



T.C.

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA (PC-3, DU-145)
DOSETAKSEL VE ACORUS CALAMUS EKSTRAKTI
UYGULAMASININ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hamza ÇATUK

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ahmet DİRİCAN

Manisa – 2019

ÖNSÖZ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi İç Hastalıkları kliniğindeki uzmanlık ihtisasım boyunca özellikle klinik çalışmalarında eğitimime sağladığı katkılar ve yol göstericiliği sebebiyle İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Elmas Kasap'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bana her konuda yardımcı olan, çalışma disiplini, işindeki özeni ve titizliği ile her zaman örnek aldığım, ayrıca tezimin hazırlanması sürecinde büyük katkıları sebebiyle tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet Dirican' a,

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman bilgilerinden yararlandığım, klinik ve poliklinik çalışmalarında verdikleri destek ve eğitimime katkıları sebebiyle Saygıdeğer İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Tezimin labarotuvan aşamasını gerçekleştirmemde katkıları sebebiyle Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Harika Atmaca' ya,

Uzmanlık eğitim sürecini paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum bölümümüzden mezun olmuş ve halen çalışan değerli asistan ve uzman arkadaşlarıma ve birlikte çalıştığımız tüm hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma,

Benden sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve tüm eğitimim süresince daima yanımda olan eşim Ebru Çatuk'a,

Bana baba olma hazzını tattıran, asistanlık süresince yüzümden tebessümü eksik ettirmeyen kızım Ayla Çatuk'a,

Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini hissettiren, beni bugünlere getiren annem, babam, kardeşlerim başta olmak üzere tüm aileme,
Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Hamza ÇATUK

Manisa, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
TABLO DİZİNİ	V
ŞEKİL DİZİNİ	VI
KISALTMALAR VE SİMGELER	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri	4
2.1.3. Belirti ve Semptomlar	6
2.1.4. Patoloji.....	6
2.1.5. Metastatik yayılım.....	7
2.1.6. Prognoz ve Doğal Seyir.....	7
2.1.7. Evreleme	9
2.1.8. Tedavi.....	12
2.2. Dosetaksiel	18
2.3. <i>Acorus calamus</i> (Hazanbel).....	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1. Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Özellikleri.....	22
3.2. Hücre hatları ve kültür ortamının hazırlanması	23
3.3. İlaçların Hazırlanması ve Hücrelere Eklenmesi	23
3.4. Sitotoksosite Ölçümü	24
3.5. Apoptoz	25

3.5.1. Apoptozun Değerlendirilmesi.....	27
3.5.1.1. Apoptozisin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	27
3.5.1.2. İstatistiksel Analiz	28
3. BULGULAR	29
4.1. PC-3, DU-145 Hücre Hatlarında Dosetaksel ve <i>Acorus calamus</i> bitki ekstraktının Zamana Bağımlı Anti Tümoral Etkilerinin Gösterilmesi ve IC ₅₀ Değerinin Saptanması ve IC ₅₀ Konsantrasyonunun Altındaki Dozlarda İlaç Kombinasyonlarının Kombinasyon İndeksleri Hesaplanması	29
4.2. <i>Acorus Calamus</i> Bitki Ekstraktı ve Dosetaksel Kombinasyonlarının Sitotoksisite Analizi	35
4.3. Dosetaksel ve <i>Acorus calamus</i> ekstraktı PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında sitotoksisite gösteren tekli uygulamalarının ve kombinasyonlarının apoptotik etkileri.....	38
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
6. ÖZET.....	45
7. SUMMARY	46
8. KAYNAKLAR.....	47
9. EKLER.....	53

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Prostat Kanseri D'Amico Risk Sınıflaması	10
Tablo 2. 2017 AJCC evreleme sistemi ile prostat kanserinin evrelendirilmesi	10
Tablo 3. Prostat kanseri anatomik evrelemesi, 2018 NCCN kriterleri	11
Tablo 4. Gleason Skorlama	12
Tablo 5. CalCusyn bilgisayar programına göre iki molekülün kombine sitotoksik sinerjistik-aditif-antagonistik etkilerini değerlendirmek için dikkate alınacak CI değerleri.	29



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Dosetakselin kimyasal yapısı	18
Şekil 2 A-C: 24-48-72 saatte PC-3 hücre hattında dosetakselin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24 saatte B:48 saatte C: 72 saatte	31
Şekil 3 A-C: 24-48-72. saatte PC-3 hücre hattında <i>Acorus calamus</i> bitki ekstraktının değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte	32
Şekil 4 A-C: 24-48-72. saatte DU-145 hücre hattında dosetakselin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte	33
Şekil 5 A-C: 24-48-72. saatte DU-145 hücre hattında <i>Acorus calamus</i> bitki ekstraktının değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte	34
Şekil 6 A-C: PC-3 hücre hattında 24-48-72. saatte dosetaksel ve <i>Acorus calamus</i> bitki ekstraktı kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte	36
Şekil 7 A-C: DU-145 hücre hattında 24-48-72. saatte dosetaksel ve <i>Acorus calamus</i> ekstrakt kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte	37
Şekil 8 A-C: PC-3 hücre hatlarında <i>Acorus calamus</i> bitki ekstraktı ve dosetakselin tekli ve sinerjik kombinasyonlarının hücre hatlarında 72. saatteki apoptotik etkileri A: Dosetaksel B: <i>Acorus calamus</i> ekstrakt C: Kombinasyon	39
Şekil 9 A-C: DU-145 hücre hatlarında <i>Acorus calamus</i> ekstrakt ve dosetaksel tekli ve sinerjik kombinasyonlarının hücre hatlarında 72. saatteki apoptotik etkileri A: Dosetaksel B: <i>Acorus calamus</i> ekstrakt C: Kombinasyon	40

KISALTMALAR VE SİMGELER

A.B.D	: Amerika Birleşik Devletleri
HRPC	: Hormon Dirençli Prostat Kanseri
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
NSAİİ	: Non-Steroid Antiinflatuar İlaç
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
RP	: Radikal Prostatektomi
RT	: Radyoterapi
HT	: Hormonoterapi
EAU	: European Association of Urology
ESMO	: European Society for Medical Oncology
AUA	: American Urological Association
ADT	: Androjen Duyarlı Tedavi
LHRH	: Luteinizing Hormone Releasing Hormone
RECIST	: Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
CRPC	: Castration Rezistant Prostate Cancer
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
5-FU	: 5-Fluorourasil
SWOG	: SouthWest Oncology Group
dUTP	: 2 DeoxyUridine 5 TriPhosphate
ADP	: Adenozin DiPhosphate
PARP	: Poly Adp Ribose Polimeraz
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
İL-6	: İnterleukon-6
AR	: Androjen Reseptörü
ICLC	: Interlab Cell Line Collection
EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute

