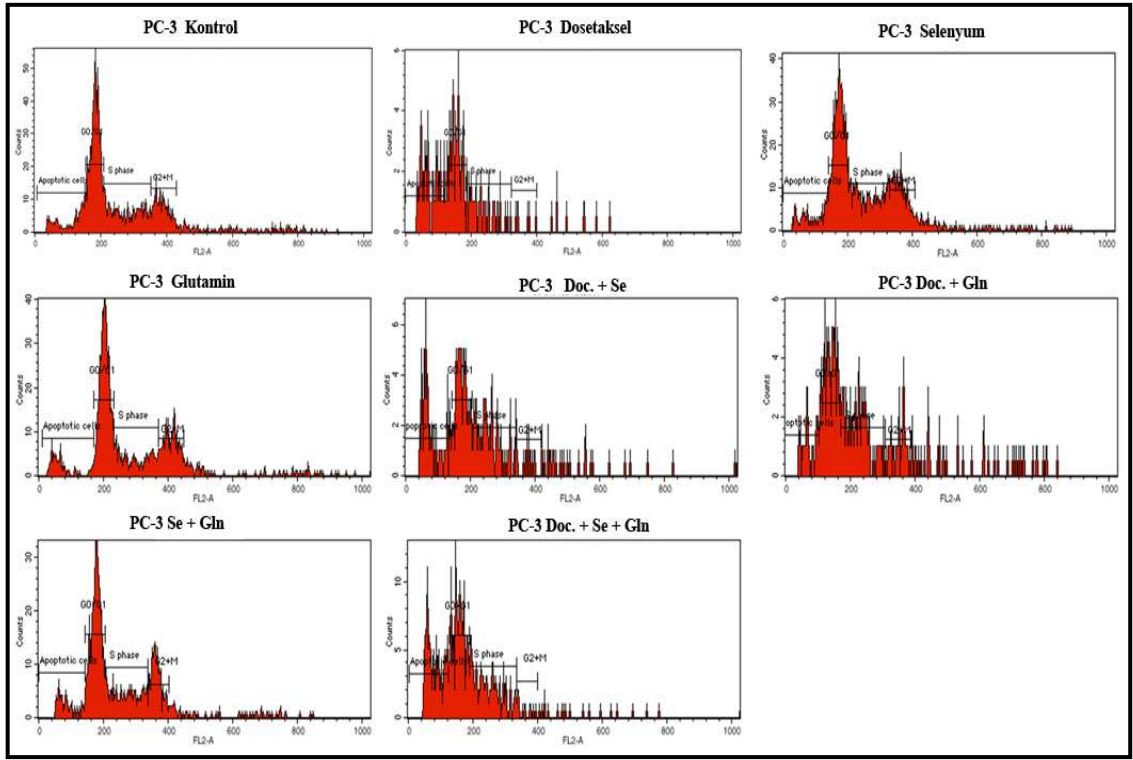


Şekil 4.12. DU-145 hücre hattı apoptoz analizi sonuçları. Dosetaksel, selenyum ve glutamin kombinasyonu ile diğer gruplar sırası ile canlı hücre oranı ($\neq$), toplam (erken+geç) apoptoz oranı (*) ve nekrotik hücre oranı açısından ($\neq$) karşılaştırıldı (one-way ANOVA, Holm-Sidak testi; $\neq$ p<0,05, *p<0,05, #p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi).