E.R. : Endoplazmik Retikulum
CD 95 : Cluster of Differentiation 95
CTL : Sitotoksik T Lenfosit
APO-1 : Apoptosis Antigen 1
PS : Phosphatidyl Serin
ICE : Interleukin-1 Converting Enzyme
AIF : Apoptosis Inducing Factor
APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor-1
CI : Kombinasyon İndeksi
PSMA : Prostat Spesifik Membran Antijeni

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada 2018' de 17 milyon kişinin yakalandığı ve 9,6 milyon kişinin ölümüne sebep olan kanser; yaş, cinsiyet, dil, din, ırk ayırımı yapmaksızın tüm insanları etkilemektedir. Kanserde benzer seyir devam ettiği takdirde, 2040 yılında 27,5 milyon yeni vaka ortaya çıkması beklenmektedir. (1) Yapılan tahminler önümüzdeki yıllarda gelişecek olan kanser olgularının önemli bir bölümünün az gelişmiş ülkelerde ortaya çıkacağını göstermektedir. Ülkemizde ki en son resmi rakamlar değerlendirildiğinde bir yıl içerisinde yaklaşık 96.200 erkek ve 67.200 kadının kanser teşhisi aldığı tahmin edilmektedir. (2)

Prostat kanseri tüm dünyada erkeklerde görülen ikinci en sık kanser olmasından dolayı önemli bir sağlık problemidir. Ülkemizde 2014 verilerine göre erkeklerde insidansı 100000'de 32,9'dır ve akciğer kanserinden sonra ikinci sırada görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 2012 verilerine göre erkeklerde yaşam boyu prostat kanseri gelişme olasılığı yaklaşık yedide bir olarak tahmin edilmektedir. İnsidansı uluslararası populasyonlar arasında yaklaşık 25 kata kadar farklılık gösterebilmektedir. Uzakdoğu ülkelerinde insidans en düşük düzeylerde iken Afrikan-Amerikanlarda en yüksek düzeylerdedir. Etiyolojisi net olarak anlaşılamamasına rağmen insidansını etkileyen risk faktörleri iyi tanımlanmıştır. Başlıca ve en önemlileri yaş, aile hikâyesi, ırk ve genetik faktörler gibi değiştirilmesi mümkün olmayan faktörler rol oynamaktadır. Bunun yanında değiştirilebilir risk faktörleri olan diyet, obezite ve bazı çevresel faktörler diğer önemli risk faktörleridir (3). İleri evre kastrasyon duyarlı ve dirençli prostat kanserli hastalar için şu anda uygulanmakta olan tedaviler altında progresyon ve ölüm kaçınılmazdır. Dosetaksel kemoterapisi metastatik prostat kanserli hastaların tedavisinde etkin tedavilerden birisidir. Dosetaksel ve prednizon tedavi şeması ile ortalama 18,9 aylık bir sağkalım süresine ulaşılabilmiştir (4). Metastatik kastrasyon duyarlı ve dirençli prostat kanserinin tedavisinde sağlanan ilerlemelere rağmen mortalitesi hala çok yüksektir. Tedavideki temel amaç sağkalım süresini artırmak ve yaşam kalitesini iyileştirmektir.

Metastatik prostat kanseri için uygulanmakta olan tedaviler şu an için yeterli değildir. Bu nedenle prostat kanserinin tedavisi için daha etkili moleküllerin keşfedilmesine yönelik çalışmalara büyük ihtiyaç vardır. Bu amaca yönelik olarak yapılacak in-vitro çalışmaların sonucunda kliniğe uygulanabilir yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada hormon refrakter prostat kanseri hücre hatlarında (PC-3, DU-145), dozetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik etkisini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

Prostat kanseri dünyada erkeklerde ikinci en sık kanser olmasından dolayı önemli sağlık problemidir. Ülkemizde 2014 verilerine göre erkeklerde insidans 100000'de 32.9'dir ve akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Dünya genelinde ise erkeklerde, tahminen 2012'de 1.100.000 yeni vaka ve 307,000 ölümle ikinci en sık kanserdir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 2012 verilerine göre erkeklerde hayat boyu prostat kanseri gelişme olasılığı yaklaşık yedide bir olarak tahmin edilmektedir. İnsidansı uluslararası populasyonlar arasında yaklaşık olarak 25 kata kadar farklılık gösterebilmektedir. Uzakdoğu ülkelerinde insidans en düşük düzeylerde iken Afrikan-Amerikanlarda en yüksek düzeylerde görülmektedir. Etiyolojisi tam olarak anlaşılamamasına rağmen insidansını etkileyen risk faktörleri iyi tanımlanmıştır. Başlıca ve en önemli risk faktörleri: yaş, aile hikayesi, ırk ve genetik faktörler gibi değiştirilmesi mümkün olmayan faktörler rol oynamaktadır. Bunun yanında değiştirilebilir risk faktörleri olan diyet, obezite ve bazı çevresel faktörler diğer önemli risk faktörleri arasında yer alır (2). Ortalama ölüm yaşı 80 olarak gözlenmiştir. (5)

Yaş: Prostat kanserinin gelişme riski 50 yaşından sonra artmaktadır. Erkek kardeşinde ya da babasında prostat kanser öyküsü olanlarda risk 40 yaşından sonra artmaya başladığı gözlenmiştir. Prostat kanseri riski yaş ile doğru orantılı olarak artış gösterir ve ortalama tanı konma yaşı 60 yaş civarında izlenir. (6)

İrk: Prostat kanseri insidansı en yüksek oranda Amerikalı zencilerde görülür. Bu kişilerde yaşam boyu prostat kanseri gelişme oranı % 9,8 civarında gözlenmiştir. Amerikalı beyaz erkeklerde bu oran hafifçe düşük gözlenmiş olup % 8 dolayındadır. Çin ve Japonya'da prostat kanseri insidansı dünya geneline göre en düşük oranlarda seyretmektedir.

Amerika'ya göçen Japonlarda prostat kanser insidansı Japonya'da yaşayanlara göre daha yüksek olmakla birlikte Amerikalılara göre %50 daha düşük saptanmıştır. Sosyoekonomik durumun prostat kanseri riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Etnisiteye göre ortaya çıkan prostat kanser insidansındaki farkın nedeni henüz açıklanamamıştır. Fakat beslenme, hormonal durum ve genetik faktörler etnisiteden kaynaklanan farkı açıklayabilir. (7)

Coğrafi konum: Prostat kanseri insidansı 22/100.000 oranıyla en yüksek İskandinav ülkelerinde görülmektedir. Asya'da bu oran 5/100.000'dir. Bu coğrafi farklılığın güneş ışığındaki ultraviyole ışınlarına maruz kalma ile ters bir korelasyon gösterdiği öne sürülmüştür. Fakat bazı Afrika ülkelerinde yüksek prostat kanseri insidansının bildirilmesi bu hipotezi desteklememektedir. (8)

2.1.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Prostat kanseri başlangıç ve progresyonunun kesin sebepleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Elde edilen veriler hem çevresel hem de genetik faktörlerin bu hastalığın gelişiminde rolü olduğunu göstermektedir.

Prostat kanseri risk faktörleri arasında diyet ve içeriği giderek önem arzetmektedir. Son çalışmalar da diyetle birlikte vitamin E, vitamin D, resveratrol, hint safranı, likopen, fito östrojenler, uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinden ve selenyumdan zengin besin maddelerinin, fruktoz içeren meyvelerin yüksek oranda tüketimi, et, hayvansal yağlar ve kalsiyumdan zengin yiyeceklerin düşük oranda tüketimi prostat kanseri insidansını veya progresyonunu azalttığı gösterilmiş fakat halen tartışmalı sonuçlar bulunmaktadır (9).

Obezite ve prostat kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalardan bazıları obezitenin prostat kanseri riskini arttırdığını (10), bazıları ise etkilemediğini bildirmiştir (11). Obez hastalar koroner kalp hastalığı, diyabet, aterosklerozis ve hipertansiyon gibi ek hastalıkları nedeniyle daha sık sağlık kuruluşlarında izlem altında olduklarından daha genç yaşta prostat kanseri tanısı alabilmektedirler. Bu

yüzden bu hastalar tanı sırasında, düşük PSA düzeylerine ve erken evre hastalığa sahip olmaktadır (12). Ayrıca literatürde, prostat kanserli obez hastalarda radikal prostatektomi sonrasında biyokimyasal nüks riskinin yüksek olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (13).

Diyabet ve prostat kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda prostat kanseri riskinin diyabet tanısından birkaç yıl sonra arttığı, uzun süredir diyabet olanlarda prostat kanseri riskinin azaldığı gösterilmiştir (14). Literatürde bu sonucun nedenlerini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Diyabette, insülin direncinin sonucu olarak hastalığın ilk evrelerinde insülin düzeyi yükselmekte ve diyabetin ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan pankreastaki beta hücrelerinin hasarı sonrasında insülin düzeyi normalin altına düşmektedir. İnsülinin prostat kanseri hücre kültürlerine etkisini araştıran invitro çalışmalarda, insülinin bu hücre kültürlerinin çoğalmasında pozitif yönde etkilediği ortaya çıkarılmıştır (15). Ayrıca artmış serum insülin düzeyinin prostat kanseri riskini ve prostat kanseri rekürrens riskini arttırdığı da gösterilmiştir (16).

Birinci dereceden yakınlarından birinde prostat kanseri öyküsü olanlarda risk 2 kat, ikiden fazla prostat kanseri öyküsü olanlarda ise risk 9 kat artış göstermektedir (17). Yemeklerle alınan yağ oranının prostat kanseri riskini arttırabileceği ileri sürülmüştür (18). Prostat kanserinden korunmaya yönelik kemopreventif etkili ajanların saptanması için çalışmalar sürmektedir. Finasterid ile yapılan prostat kanserini önleme çalışmasında % 24,8'lik bir risk azalması bildirilmiştir (19). Bununla birlikte Finasterid kullanan hastaların devam eden takiplerinde yüksek dereceli prostat kanserinin bu erkeklerde daha yüksek bir oranda görüldüğüne dair bir bulguya rastlanmamıştır. Preklinik verilerde nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) prostat kanserinin oluşumunu engelleyebileceğine dair gözlemler nedeniyle yapılan bir çalışmada beş yıl boyunca ayda 30 tablet ve üzerinde NSAİİ kullananlarda prostat kanseri riskinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (20).

2.1.3. Belirti ve Semptomlar

Prostat kanseri sıklıkla ileri yaş hastalarda görülmekle birlikte nadiren genç erişkinlerde de ortaya çıkabilmektedir. Kanserin prostat dokusuna sınırlı olduğu erken evredeki hastalar tamamen asemptomatiktir. Hastalığın sessiz seyri nedeni ile 50 yaş üzeri erkekler yüksek rölatif riskli kabul edilerek, prostat kanseri için tarama programlarına alınmaları öngörülmektedir. Bu amaçla dijital rektal muayene ve prostat spesifik antijen (PSA) ölçümlerinin yıllık olarak tekrarı tarama için yeterli görülmektedir.

Hastalık ilerledikçe idrar projeksiyonunda azalma, pollaküri, dizüri ve idrar retansiyonu gibi prostatizm semptomlarıyla beraber kemik ağrıları ortaya çıkabilir. Fakat bu bulgular prostat kanseri için spesifik değildir. Mesane boynunun fonksiyone ya da mekanik obstrüksiyonuna bağlı acil olarak idrar yapma, idrarı tam boşaltamama hissi ve nokturi görülebilir. Kanserin prostatik üretra ve trigona invazyonu sonucu hastaların %15'inden azında hematüri gelişir ve hemospermi nadir olarak görülebilir.

İleri evrede rektumun invazyonu ile konstipasyon, abdominal ağrı, rektal kanama, diyare ve rektal ağrı görülebilir. Korpus kavernoza invazyon ile priapismus gelişebilir. Tümörün trigon ve daha yukarı yayılımı ile üreter alt uçlarına invazyonu sonucunda oligüri, anüri, üremi, ödem, sıvı retansiyonu ve elektrolit imbalansı gibi böbrek yetmezliği semptomları verebilir. Sırtta ve kalçada devamlı kemik ağrıları veya siyataljik ağrılar kemik metastazlarına bağlı olabilir. Nadiren pelvik lenfadenopatiler, supraklavikular veya aksiler lenfadenopatiler (genellikle sol taraflı) bazen semptom sebebi olabilir. Asit ve plevral efüzyonlar prostat kanserinin nadiren başlangıç bulgularıdır.

2.1.4. Patoloji

Prostat kanserinin büyük bir çoğunluğunu adenokarsinomlar oluşturur ve bunların %70'i prostatın periferik zonundan, %20'si transizyonel zondan, %10'u da santral zondan köken alır. Prostat kanseri %85 vakada multifokaldır. 40 yaşındaki her 100 erkeğin 30'unda mikroskopik latent prostat

kanseri vardır. Çok yavaş geliştikleri için birçoğu klinik önemli hale gelmezler (21).