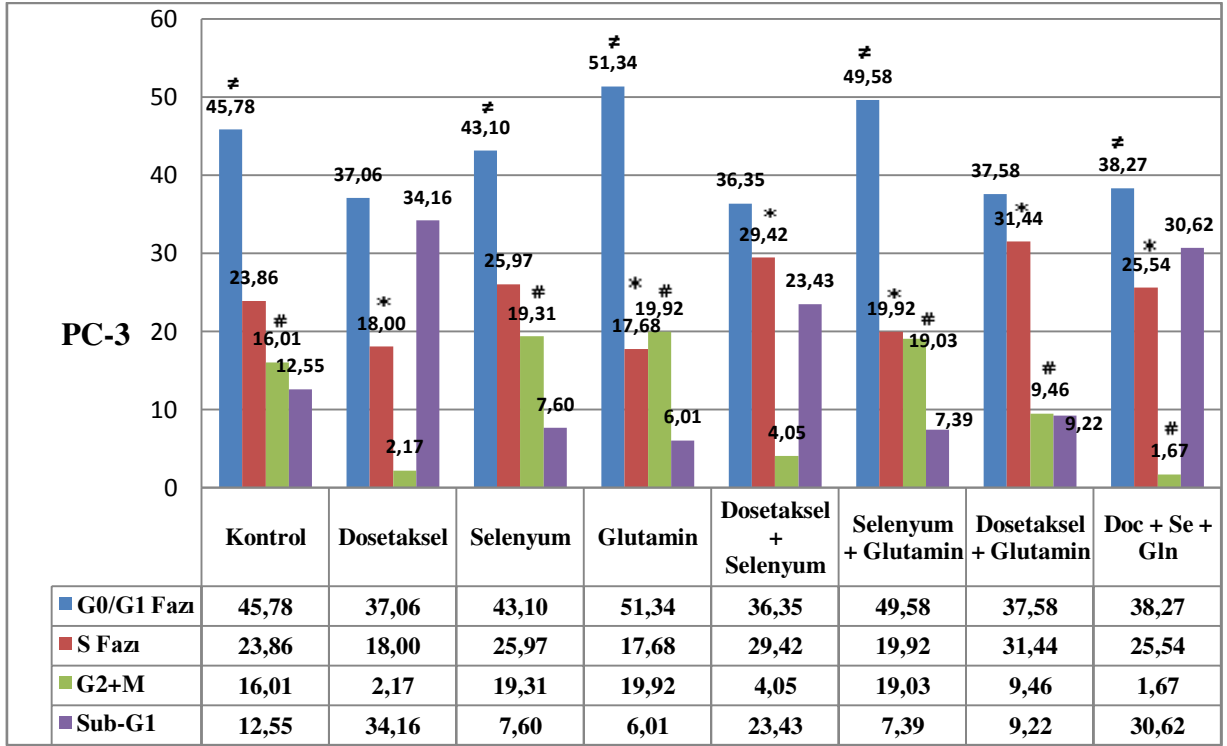
4.3. Hücre Döngüsü Analizi Bulguları

- PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında yalnız başlarına ve kombine kullanımlarında glutamin ve selenyumun kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre döngüsünün herhangi bir aşamasındaki hücre oranına anlamlı ölçüde etkisi saptanmadı.
- PC-3 hücre hattında dosetaksel rejimine selenyum eklenmesiyle dosetakselin hücre döngüsü üzerine olan etkisini değiştirmedığı, glutamin eklenmesi sonucunda ise dosetakselin hücresel düzeyde hasar vermiş olduğu hücre oranının azaldığı tespit edildi. Dosetaksel rejimine selenyum ve glutaminin birlikte eklenmesinde de dosetaksel ajanının bu hücre hattında hücre döngüsüne olan etkisini değiştirmedığı belirlendi(p>0.05).

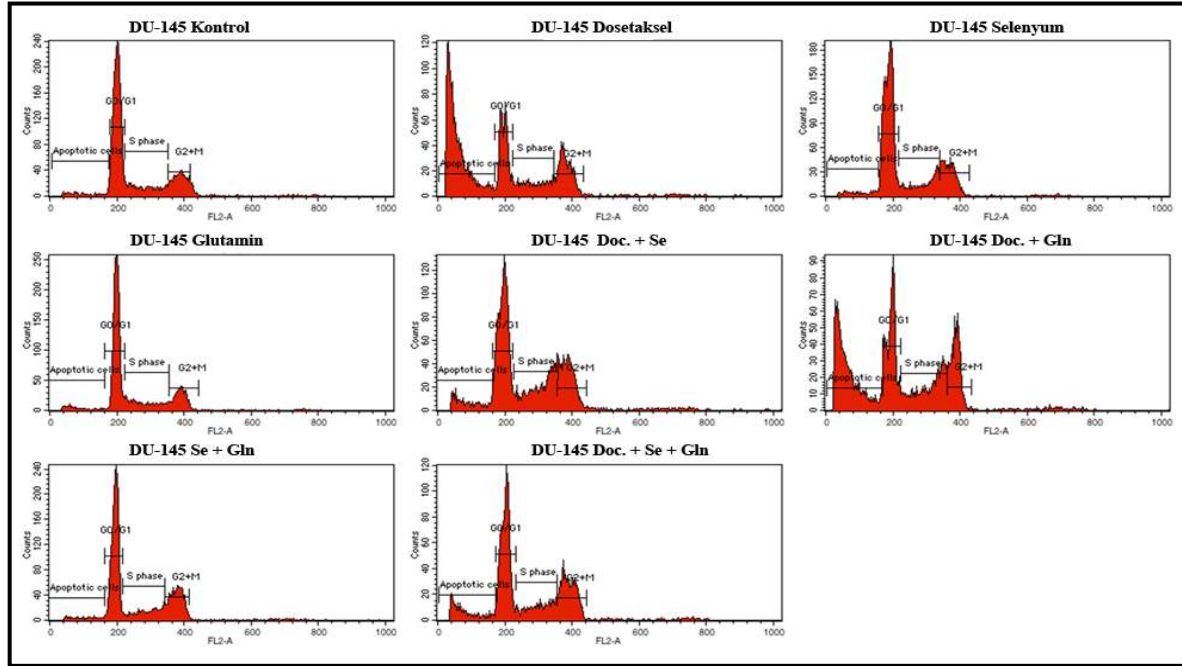
- DU-145 hücre hattında dosetaksel rejimine selenyum eklenmesi ile dosetakselin hücresel düzeyde hasar vermiş olduğu hücre oranını 10 kat azaltıp ($p<0.05$), G0/G1 fazındaki hücre oranını arttırdığı ($p<0.05$), glutamin eklenmesi sonucunda ise hücre döngüsünün herhangi bir aşamasındaki hücre oranına anlamlı ölçüde etkisi olmadığı belirlendi. DU-145 hücre hattında dosetaksel rejimine selenyum ve glutamin kombinasyonu eklendiğinde dosetakselin hücresel düzeyde hasar vermiş olduğu hücre oranını azalttığı ve bu hücrelerin G0/G1 ve G2+M fazlarında tutulduğu gözlemlendi ($p<0.05$).