Çok nadir görülebilen diğer kanserler; duktal adenokarsinom, müsinöz adenokarsinom, transizyonel karsinom ve nöroendokrin (küçük hücreli) tümörlerdir. Prostat adenokarsinomunun değerlendirilmesinde birçok derecelendirme sistemi mevcut olmasına rağmen en çok kabul gören Gleason derecelendirmesidir. Gleason sistemi; tümörün, küçük büyütmeye tespit edilen glandüler diferansiyasyon, büyüme paterni ve stroma ile ilişkisine dayanır. Sitolojik özellikler tümör derecelendirmesinde rol oynamaz. Primer ve sekonder yapısal paternler belirlenip, 1'den 5'e kadar derecelendirilir. 1 en iyi diferansiyasyonu, 5 en kötü diferansiyasyonu gösterir. Bulunan iki sayı toplanarak Gleason skor elde edilir. Tümör tek bir histolojik paternden oluşuyorsa primer ve sekonder paternlere aynı derece verilir. Gleason skoru, 2'den ($1+1=2$), 10'a kadar ($5+5=10$) değişir. Gleason dereceleme sisteminde skor gruplandırılması; 2-4 (düşük derece), 5-7 (orta derece) ve 8-10 (yüksek derece) olarak üçlü grup şeklinde yapılmıştır. Son çalışmalar; Gleason skor 7 kanserin, 5 ve 6'ya göre daha kötü prognozlu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle 2-4 (iyi diferansiyasyon), 5-6 (orta diferansiyasyon), 7 (orta-az diferansiyasyon), 8-10 (az diferansiyasyon) şeklindeki gruplandırma daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (22,23,24).

2.1.5. Metastatik yayılım

Lokal invazyon ile periprostatik yağ dokusuna, ejakülatuar kanallar vasıtası ile seminal veziküllere, lenfatiklerle bölgesel lenf nodlarına (hipogastrik, obturator) ve kan yolu ile kemiklere yayılır. Daha çok uzun kemiklere ve lumbosakral vertebralara metastaz yapar. Ancak diğer bütün kemiklere de metastaz yapabilir. Karaciğer ve akciğerlere daha az metastaz yapar.

2.1.6. Prognoz ve Doğal Seyir

Prostat kanserli hastaların optimum takibi hastanın yaşına, genel sağlık durumuna ve tümör risk grubuna göre değişiklik gösterir. Hastalık sürecinin doğal seyri heterojen olabilir. Bu nedenle tedavi kararı verilirken hastanın komorbid durumları ve beklenen yaşam süresi dikkate alınmalıdır.

Klinik olarak lokalize prostat kanseri olan hastalar konservatif olarak tedavi edilir (gözlem veya sadece hormonal tedavi); Gleason skoru düşük olan (2-4) prostat kanserli hastaların 15 yıl içinde kanserden ölme şansları oldukça düşüktür (%4-%7). Ancak Gleason skoru yüksek (8-10) olan kötü diferansiye tümörlü hastaların prostat kanserinden ölme ihtimalleri herhangi bir diğer nedenden ölme ihtimalinden daha fazladır. Hatta prostat kanseri tanısı 80'li yaşlarda konsa bile durum böyledir. Klinik olarak lokalize prostat kanseri tanısı 60 yaşından önce konan hastaların Gleason skoru 8-10 ise, eğer tedavi edilmezlerse 15 yıl içinde prostat kanserinden ölme şansları %87'dir (26).



2.1.7. Evreleme

2017 tarihli American Joint Comitte on Cancer (AJCC)'e göre (25) prostat kanseri evrelemesi Tablo-2 ve Tablo-3 'de gösterilmiştir.

Bu verilere göre “p” ön takısı TNM sisteminin klinik sınıflandırmasıyla kıyaslanabilecek patolojik sınıflandırmasını simgeler (pTNM). Klinik evreleme, genellikle ilk değerlendirmeyi yapan klinisyen tarafından, dijital rektal inceleme, serum tümör belirleyicileri, tümör derecesi ve görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmesidir. Patolojik evreleme ise makroskopik ve mikroskopik incelemeye dayandırılır. Patolojik evreleme, prognozu belirlemede klinik evrelemeden daha faydalıdır. Çünkü tümör volümü, cerrahi sınır, ektrakapsüler yayılımın boyutu, veziküla seminalis ve pelvik lenf nodu tutulumu hakkında bilgi verir.

Prostat kanserinde en uygun tedavinin planlaması risk değerlendirmesine göre gerçekleştirilir. Kanser organa sınırlı olma, bölgesel lenf nodlarına yayılım gösterme, uzak metastaz yapma özelliklerinin değerlendirilmesine evreleme denir. Radyolojik görüntüleme (bilgisayarlı tomografi [BT], MRG) ya da kemik sintigrafisi evrelemede kullanılan yöntemlerdir. Son yıllarda yüksek sensivite ve spesifite nedeniyle PSMA PET BT kullanıma girmiştir. TNM sisteminde, prostat kanserinin organ içine sınırlı olma durumu T evrelemesi (parmakla rektal muayene, PSA, TRUS ve multiparametrik MRG ile); lenf nodu tutulumu N evrelemesi (BT, MRG ve lenf nodu örneklemesi ile); ve uzak metastaz M evrelemesi (torakoabdominal BT ve kemik sintigrafisi) ile tanımlanır (27).

Evrelendirmenin amacı organa sınırlı hastalık, lokal yayılım ve metastaz varlığını belirleyerek hastanın en uygun tedaviyi almasını sağlamaktır. Evrelemede T evresi, PSA ve Gleason skoru aracılığıyla risk grupları saptanır ve tedavi seçeneği belirlenir. NCCN Kılavuzuna göre risk grupları çok düşük, düşük, orta, yüksek, çok yüksek, metastatik olarak detaylı altı sınıfa ayrılmıştır. Ancak daha basit ve pratik olması açısından prostat kanseri risk sınıflamasında D'Amico sisteminin kullanımı önerilmektedir (28).

Tablo 1. Prostat Kanseri D'Amico Risk Sınıflaması

Düşük risk	Orta risk	Yüksek risk	
PSA <10 ng/ml ve Gleason skoru <7 ve cT1-2a	PSA 10-20 ng/ml veya Gleason skoru 7 veya cT2b	PSA >20 ng/ml veya Gleason skoru >7 veya cT2c	Tüm PSA düzeyleri Tüm Gleason skorları cT3-4 veya cN+
Lokalize	Lokalize	Lokalize	Lokal ileri

Orta ya da yüksek risk grubundaki kanserlerin klinik olarak önemli olduğu kabul edilir. Düşük risk taşıyan hastalarda radyolojik ve nükleer tıp yöntemleri kullanılarak yapılan görüntüleme çalışmaları uygulanmayabilir.

Orta risk grubunda, PSA <10 ng/ml veya birincil Gleason skoru 4 ise kemik sintigrafisi, BT, MRG yapılması önerilir.