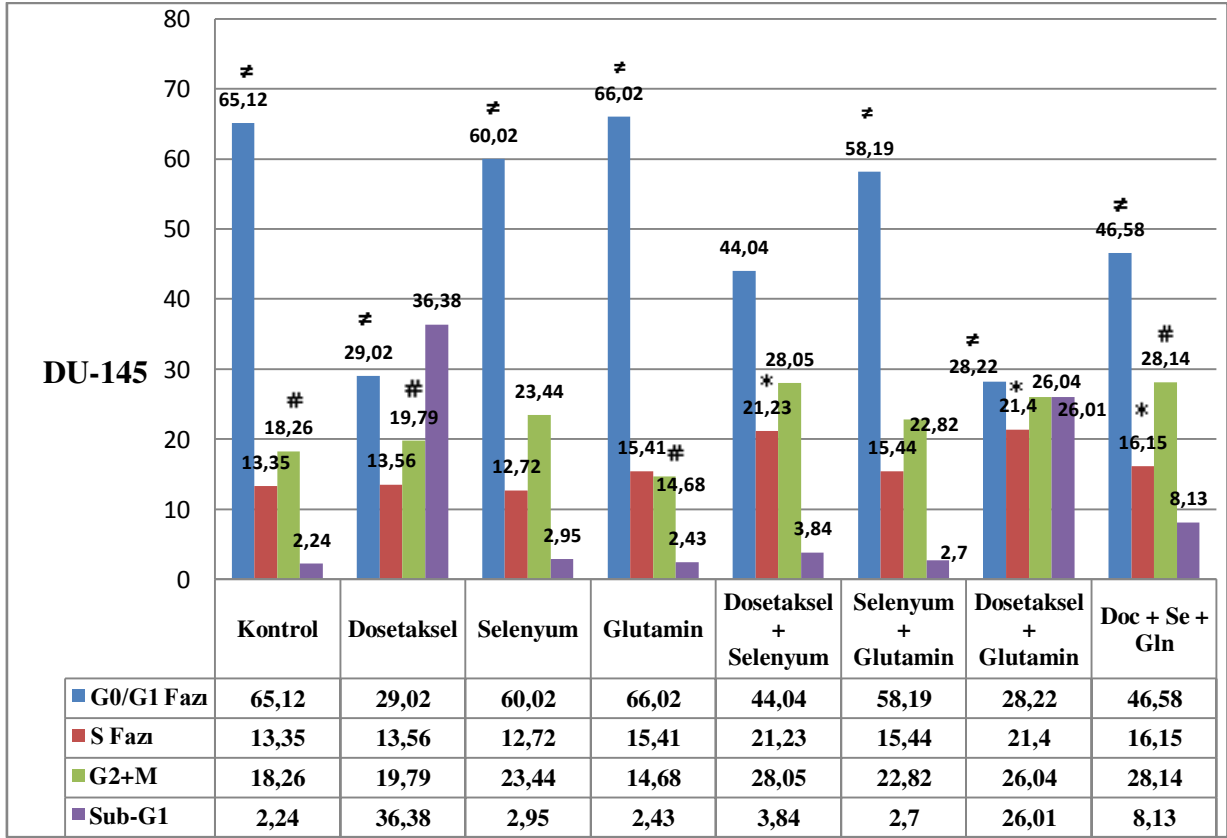
Şekil 4.13. PC-3 hücre hattının hücre döngüsü analizinin PI-Area histogramda akım sitometrik olarak gösterilmesi



Şekil 4.14. PC-3 hücre hattı hücre döngüsü analizi sonuçları, Dosetaksel, selenyum ve glutamin kombinasyonu ile diğer gruplar sırası ile G0/G1 fazı ($\neq$), S fazı (*) ve G2+M ($\neq$) fazındaki hücre oranı açısından karşılaştırıldı (one-way ANOVA, Holm-Sidak testi; $\neq p < 0,05$, $*p < 0,05$, $\#p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi).



Şekil 4.15. DU-145 hücre hattının hücre döngüsü analizinin PI-Area histogramda akım sitometrik olarak gösterilmesi



Şekil 4.16. DU-145 hücre hattı hücre döngüsü analizi sonuçları, Dosetaksel, selenyum ve glutamin kombinasyonu ile diğer gruplar sırası ile G0/G1 fazı ($\neq$), S fazı (*) ve G2+M ($\#$) fazındaki hücre oranı açısından karşılaştırıldı (one-way ANOVA, Holm-Sidak testi; $\neq$ $p < 0,05$, * $p < 0,05$, $\#$ $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi).

5. TARTIŞMA

Dosetaksel androjen reseptörü negatif prostat kanserinin standart tedavisinde yer alan, oldukça toksik bir ajandır. Dosetaksel'in şiddetli derecede görülen yan etkileri saç dökülmesi ve kemik iliği baskılanmasıdır. Buna ilave olarak orta derecede mukozit, ödem, hipersensitivite reaksiyonları ve cilt-tırnak değişiklikleri görülebilir. Bunlar arasında en önemli yan etkiler kemik iliği üzerine olan yan etkilerdir. Yan etkinin şiddetine göre doz kısıtlaması, tedaviye ara verilmesi ve granülosit monosit koloni stimüle edici faktörlerin (GM-CSF) kullanılması gerekebilir⁽⁹⁰⁾. Prostat kanseri standart tedavisinde kullanılan dosetakselin oldukça toksik bir ajan olması, sitotoksitesini inhibe etmeye ve antikanser etkinliğini arttırmaya yönelik birçok araştırma yapılmasını da beraberinde getirmektedir. Literatürde dosetaksel ile kemoprevantif ajanların prostat kanseri hücre hatları üzerinde kombine kullanımını destekleyen birçok çalışma mevcuttur.

Tedavi sırasında olgularda sıklıkla glutamin ve selenyum suplementasyonu gerekli olmaktadır. Ancak bu ilavelerin mevcut antikanser etkinliğe katkısı bilinmemektedir. Bu amaçla çalışmamızda; hormonal tedavinin etkisiz olduğu, dosetaksel rejimi uygulanan prostat kanseri hücre hatlarında selenyum ve glutamin suplementasyonunun anti-kanser etkinliğe katkısı, hücre döngüsü ve apoptotik yolak üzerine etkisi açısından incelenmiştir. Bu doğrultuda androjen reseptörü negatif prostat kanseri hücre hatları olan DU-145 (insan prostat karsinomu beyin metastazı-monolayer) ve PC-3 (insan prostat karsinomu kemik metastazı-monolayer) kullanılmıştır.

Huei-Ju Ting ve ark. PC-3 ve LNCaP hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada 6 günlük dosetaksel maruziyeti sonunda bu hücre hatlarında belirledikleri etkin doz ile PC-3 hücre hattında apoptozu tetiklediklerini, dosetaksel ile kullandıkları kombine tedavide apoptotik hücre oranının arttığını ancak hücre döngüsü fazları üzerinde indükleyici bir etki belirleyemediklerini göstermişlerdir⁽¹¹³⁾.

Dosetakselin selenyum ile prostat kanseri hücre hatları üzerinde yapılmış antikanser etkinliğini arttırmaya yönelik çalışmalarda sinerjistik etki görülmüştür. Ancak bu çalışmada kullanılan selenyum formu metilselenosistein'dir⁽¹¹⁴⁾.