Tablo 2. 2017 AJCC evreleme sistemi ile prostat kanserinin evrelendirilmesi

Tümörün klinik (cT) evresi	
Evre cT1:	Klinik olarak görülebilen ya da palpe edilebilen bir tümör yok, görüntüleme ile de saptanabilen bir tümör yok.
T1a	Çıkarılan dokunun %5'inden azında tümörün histolojik bulguları mevcut.
T1b	Çıkarılan dokunun %5'inden çoğunda tümörün histolojik bulguları mevcut.
T1c	İğne biyopsisi ile saptanan tümör (ör, PSA'daki yükselme)
Evre cT2	Tümör prostat içinde sınırlı
T2a	Bir lobun yarısını veya yarısından daha azını tutan tümör
T2b	Bir lobun yarısından çoğunu tutan tümör, ancak her iki lobu tutmamış
T2c	Her iki lobu tutan tümör
Evre cT3	Prostat kapsülünün dışına çıkan tümör
T3a	Kapsülün dışına yayılım (tek taraflı veya her iki tarafı tutan)
T3b	Seminal vezikül ya da vezikülleri tutan tümör
Evre cT4	Seminal veziküller dışında tümörün komşu yapılara (mesane boynu, dış sfinkter, rektum, levator kasları ve/veya pelvik duvar) yapışması veya invaze etmesi.
Tümörün patolojik (pT) evresi	
Evre pT2	Organa sınırlı
pT2a	Tek taraflı, bir lobun yarısını ya da daha azını tutan
pT2b	Tek taraflı, bir lobun yarısından çoğunu tutan, fakat diğer lobu tutmayan
pT2c	İki taraflı
Evre pT3	Prostat dışına yayılım
pT3a	Prostat dışına yayılım
pT3b	Seminal veziküle invazyon

Evre pT4	Mesane ve rektum'a invazyon
Bölgesel lenf nodları	
NX	Bölgesel lenf nodunun değerlendirilmemesi
N0	Bölgesel lenf nodunda metastaz yok
N1	Bölgesel lenf nodlarına metastaz var
Uzak organ metastazları	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
M1a	Bölgesel lenf nodları dışında metastaz var
M1b	Kemik metastazları
M1c	Kemik metastazları ile birlikte olan ya da olmayan diğer bölgelerde metastaz

Tablo 3. Prostat kanseri anatomik evrelemesi, 2018 NCCN kriterleri

Grup	T	N	M	PSA (ng/ml)	Grade (G)
Evre I	cT1a-c	N0	M0	<10	G1
	cT2a	N0	M0	<10	G1
	pT2	N0	M0	<10	G1
Evre IIa	cT1a-c	N0	M0	≥10<20	G1
	cT2a	N0	M0	≥10<20	G1
	pT2	N0	M0	≥10<20	G1
	cT2b	N0	M0	<20	G1
	cT2c	N0	M0	<20	G1
Evre IIb	T1-2	N0	M0	<20	G2
Evre IIc	T1-2	N0	M0	<20	G3
	T1-2	N0	M0	<20	G4
Evre IIIa	T1-2	N0	M0	≥20	G1-4
Evre IIIb	T3-4	N0	M0	Herhangi PSA	G1-4
Evre IIIc	Herhangi T	N0	M0	Herhangi PSA	G5
Evre IVa	Herhangi T	N1	M0	Herhangi PSA	Herhangi G
Evre IVb	Herhangi T	Herhangi N	M1	Herhangi PSA	Herhangi G

Tablo 4. Gleason Skorlama

Grade	Gleason Skor	Gleason Patern
G1	≤6	≤3+3
G2	7	3+4
G3	7	4+3
G4	8	4+4, 3+5, 5+3
G5	9-10	4+5, 5+4, 5+5

2.1.8. Tedavi

Prostat kanserinde tedavi, cerrahi (radikal prostatektomi, RP), radyoterapi (RT), hormonal tedaviler (HT), kemoterapi (KT), hedeflenmiş tedaviler ve immünoterapiler yaklaşımlarının risk gruplarına göre tek başına ya da birlikte kullanımı ile gerçekleştirilir. Prostat kanserinde tedavinin belirlenmesi tartışmalı alanlardan birisidir. Bunun temel nedenleri:

- Hastaların yaşam beklentisine ve genel sağlık durumuna göre tedavinin değişkenlik göstermesi,
- Uzmanlık alanları arasında tartışmalı konuların varlığı,
- Kılavuzlar arasında farklılıklar olabilmesi,
- Klinik uygulamaya kılavuz önerilerinin birebir yansıtılmasında zorluklar olması,
- Literatürde tedaviye ve kılavuzlara temel oluşturan klinik çalışmaların çoğunlukla retrospektif verilere dayalı, kanıt değeri sınırlı çalışmalar olmasıdır. Bunların sonucunda, prostat kanseri tedavisinde hekimin ve hastanın tercihi göre benzer klinik durumlarda birbiri yerine uygulanabilecek farklı tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Bu bölümde sırasıyla EAU, ESMO, NCCN ve AUA Kılavuzları'ndaki prostat kanseri tedavi yaklaşımları her kılavuzun kendi sınıflaması esas alınarak özetlenip, Türk Tıbbi Onkoloji Derneği Prostat Kanseri Kılavuzu Komitesi'nin düşük, orta ve yüksek riskli ve ileri evre prostat kanseri için tedavi önerileri verilecektir.

Tüm risk grupları için genel ilkeler;

Prostat kanserinde tedavi seçimi hastanın da dâhil edildiği multidisipliner bir yaklaşımla yapılmalıdır. Tedavi kararı verilirken, hastanın yaşı, yaşam beklentisi (en az 10 yıl), performansı, eşlik eden sağlık sorunları ve aile öyküsü dikkate alınmalıdır.

Düşük riskli prostat kanseri;

Tedavi seçenekleri;

- Aktif izlem
- RT
- Cerrahi (RP)

Çalışmalar arasında mutlak görüş birliği olmasa da, aktif izlem için uygun hastanın belirlenmesinde aşağıdaki ölçütler dikkate alınır:

- Biyopsi örneklerinde 2-3'ten az odakta tümör olması
- Herhangi bir biyopsi odağında %50'den fazla tutulum olmaması
- PSA <10 ng/ml
- Gleason skoru <4

Aktif izlemde şunlar yapılır:

İlk yıl 3 ayda bir, sonra 6 ayda bir total PSA ve yıllık parmakla rektal muayene

Tanı sonrası 3-6 ayda biyopsi yapılmadıysa, birinci yıl sonunda ve sonra iki yılda bir tekrar biyopsi

Aktif izlemde çıkıp tedaviye geçiş (klinik önem kazanma) kriterleri:

- PSA ikilenme zamanı [doubling time] < 1-3 yıl
- Biyopside Gleason skoru yükselmesi
- Hastanın izlemi tolere edememesi

Orta riskli prostat kanseri

Tedavi seçenekleri:

- Radikal RT ± HT (6-9 ay kısa dönem)
- Cerrahi (RP)
- Yüksek riskli prostat kanseri

Bu grup metastaz olmayan ve yüksek riskli klinik bulguları olan ve ya lenf nodu pozitifliği olan hastalardır.

Tedavi seçenekleri:

- Radikal RT ± HT (2-3 yıl uzun dönem)
- Cerrahi (RP)

Bu risk grubundaki hastalarda tek modalite ile tedavi başarısı düşük olduğundan, tedavi kararının ayrıntılı evreleme ve mutlak multidisipliner yaklaşım ile verilmesi önerilmektedir.