Freitas ve ark. inorganik bir selenyum türevi olan sodyum selenitin dosetaksel ile kombine etkilerini araştırdıkları çalışmada yalnızca PC-3 hattını kullanmışlar ve hücre canlılığı üzerinde kombine kullanımda sinerjistik etkiyi belirlemişler ancak proapoptotik faktörlerin kombine kullanımda tetiklenmediğini saptamışlardır⁽¹¹⁵⁾. Selenyumun inorganik

formu olan sodyum selenitin invitro ortamda prostat kanseri hücre hattı üzerinde etkinliği Freitas ve ark. tarafından gösterilmiş olmasına rağmen sodyum selenitin inorganik form olması nedeniyle prostat kanseri hastalarında ne derece de etkili olabileceği düşündürücüdür. Vücudun kullanabildiği selenyum formu; L-selenometiyonin'dir. L-selenometiyonin, bilinen diğer herhangi bir selenyum formuna göre, vücut komponentlerine daha iyi katılır ve daha iyi absorbe edilir. Bu nedenle çalışmamızda L-Selenometiyonin kullanılmıştır.

Hongjuan ve ark. L-selenometiyoninin androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP üzerinde etkinliğini araştırmışlar ve hücre döngüsünün G2+M fazında bu prostat kanseri hücrelerini durdurduğunu göstermişlerdir. Ancak L-selenometiyoninin apoptotik yolak üzerindeki etkinliği incelenmemiş ve LNCaP hücre hattına göre metastatik potansiyeli daha yüksek olan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hatları olan DU-145 ve PC-3 üzerinde L-selenometiyoninin etkinliği gösterilmemiştir⁽¹¹⁶⁾.

Ziegler ve ark. yaptıkları ön klinik çalışmalarda taksan grubu kemoprevantif ajan olan paklitakselin hastalarda oluşturduğu sinir hasarını engellemede glutaminin yararlı olduğunu ortaya koymuştur⁽¹⁰⁸⁾. Dosetaksel paklitakselin yarı sentetik türevidir⁽¹¹⁷⁾. Literatürde dosetaksel rejimine glutamin eklenmesinin prostat kanseri hücre hatları üzerinde antikanser etkinliğe katkısını inceleyen herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Klinikte prostat kanseri hastalarına glutamin suplementasyonu kullanılmaktadır ancak glutaminin hücresel düzeyde etkinliğini gösteren bir araştırma bulunmadığından bu konuda araştırmaya gereksinim duyulmuştur.

Çalışmamızda sitotoksikite testinde dosetaksel ve selenyumun PC-3 ve DU-145 hücre hatları üzerinde IC₅₀ dozları belirlendi. Her iki hücre hattında da akım sitometrik analizlerde 24 saatlik ölçüm sonucu bulunan etkin dozlar kullanıldı. Prostat kanseri hücre hatlarında dosetaksel ile 24 ve 48 saat maruziyet sonucu elde edilen etkin doz konsantrasyonları arasında önemli ölçüde fark bulunmadı. Toksik bir ajan olan dosetakselin en kısa zamanda en etkili olduğu dozu kullanmayı hedefledik. Bu yüzden çalışmamızda 24 saatlik IC₅₀ dozu tercih edildi. Buna bağlı olarak selenyum ve glutaminin de 24 saatlik etkin IC₅₀ dozları çalışmaya alındı.

PC-3 ve DU-145 hücre hatları IC₅₀ dozlarına bakıldığında, DU145 hücre hattına göre daha metastatik potansiyele sahip olan PC-3 hücre hattında dosetaksel dozunun literatürle uyumlu olarak daha yüksek olduğu görüldü (PC-3: 16µM, DU-145: 14 µM).

L-Selenometiyonin'in prostat kanseri hücre hatlarında 24 saatlik etkin dozunun DU-145 hücre hattında PC-3 hücre hattına göre daha yüksek olduğu (PC-3: 550 µM, DU-145: 670 µM), 48 saatlik etkin dozunun ise PC-3 hücre hattında DU-145 hücre hattına göre daha yüksek olduğu saptandı (PC-3: 395µM, DU-145: 360 µM). 24 ve 48 saatlik etkin doz sonuçları arasında büyük fark görülmediğinden dosetakselin etkin doz zamanına uyum göstermek üzere selenyumunda 24 saatlik IC₅₀ dozu çalışmaya alındı.

Glutaminin metastatik prostat kanseri hücreleri üzerinde IC₅₀ dozu hem 24 hem de 48 saatte belirlenemedi. Bu bulgu yüksek dozda glutamin kullanımının metastatik prostat kanseri hücrelerine toksik etkisinin olmadığı şeklinde yorumlandı. Bu durum glutaminin kanser hücrelerinin çoğalmasını indükleyip indüklediği sorusunu akla getirebilir. Yaptığımız çalışmada (apoptoz tayini ve hücre döngüsü analizi) glutaminin metastatik özellikteki prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını indükleyici herhangi bir etkisinin olmadığı gösterildi.

Belirlenen etkin dozlar ile akım sitometrik olarak hücre döngüsü ve apoptoz analizleri gerçekleştirildi. Dosetakselin literatürle uyumlu olarak her iki hücre hattında da anlamlı olarak apoptozu tetiklediği gösterildi. Heinemann ve ark. prostat kanseri hücre hatlarında dosetakselin özellikle geç apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir⁽¹¹⁸⁾.