RP sonrası RT

1. Adjuvan RT uygulanması önerilen durumlar:

- Ekstraprostatik tutulum
- Cerrahi sınır pozitifliği
- Lenf nodu pozitifliği (HT ile beraber)
- Veziküloseminalis tutulumu

2. Kurtarma RT uygulanabilecek durumlar:

- Hedeflenen en düşük PSA değerine ulaşamaması
- RP sonrası izlemde PSA artışı (PSA değeri 0,2 ng/ml ulaşmadan önce kurtarma RT önerilir.)

İleri evre hastalık

1. Biyokimyasal nüks (non-metastatik PSA nüksü) (örn. tedavi sonrası PSA artışı)

2. Metastatik prostat kanseri

Biyokimyasal nüks

Biyokimyasal nüks, tedavi edilen (cerrahi veya RT) hastada PSA yüksekliği saptanmasıdır.

Bu hastalarda hangi tedavinin uygulanacağı hastalığın özelliklerinin yanı sıra hastanın bulunduğu yerdeki imkânlarla ilişkilidir. Ancak karar aşamasında aşağıdaki değerlendirmeler belirleyicidir:

- Önceki tedavi
- Yaşam beklentisi
- Genel durum (performans durumu)
- PSA ikilenme hızı

Tedavi seçenekleri:

- Kurtarma RT (önceden cerrahi görmüş hastalarda)
- Kurtarma cerrahisi ya da kriyoterapi / fokal tedavi gibi alternatif tedavi yöntemleri (günümüz şartlarında önceden RT görmüş hastalarda) Kurtarma cerrahisi uygulanacak hastalar morbidite oranlarının yüksekliği açısından bilgilendirilmelidir.
- ADT (önceden cerrahi ve/veya RT)
- İmmünoterapi (önceden cerrahi ve/veya RT)
- İzlem (önceden cerrahi ve/veya RT)

İzleme alınan hastalar için, izlemde kaldığı sürece aşağıdaki işlemler yapılmalıdır:

- 6 ayda-1 yılda bir görüntüleme ile metastaz taraması
- 3 ayda bir PSA ölçümü

Metastatik prostat kanseri

Prostat kanseri ilk tanıda metastatik olarak belirlenebildiği gibi izlemde de metastatik hale gelebilir. Metastatik hastalık için, sistemik tedaviler uygulanır.

Metastatik prostat kanseri temel olarak ikiye ayrılır:

- ADT duyarlı [hormon naif] olanlar (hiç HT almamış)
- Kastrasyona dirençli olanlar (daha önce çok defalar HT almış)

Hormon duyarlı metastatik prostat kanseri

Tedavi seçenekleri:

- Kemoterapi alabilecek performans durumundaki hastalarda ADT (örn. LHRH analogları veya bilateral orşiyektomi veya LHRH antagonisti) + KT
- Yaş, komorbidite gibi nedenlerle performans durumu kemoterapi almaya uygun olmayan hastalarda ADT (örn. LHRH analogları veya bilateral orşiyektomi veya LHRH antagonisti)
- Tedavisiz izlem (progresyon olduğunda değerlendirme)

Son klinik çalışmalar, metastatik hastalıkta ADT ile eşzamanlı olarak KT uygulanmasının yaşam süresi üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Bunlardan ilki olan CHAARTED çalışmasında yeni tanı aldığında metastatik olan yüksek volümlü hastalarda androjen baskılanmasına ilave edilen 6 kür dosetaksel tedavisi ile sağkalımda ileri derecede anlamlı artış gösterilmiştir (29). Bunu takip ederek STAMPEDE çalışması, metastatik tanı konan, takipte metastaz gelişen hastalarda, risk grubu ayırd etmeksizin, kemoterapinin sağkalıma katkısı olduğunu göstermiştir (30). 2015 ESMO kılavuzu, metastatik hormon duyarlı prostat kanseri tedavisinde, ADT ile birlikte dosetaksel uygulanmasını, kemoterapi alabilecek kadar performansı iyi her hastada önermektedir (31). Aynı endikasyonda LATITUDE çalışmasında Abirateron hem düşük, hem yüksek

riskli hastada etkili olduğu gözlenmiştir (32). Androjen baskılaması kastrasyona direnç geliştiğı zaman da sürdürülmelidir.

Kastrasyona dirençli metastatik prostat kanseri (CRPC)

Kastrasyon direnci tanımı: (27)

- Serum testosteron <50 ng/dl veya 1,7 nmol/l ve
- Biyokimyasal progresyon (en az birer hafta ara ile ardışık 3 PSA ölçümünün ikisinde >%50 PSA yükselmesi, PSA >2 mg/ml)
- Ya da Radyolojik progresyon (kemik sintigrafisinde iki veya daha fazla kemik lezyonunun görülmesi ya da var olan bir yumuşak doku lezyonunda RECIST kriterlerine göre büyüme olması)

Tedavi seçenekleri:

Dosetaksel öncesi;

- Abirateron
- Enzalutamid
- İmmünoterapi (minimal metastatik semptomsuz hastalık için)

Dosetaksel sonrası;

- Kabazitaksel
- Abirateron
- Enzalutamid

Bu tedaviler sırasında ADT sürdürülmelidir.

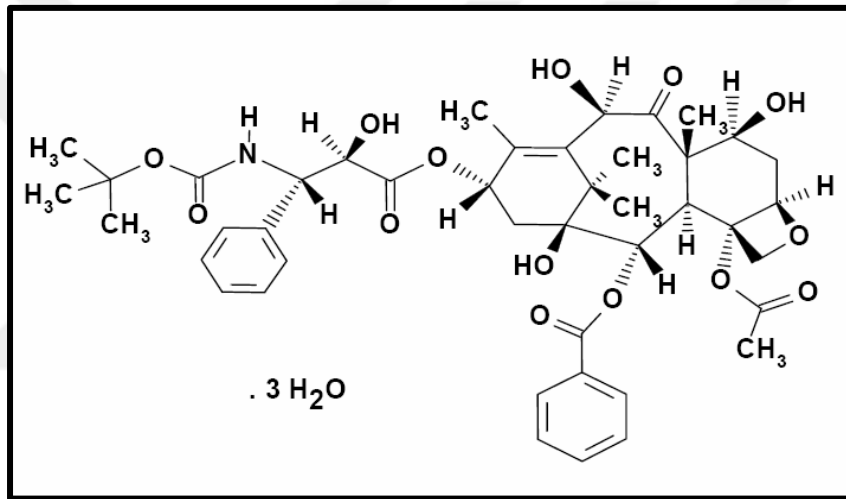
Kemik metastazı olan CRPC Tedavi seçenekleri:

- Kemik hedefli ajanlar zolendronik asit [bifosfonat], denosumab [RANK-ligand inhibitörü]

- Radyum-223 (sadece kemik metastazı olan CRPC hastalarında dosetaksel öncesinde ve sonrasında)
- Gerekli olgularda palyatif RT (33).