Çalışmamızda; PC-3 hücre hattında dosetakselin apoptoza yönlendirdiği hücre oranının, selenyum eklendiğinde anlamlı ölçüde azaldığı ve nekrotik kanser hücre oranlarını arttırdığı saptanmıştır. Dosetaksel-glutamin kombinasyonunda dosetakselin apoptoza yönlendirdiği hücre oranında değişikliğe rastlamadık. Bu kombinasyonla ilgili literatürde bir çalışma olmadığı için bu bulgunun önemli olduğunu düşünüyoruz. Buradan yola çıkarak kemoterapi sırasında glutamin desteği ile kemoterapiden kaynaklanan toksik etkilerin engellenebileceğini ya da azaltılabileceğini öngörebiliriz. Tedavide dosetaksel kemoterapisinin uygulanmadığı dönemde glutamin suplementasyonunun prostat kanseri kemik metastazı hücrelerinin proliferasyonunu indüklemeyeceğini söyleyebiliriz. Tek başına selenyumun kullanıldığı grup ile kontrol grubunun kıyaslanmasında toplam apoptotik hücre oranının 5 kat arttığını gözlemledik. Dosetaksele selenyumun eklenmesi ile nekrotik hücre oranı artmaktadır. Bu ikili kombinasyona glutaminin eklenmesi ile apoptotik hücre oranının yüzde 25'ten yüzde 60'a yükseldiği, nekrotik hücre oranının ise yüzde 40'tan yüzde 6'ya azaldığını gördük. Bu

bulgu kombinasyonun önemini göstermektedir. Glutaminin selenyumun olası toksik etkilerini yok etmesi ve kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmesi etkisini önemli bir bulgu olarak görüyoruz. PC-3 hücre hattının hücre döngüsü analizinde ise dosetaksel rejimine selenyum ve glutaminin birlikte eklenmesinde dosetaksel ajanının S fazında tutmuş olduğu hücre oranını arttırdığını çalışmamızda gözledik.

DU-145 hücre hattında glutamin ve selenyumun yalnız başlarına ve kombine kullanımlarının kontrolle kıyaslanmasında bu hücre hattının çoğalmasını indüklediği ve geç apoptotik hücre oranını arttırdığı saptandı. Dosetaksele glutamin ve selenyum suplementasyonunun eklenmesinde ise dosetakselin apoptoza yönlendirdiği hücre oranında engelleyici bir etkilerinin olmadığı belirlendi.

Bu bulgular ışığında kemoterapi tedavisinin uygulandığı ve uygulanmadığı dönemde glutamin ve selenyum suplementasyonunu androjen resetörü negatif prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını tetiklemeyeceğini öngörüyoruz. DU-145 hücre hattının hücre döngüsü analizinde, dosetaksel rejimine selenyum ve glutamin kombinasyonu eklendiğinde dosetakselin hücresel düzeyde hasar vermiş olduğu hücre oranının azaldığı ve bu hücrelerin G0/G1 ve G2+M fazlarında tutulduğunu belirledik. Literatürde bu kombinasyon ile ilgili bir çalışma bulunmadığından bu bulgumuzun literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile dosetakselin, selenyum ve glutamin ile birlikte in-vitro'da prostat kanseri hücreleri üzerine olan etkisi ilk kez araştırılmıştır. Hormonoterapiye dirençli, metastatik prostat kanseri hücrelerinde, klasik dosetaksel tedavisinde glutamin ve selenyum eklenmesinin, anti-kanser etkinliği arttırdığı, dosetakselin, glutamin ve selenyum kombinesi ile birlikte kullanıldığında sitotoksik etkilerinin azalmakta olduğu görülmüştür. Androjen reseptörü negatif prostat kanseri hücre hatlarında tek başına selenyum verilmesinin kanser hücrelerini istatistiksel olarak anlamlı oranda apoptoza yönlendirdiğini saptadık. Bu bulgulara dayanarak; dosetaksel rejimi uygulandıktan sonra prostat kanseri hücre hatlarına kemoterapi verilmediği dönemde L-selenometiyonin suplementasyonunun tedaviden kaçan kanser hücrelerini apoptoza götürme konusunda etkili olabileceğini öngörebiliriz.

Sonuç olarak; in-vitro çalışmada metastatik prostat kanseri hücre hatlarında kemoprevantif etkinliğini gösterdiğimiz bu kombinasyonun genel metabolizma üzerindeki etkilerini gözlemlemek için in-vivo ortamda çalışılmasının önemli olacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Foster, C.S., et al., Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2000(205):19-43.
2. Yeung, F. and L.W. Chung, Molecular basis of co-targeting prostate tumor and stroma. J Cell Biochem Suppl, 2002. Suppl(38):65-72.
3. Klein, E.A., 2005. Can prostate cancer be prevented? Nat. Clin. Pract. Urol. 2,24–31.
4. www.sanofi-aventis.com.tr/urunler/Taxotere_80MG_Flakon_RR.pdf
5. National Academy of Sciences. Recommended dietary allowances, 10th edn. Washington: National Academy Pres; pp. 1989; 217-24
6. Redman C, Scott JA, Baines AT, Basye JL, Clark LC, Calley C, et al. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. Cancer Lett. 1998;125:103-10
7. Thompson HJ, Wilson A, Lu J, Singh M, Jiang C, Upadhyay P, et al. Comparison of the effects of an organic and an inorganic form of selenium on a mammary carcinoma cell line. Carcinogenesis 1994;15:183-6
8. Gebre-medhin, M., Ewald, U., Plantin, L., Tuvemo, T. Elevated serum selenium in diabetic children. Acta Pediatr Scand., 1984; 73: 109-114.
9. Calvo A, Xiao N, Kang J, Best CJ, Leiva I, Emmert-Buck MR, et al. Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. Cancer Res. 2002;62:5325-35.
10. Miller AL. Therapeutic Considerations of L-Glutamine: A Review of the Literature. Altern Med Rev 1999; 4:239-248.
11. Tanagho EA. Embryology of the genitourinary system. In: TanaghoEA, Mc Aninch JW, Eds. Smith's General Urology. 16th Ed., New York: Lange Medical Books, 2004; 18-30.
12. Coffey, D.S The Molecular Biology, Endocrinology, and Physiology of the Prostate and Seminal Vesicles. IN: Campbell's Urology (Walsh, PC, Retik, AB, Stamey, TA. and Vaughan, ED, Jr., Eds.), W. B. Saunders Co., New York, 6th Edition, Volume I, 1992; pp. 221-266,
13. Shapiro E. Embryologic development of the prostate. Insights into the etiology and treatment of benign prostatic hyperplasia. Urol Clin North Am. 1990 Aug;17(3):487-93
14. Perichery Narayan: Benign Prostatic Hyperplasia. Churchill Livingstone 2001.

15. Tanagho, E.A.: Embryology of the Genitourinary System.: Smith's General Urology. Tanagho, E.A., McAninch, J.W. 13'h. ed. A.B.D.: Appleton-Lange., 1992; pp. 17-29.
16. Scardino, P.T. Dr. Peter Scardino's Prostate Book: The Complete Guide to Overcoming Prostate Cancer, Prostatitis and BPH. Vatan Yayınları, 2005;
17. Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan EDJ et al. Campbell's Urology. Philadelphia, Saunders, 2007; 38-77.
18. Krongrad, A., Droller, J.M. : Anatomy of the prostate. In: Lepor, H., Lawson, R.K.(eds) Prostate Disease, 1993, 17-27.
19. Perichery Narayan: Benign Prostatic Hyperplasia. Churchill Livingston 2001
20. McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. Am J Clin Pathol. 1968;49(3):347-57.
21. Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E. Cancer Medicine 6th edition: Genitourinary tract, Neoplasms of the prostate. 2003.
22. Stamey, T.A., McNeal, J.E. : Adenocarcinoma of the prostate. In: Walsh, P.C., Retik, A.B., Stamey, T.A., Vaughan E.D.(eds) : Campbell's Urology, 6th ed. 1992; 1159-1221.
23. Simmons, O.S., Horowitz, J.M. Biochemical and Functional Analysis of Homeoprotein Nkx3.1. A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University. 2006.
24. Guyton&Hall Tıbbi Fizyoloji Kitabı, 9. Edisyon. Nobel Tıp Kitapevleri. 1996.
25. Tannock IF, de Wit R, Berry WR et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Eng J Med. 2004;351:1502-12
26. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: International comparisons. Br J Urol Int 2002; 90:162-173.
27. Makarov, D. V., Carter, H. B. The discovery of prostate specific antigen as a biomarker for the early detection of adenocarcinoma of the prostate, J Urol 176, 2006;2383-2385.
28. Pienta KJ: Etiology, epidemiology and prevention of carcinoma of prostate. In Campbell's Urology. Edited by Walsh PC, Retik AB, Stamey TA and Vaughan ED. Philadelphia: WB saunders Company. Seventh edition. Vol. 3 chapt. 80, 1997; pp. 2489-2496.

29. Stamey TA, Mc Neal JE. Adenocarcinoma of the prostate. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. Campbell's Urology. 8th ed. Vol 4, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002;3003-3226.
30. Gleason, D.F, Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol, 1992; 23(3):273-9.
31. Baltacı S. Prostat Kanseri. Anafarta K. Bedük Y. Arıkan N (ed). Temel Üroloji, Ankara, 3. baskı, Güneş Tıp Kitabevleri. 2007; 740-766.
32. Emil A, Tanogho J, Mcaninch, JW. Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi, Azancı G (ed). Smith Genel Uroloji, 16. Baskı, Nobel Kitabevleri, İstanbul. 2004, 410-418
33. Rosai J: Ackerman's Surgical Pathology: Male reproductive system; Prostate and Seminal vesicles. 9.th, Mosby, St. Louis, 2004, 1361-1411.
34. Moore CK, Karikehalli S, Nazeer T, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Mian BM. Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era. J Urol. 2005 ;173(1):70-2.
35. Shen, C.A. & Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. Genes & Dev., 14, 2410-2434
36. Winkelstein W.Jr., Ernster R.: Epidemiology and etiology. In Murphy GP (Ed.).Prostate Cancer. Littleton, Massachussets, PGS Publishing, 1979, 1-17.
37. Brott O. Hereditary prostate cancer: Clinical aspects. J Urol 2002; 168:906-913.
38. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B. Human prostate cancer risk factors. Cancer 2004; 101:2371-2490.
39. Heshmat MY, Kaul L, Kovi J, Jackson MA, Jackson AG, Jones GW, et al. Nutrition and prostate cancer: a case– control study. Prostate 1985;6:7– 17.
40. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, et al. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. J Natl Cancer Inst 1993;85: 1571– 9.
41. Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacol Ther 1999;83: 217-44.
42. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. J Natl Cancer Inst 1999; 91:317–31.

43. Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, et al. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 1999;59:1225–30.
44. Pennington JA, Schoen SA. Total diet study: estimated dietary intakes of nutritional elements, 1982– 1991. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66:350– 62.
45. Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR, Huttunen JK, Hartman AM, et al. Prostate cancer and supplementation with alphatocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:440– 6.
46. Klein EA, Thompson IM, Lippman SM, et al. SELECT: the next prostate cancer prevention trial. Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *J Urol*, 166: 1311-5,200
47. Willis MS,. Wians FH Jr. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances *Clinica Chimica Acta* 330 (2003) 57–83
48. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, et al: Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 1997;57:314.
49. Visakorpi T, Kaniemi AH, Syvanen AC, et al: Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995;55;342
50. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ma J, Pollak M. Plasma insulin like growth factor I and prostate cancer risk. A prospective study. *Science* 1998; 279-563.
51. Walsh P, Retik A, Vaughan D, Wein A; *Campbell's Urology (Seventh Edition); Volume 3* ; 2489-2625
52. Epstein JI. Pathology of prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate: prognostic influences of stage, tumor volume, grade, and margins of resection. *Semin Oncol.* 1994 ;21(5):527-41
53. *Oxford Textbook of Oncology*. Second ed, ed. T.I. Souhami SL., Hohenberger P., Horiot J-C. Vol. 2. 2002
54. Whitmore, W.F.JR: Natural history staging of prostate cancer. *Uro. Clin. North Am.* 11 :205-20, 1984.
55. Graham SD. :Critical assessment of prostate cancer staging cancer. 70: 269-274, 1992.