2.2. Dosetaksel

Kimyasal ismi, (2R,3S)-N-carboxy-3-phenylisoserine, N-tert-butyl ester,13-ester with 5 β -20-epoxy-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahydroxytax-11-en-9-one 4-acetate 2-benzoate-trihydrate dir.



Şekil 1. Dosetakselin kimyasal yapısı

Dosetaksel Avrupa porsuk ağacı *Taxus Baccata*'nın yapraklarından elde edilen taxan ailesine ait yarı sentetik bir ilaçtır. Molekül ağırlığı 807.879 g/mol dür. Etki mekanizması, hücre içindeki mikrotubulleri stabilize eder ve tubulin dimerlerden mikrotubulus oluşumunu artırır. Hücrede tubulin / mikrotubul dengesi bozulur ve nonfonksiyone tübüller lehine denge oranı değişir. Hücre içinde biriken polimerize mikrotubuller DNA, RNA ve protein sentezini bozarak G2/M fazında maksimum sitotoksik etkisini gösterir. Bcl-2 ve Bcl-x gen ekspresyonunun etkilerini tersine çevirdiği saptanmıştır. Dosetakselin hücre içinde birikimiyle polimerize mikrotubullerin

ayrılmazadığına inanılmaktadır. Proliferasyon aşamasındaki kanser hücresi, siklusun G2/M fazında arrest olur ve apoptoza yönelir (34).

İn-vitro çalışmalar çeşitli fare ve insan kanser hücre hatlarında 4-35 ng/mL gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterir. Bir çok antitumoral ajanla kombine edilerek antitumoral etkilerinde oluşabilecek sinerjistik etkiler araştırılmış; cisplatin veya adriamycin ile herhangi bir sinerjistik etki saptanmamıştır. Vinkristin ile kombinasyonunda additif etki elde edilmiştir. Siklofosfamid ve 5-FU ile sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Dosetakselin in-vivo etkileri, deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan tümör ksenograftları üzerinde komplet remisyon oluşturmasıyla gösterilmiştir. İnsan over, meme ve melanom hücre paneli ile deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan kanser depozitleri üzerinde küratif antineoplastik etki gösterdiği saptanmıştır (35-36).

Dosetaksel temel kemoterapi şemaları ile androjen refrakter prostat kanserli hastaların tedavisinde bir sağkalım avantajı sağladığını gösteren iki büyük randomize çalışmanın sonuçları kemoterapinin rolünü son birkaç yıldır önemli olarak değiştirmiştir. Southwest Oncology Group (SWOG)'dan bir grup araştırmacı tarafından hastalar Mitoksantron, Prednizon ile Dosetaksel, Estramustin, Deksametazon kollarına randomize edilmiş. Dosetaksel kolundaki hastalarda sağkalımda anlamlı bir artış (2 ay) saptanmıştır (37). Tennoek ve arkadaşlarının yaptığı ikinci bir çalışmada 75 mg/m² dosetaksel + prednizon verilen hastalar ile mitoksantron + prednizon verilen hasta kolu karşılaştırıldığında benzer bir sağkalım avantajı bildirilmiştir (4). Bu çalışmalarda metastatik prostat kanserinde ilk kez kemoterapi ile sağkalımda bir artış olduğu saptanmıştır. Bu artış nedeniyle dosetakselin yeni ajanlarla kombinasyonunu içeren birçok çalışma yapılmıştır. Ancak kombinasyon çalışmalarında bugüne kadar klinik olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Dosetakselin doz sınırlayıcı olabilen toksik etkileri miyelosupresyon, nöropati veya her ikisinin bir arada bulunduğu bir klinik tablo ile karşımıza çıkabilir.

2.3. *Acorus calamus* (Hazanbel)

Hindistan'da, 2200 rakımda dahi yaygın halde bulunabilen bitki; Türkiye, Avrupa, Doğu Asya ve Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinde, nehir-göl yataklarında yetişir. Eski Mısırlılar tarafından, MÖ 1300'lü yıllarda, ilaç ve parfümeri hammaddesi olarak kullanıldığı sanılmaktadır. MS 1. yüzyılda yaşamış, Anazarba doğumlu Anadolu hekimi Pedanius Dioscorides tarafından Hazanbel, "*Calamus aromaticus*" (Kalamos Euodes) olarak adlandırılmıştır. Tütün'e göre Hazanbel, 1550 yıllarında, Türkiye'den Avrupa'ya tıbbi bitki olarak götürülmüş ve orada yayılmıştır. Hazanbel bitkisinin, kromozom sayılarına göre belirlenen, dört sitotipi bulunur. Hindistan'da yetişen tetraploit form, bitkinin toksik bileşeni olan 'beta-asaron' içerir. 'Beta-asaron' içermediği için tercih edilen diploit formlar, Türkiye'de ve Kuzey Amerika'da bulunur. Triploit formlar, meyve vermez ve sadece vejetatif yolla üreyebilir. Hazanbel, ülkemizde "eğir kökü", "azakeğeri", "kurtluca" adlarıyla da bilinmektedir. Sapanca, Yeniçağa ve Beyşehir göllerinin kıyılarında yetişmektedir (38).

Beta-asaron, geleneksel Çin tıbbi *Acorus calamus*'un ana biyoaktif bileşenlerinden biridir. Önceki çalışmalar antifungal ve anthelmintik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (39-40). Bununla birlikte, antikanser etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bir çalışmada, LoVo kolon kanseri hücre hatları üzerindeki inhibitör etkileri belirlemek ve in vitro ve in vivo altta yatan mekanizmaları açıklığa kavuşturmayı amaçlamıştır. Doz-yanıt ve zamana bağlı anti-proliferasyon etkileri MTT analizi ile incelenmiş olup bulgular LoVo hücre canlılığının β -asaron'da doz ve zaman bağımlılığı gösterdiğini ortaya koymuştur. Flow sitometri kullanılarak anneksin V-florescein izotiosiyanat / propidyum iyodür protokolüyle β -asaronun apoptotik etkisi gösterilmiştir. Kaspaz-9 ve kaspaz-3 kaskadlarını harekete geçirmenin yanı sıra mitokondriyal membran potansiyelini azaltıp ve Bcl-2-Bax oranını düşürerek mitokondriyal / caspase yolu ile apoptozu tetiklediği görülmüştür. LoVo tümör ksenograftlarını taşıyan nude farelerde β -asaron ile tedavi edildiğinde, tümör hacimlerinin azaldığı ve eksize edilen dokunun terminal deoksinükleotid transferaz aracılı TUNEL yöntemiyle de apoptotik

değişiklikler olduğu gösterildi. Birlikte ele alındığında, bu bulgular ilk kez β -asarunun kolon kanserinin büyümesini baskılayabileceğinin kanıtı sağladığı ve bunun sonucunda ortaya çıkan apoptozun muhtemelen mitokondri / caspase yolları aracılığıyla aracılık ettiği ortaya konmuştur (41-42-43). Ayrıca β -asarone ile yapılan bir çalışmada kolorektal kanser hücrelerinde apoptotik etkisinin Lamin B1 aracılıklı olabileceği düşünülmüştür. β -asarone lamin B1 i artırdığı, lamin A-C yi artırmadığı gözlenmiştir. Lamin B1 artışının da apoptozu tetikleyen p53, p21, oct-1 ve p15 i uyardığı tahmin edilmektedir. (44)