56. Perrotti, M., et al., Trends in poorly differentiated prostate cancer 1973 to 1994: observations from the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *J Urol*, 1998. 160(3 Pt 1): 811-5.
57. Smith Genel Üroloji. Editörler; Emil A. Tanagha, Jack W. McAninch. Çeviri editörü; Yrd. Doç.Dr.Gürkan Kazancı. Nobel Tıp Kitapevleri. 1999; 410-433.
58. Gerber GS, Chodak GW. Digital rectal examination in the early detection of prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 1990 ;17(4):739-44.
59. Lee F, Littrup PJ, Torp-Pedersen ST, Mettlin C, McHugh TA, Gray JM, Kumasaka GH, McLeary RD. Prostate cancer: comparison of transrectal US and digital rectal examination for screening. *Radiology*. 1988;168(2):389-94.
60. Gürkan K. (1999). Smith Genel Üroloji. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul.
61. Van Brussel, J.P. and G.H. Mickisch, Prognostic factors in prostate and testis cancer. *BJU Int*, 1999. 83(8): 910-6; quiz 916-7.
62. Klotz, L., Intraoperative cavernous nerve stimulation during nerve sparing radical prostatectomy: how and when? *Curr Opin Urol*, 2000. 10(3): 239-43.
63. Do, L.V., et al., Postoperative Radiotherapy for Carcinoma of the Prostate: Impact on Both Local Control and Distant Disease-Free Survival. *Am J Clin Oncol*, 2002. 25(1): 1-8.
64. www.prostateline.com
65. Smith, M.R., et al., Changes in Body Composition during Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002.87(2):599-603.
66. Klotz, L., Hormone therapy for patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 2000. 88(12 Suppl):3009-14
67. Doğan E, Kılıçkap S, Çelil İ. New Drugs in Chemoprevention, *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics* 2009;2(1):73-82
68. Ordu Ç, Saip P, Kanserde Kemoprevansiyon, *Klinik Gelişim dergisi*, 2011; 24: 40
69. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69.
70. Klein, E.A., 2005. Can prostate cancer be prevented? *Nat. Clin. Pract. Urol*. 2,24–31.
71. Gleave M, Kelly WK. High-risk localized prostate cancer: a case for early chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2005;23;8186-91.
72. Kakizoe T. Chemoprevention of cancer-focusing on clinical trials. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 421-42.

73. Mahmud S, Franco E, Aprikian A. Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Systematic review and meta-analysis. *B J Cancer* 2004; 90: 93-9.
74. Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: Results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 1998; 81: 730-4.
75. Tannock IF, Gospodarowicz M, Meakin W, Panzarella T, Stewart L, Rider W. Treatment of metastatic prostatic cancer with low-dose prednisone: evaluation of pain and quality of life as pragmatic indices of response. *J Clin Oncol.* 1989;7;590-7.
76. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol.* 1996;14;1756-64.
77. Kantoff PW, Halabi S, Conaway M, Picus J, Kirshner J, Hars V, et al. Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study. *J Clin Oncol.* 1999;17;2506-13.
78. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351;1502-12.
79. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351;1513-20
80. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1495-1504.
81. www.sanofi-aventis.com.tr/urunler/Taxotere_80MG_Flakon_RR.pdf
82. Taxotere® Prescribing Information. Bridgewater, NJ: sanofi-aventis U.S. LLC; May 2010.
83. Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (Taxotere®): a semisynthetic afalogue of Taxol. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:288-291.
84. Eisenhauer EA, Vermorken JB. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs.* 1998;55:5-30.

85. Bissery M-C, Nohynek G, Sanderink G-J, Lavelle F. Docetaxel (Taxotere®): a review of preclinical and clinical experience. Part 1: preclinical experience. *Anticancer Drugs*. 1995;6:339-355.
86. Smith, N.F., et al., Identification of OATP1B3 as a High-Affinity Hepatocellular Transporter of Paclitaxel. *Cancer Biol Ther*, 2005. 4
87. Mackler N.J, Kenneth J.P, Drug Insight: use of docetaxel in prostate and urothelial cancers , *Nature Clinical Practice Urology*, 2005 VOL:2 NO: 2
88. Hennequin C, Giancanti N, Favaudon V. S-phase specificity of cell killing by docetaxel (Taxotere®) in synchronized HeLa cells. *Br J Cancer*.1995;71(6):1194-1198.
89. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:1513-20
90. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*. 1993;20:1-15.
91. R. Brigellus, M. Maiorino, F. Ursini and L. Flohê, Selenium: An Antioxidant?, *Handbook of Antioxidants*, Second Edition, Revised and Expanded, New York, USA, 2001, 633-553.
92. J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G. Hoekstra, Selenium: biochemical roles as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 179 (1973) 588-590.
93. J.T. Deagen, J.A. Butler., M.A. Beilstein, P.D. Whanger, Effects of dietary selenite, SeCys and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues, *J. Nutr.*, 117 (1987) 91-98.
94. Stoica, E. Pentecost and M.B. Martin, Effects of Selenite on Estrogen Receptor- α Expression and Activity in MCF-7 Breast Cancer Cells, *J Cell Biochem.*, 79 (2000) 282-292.
95. V. Regitz-Zagrosek, A. Kyriakopoulos, K.P. Pleissner, P. Jungblut, E. Fleck and D. Behne, Effects of selenium deficiency on the rat myocardial protein pattern investigation by two-dimensional gel electrophoresis, *Basic Res. Cardiol.*, 95(2000) 199-207.
96. R. Lobinski, J. S. Edmonds, K.T. Suzuki and P. C. Uden, Species-selective determination of selenium compounds in biological materials, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 447-461.

97. U. Tinggi, Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, *Toxicol. Lett.*, 137 (2003) 103-110.
98. Çetin M, Deniz G, Polat Ü, Yalçın A. The Effects of Inorganic and Organic Selenium Supplementation on Biochemical Blood Parameters in Broilers, *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 21 (2002) 59-63.
99. Gebre-Medhin, M., Ewald,U., Plantin, I., Tuvemo, T. (1984). Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Pediatr Scand.*, 73: 109-114.
100. Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 1996;276:1957-63
101. Calvo A, Xiao N, Kang J, Best CJ, Leiva I, Emmert-Buck MR, et al. Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. *Cancer Res.* 2002;62:5325-35.
102. Miller AL. Therpeutic Considerations of L-Glutamine: A Review of the Literature. *Altren Med Rev* 1999; 4:239-248.
103. Konyalıoğlu S, Özyer A. The Evaluation Of Plasma Glutamine Levels By Two Methods, *Ege Tıp Dergisi* 39 (1): 1 - 4 , 2000.
104. Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, et al. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: A randomized, doubleblind, controlled study. *Ann Surg* 1998;227:302-8.
105. Heberer M, Babst R, Juretic A, et al. Role of glutamine in the immune response in critical illness. *Nutrition* 1996;12:71-2.
106. Schmidt H, Martindale RG. Special nutrient formulas. In: Shikora SA, Martindale RG, Schwaitzberg SD (eds). *Nutritional Considerations in the Intensive Care Unit*. 1st ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 2002:357-64.
107. Wischmeyer PE et al. *Nutr Clin Pract* 2003; 18:377-385
108. Ziegler TR. Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. [Review]. *J Nutr.* 2001;131(9 Suppl):2578S-84S; discussion 2590S.

- 109.** Russel J.P, Jackson P, Kingsley A.E. Methods in molecular medicine vol:81, Prostate cancer methods and protocols
- 110.** https://www.dojindo.com/Protocol/Cell_Proliferation_Protocol.pdf
- 111.** Paul Held Ph. D., Senior Scientist, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc., An Absorbance-based Cytotoxicity Assay using High Absorptivity, Water-soluble Tetrazolium Salts, 2009.
- 112.** www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols
- 113.** Huei-Ju Ting, Jeffery Hsu, Bo-Yin Bao, Yi-Fen Lee, Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃, Cancer Letters 247 (2007) 122–129
- 114.** Rami G. Azrak, Cheryl L. Frank, Xiang Ling, et al. The mechanism of methylselenocysteine and docetaxel synergistic activity in prostate cancer cells, Mol Cancer Ther 2006;5:2540-2548
- 115.** Freitas M, Alves V, Sarmiento-Ribeiro AB, Mota-Pinto A., Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. Biochem Biophys Res Commun 2011 May 20;408(4):713-9.
- 116.** Hongjuan Z, Brooks J.D. Selenomethionine Induced Transcriptional Programs in Human Prostate Cancer Cells J Urol. 2007 February; 177(2): 743–750
- 117.** Sheth S. Current and emerging therapies for patients with advanced non small cell lung cancer. Am J Health Syst Pharm. 2010 Jan 1;67:S9-14
- 118.** Lucy H., Simpson G.R, Boxall A., Kottke T., Relph K. L., Vile R., Melcher A., Prestwich R., Harrington K., Morgan R., Pandha S. H, Synergistic effects of oncolytic reovirus and docetaxel chemotherapy in prostate cancer, BMC Cancer. 2011; 11: 221

8. EKLER

Etik Kurul Raporu

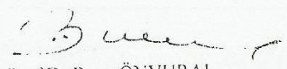
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OL MAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk. 20.3.2014

Doç.Dr.Hilal KOÇDOR
Yük.Lis.Öğr.Fırat SOYARAT

Kurulumuz tarafından 25.02.2011 tarih ve 82-GOA protokol numaralı 2011/05-03 karar numarası ile görüşülen "Doxotaksel Gutamin ve Selenyum Kombinasyonunun Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevantif Etkinliğinin Araştırılması" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Ek: Etik Kurul Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ÇAĞIR ADRESİ	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	82-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Doxotaksel Gutamin ve Selenyum Kombinasyonunun Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Kemoprevanatif Etkinliğinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR Onk.Ens.Temel Onk.B.D Yük.Lis.Öğr.Fırat SOYARAT
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Karar No:2011/05-03 Tarih:25.02.2011

KARAR BİLGİLERİ

Doç.Dr.Hilal KOÇDOR'un sorumlusu Yük.Lis.Öğr.Fırat SOYARAT'ın proje yürütücüsü olduğu "Doxotaksel Gutamin ve Selenyum Kombinasyonunun Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Kemopreventif Etkinliğinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D. Z. Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>[Signature]</i>

ÖZGEÇMİŞ
FIRAT SOYARAT

TC Kimlik No / Pasaport No:	20750245926
Doğum Yılı:	22.09.1986
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp A.D İnciraltı/İZMİR
Telefon:	05552140724
Faks:	
e-posta:	firatsoyarat@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Moleküler Tıp	Yüksek Lisans	2012
TR	Celal Bayar Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
-	-	-	-	-	-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Kanser kemoprevansiyonu

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
2010/2011 Yılı Mezuniyet Töreni En İyi Poster Ödülü	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2011

Hakemli Konferans/Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

“Comparison of the Curriculums of the Molecular Medicine Masters Program”, Orpheus Organization For PhD Education In Biomedicine And Health Sciences 6. Annual Congress,2011, İzmir, TURKEY
“Androjen Reseptörü Negatif Prostat Kanserlerinde Glutamin ve Selenyumun Standart Tedaviye Katkıları” 6. Cerrahi Araştırma kongresi, 2011, Ankara, Türkiye
“Çinkonun Prostat Kanseri Hücrelerinde Anti-Kanser Etkinliği” 6. Cerrahi Araştırma kongresi, 2011, Ankara, Türkiye
“Dosetaksel, Glutamin ve Selenyum Kombinasyonunun Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Antikanser Etkinliği ve Toksisite Üzerine Etkisi” , 4. Tıbbi Onkoloji Kongresi, 2012, Sözlü sunum Antalya, Türkiye
“Androjen Reseptörü Negatif Prostat Kanserlerinde Glutamin ve Selenyumun Standart Tedaviye Katkıları”,4. Tıbbi Onkoloji Kongresi, 2012, Antalya, Türkiye
“Çinkonun Prostat Kanseri Hücrelerinde Anti-Kanser Etkinliği”, 4. Tıbbi Onkoloji Kongresi, 2012, Antalya, Türkiye
“Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Dosetaksel ve Çinkonun Sinerjistik Etkisi”, Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi, 2012, Antalya, Türkiye
“Dosetaksel, Glutamin ve Selenyum Kombinasyonunun Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Antikanser Etkinliği”, Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi, 2012, Sözlü sunum, Antalya, Türkiye