Türkiye’de H. Koca ve arkadaşları tarafından *Acorus calamus* kökünün etanolik ekstraktının insan prostat kanser LNCaP hücre dizisinde hücre çoğalmasına, angiogeneze ve apoptozise olası etkileri in vitro ortamda çalışılmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca çeşitli ekstrakt konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve bu konsantrasyonlardaki ekstraktlar 24 ve 48 saatte LNCaP hücre yaşayabilirliğini kontrolle karşılaştırıldığında doza ve zamana bağlı olarak %44'lere kadar azalttığı görülmüş. Bölünmüş PARP, VEGF-A proteini ve gen ekspresyon miktarlarında 24 ve 48 saat sonra belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu çalışma *Acorus calamus* kökünün etanolik ekstraktının zaman ve doz bağımlı olarak güçlü bir anti-kanser, anti-angiogenik ve apoptotik etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır (45).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Özellikleri

PC-3 prostat kanseri hücre hattı hormon dirençli prostat kanseri kemik metastazından üretilmiştir. Prostat antijeni eksprese eder. Düşük 5 alfa redüktaz aktivitesine sahiptir. DU-145 hücre hattı ile karşılaştırıldığında daha yüksek metastaz yapma potansiyeline sahiptir (46). PC-3 hücreleri kültür ortamında hem tek tabakalı yüzeysel büyüme yeteneğine hem de yumuşak agar süspansiyon ortamında kontrolsüz çoğalma yeteneğine sahiptirler. Sıçanlara verildiklerinde cilt altında tümör oluşturabilirler. Transplante edilen tümör hücrelerinin kültürü ile oluşturulan insan kanser hücre hattı, başlangıçta tümör oluşturmak üzere kullanılan kanser hücreleri ile eşdeğerdir. İlaça dirençli prostat kanser hücreleri olan PC-3 hücreleri normal prostat hücreleri ile karşılaştırıldığında androjenlere, glukokortikoidlere, epidermal büyüme faktöre veya fibroblast kaynaklı büyüme faktörüne karşı yanıtız olduğu ve serumdaki diğer büyüme faktörlerine karşı da çoğunlukla dirençli olduğu saptanmıştır. PC-3 kanser hücreleri, fonksiyon görmeyen androjen reseptörleri (AR), IL-6 reseptör ekspresyonu ve IL-6 sekresyonu yapabilme yeteneğine sahiptirler. PC-3 hücrelerinin fonksiyonel ve morfolojik özellikleri, kötü diferansiye adenokarsinomlardaki ile aynıdır. Bu hücreler, metastatik prostat kanser hücrelerinin biyokimyasal değişikliklerini ve onların kemoterapötik ilaçlara karşı yanıtlarını araştırmada faydalıdır.

DU-145 prostat hücre serisi prostat kanseri tanısı almış 69 yaşındaki bir erkek olgunun beyin metastazından üretilmiş, Stone ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (47). Hormonoterapiye ve kemoterapiye dirençli olarak bilinir. "Nude" farelere enjekte edildiğinde derece II prostat adenokarsinomu oluşturan tümörojenik etkisi vardır.

Chakraborty ve Vonstein DU-145 prostat hücrelerinin hücresel iskelet yapılarını ışık, elektron ve immünfloresan mikroskopunda incelemişler ve insan prostat kanseri üzerinde yapılacak ileri çalışmalar için mükemmel in vitro model oluşturacağını bildirmişlerdir (48). İzole hücreler yumuşak agarda koloniler oluştururlar. Hem hücre hattının hem de orijinal tümörün ultra

yapısal analizinde desmozom, tonofilaman ve mikrovillus içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca birçok mitokondri, iyi gelişmiş golgi aparatları ve heterojen lizozomlar içerdiği görülmüştür. Prostat antijeni eksprese etmez.

3.2. Hücre hatları ve kültür ortamının hazırlanması

İnsan hormon-dirençli prostat kanseri hücre hatları olan PC-3 , DU-145, Interlab Cell Line Collection (ICLC), dan temin edildi. Bu hücre hatları, 50 ml'lik kaplara (Falcon) RPMI 1640 besiyeri (Kibutz Beit Haemeh, 25115, İsrail) ile birlikte kültürde çoğaltılmak üzere yerleştirildi; ortama 2 µM glutamin (Kibutz Beit Haemeh, 25115, İsrail), %10 fetal bovin serumu (Life Technologist) ve % 1 streptomisin eklenerek tek katman halinde çoğaltıldı. Hücre kültür işlemleri Hood (NuAire,USA) ve inkübatörde (NuAire,USA) gerçekleştirildi. İşlem öncesi Hood 30 dakika ultraviyole lambası ile sterilize edildi ve ardından alkol ile silindi. Sıvı nitrojende (-196 °C) saklanmış olan PC-3, DU-145 hücre örnekleri oda sıcaklığında eritildi ve 50 ml'lik flasklara steril şartlarda aktarıldı. Üzerine 10 ml besiyeri eklendi. Flask inkübatöre konmadan önce kapağı hafif gevşetildi ve hücreler humidifiye, 37 °C" de %5 CO2 ortamında çoğaltıldı. Kültür medyumunu haftada iki defa değiştirildi. Pasajlar, hücrelerin çoğalma ve morfolojileri gözlemlenerek gerçekleştirildi. Her pasaj sırasında ortalama 2 milyon hücre, 10 ml besiyeri konmuş flasklara alındı. Hücreler kaplardan tripsin-EDTA (Biological Industries Indianapolis) ile muamele edilerek ayrıştırıldı ve trypan blue dye exclusion test ile boyanarak hem canlılık hem de enfeksiyon açısından değerlendirildi.

3.3. İlaçların Hazırlanması ve Hücrelere Eklenmesi

Çalışmamızda PC-3, DU-145 prostat kanseri hücre hatlarında *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetakselin farklı dozlarının tek başına ve kombine uygulanmasındaki antitümöral etkinliğinin araştırılması planlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan *Acorus calamus* bitki kökleri Muğla-Fethiye bölgesinden ağustos-eylül aylarında toplanmıştır. Toplanan *Acorus calamus* kökü %96 lık etil alkol ile 1/10 oranında karışım elde edilecek şekilde 24 saat

kariştırıldı. Sonra süzüldü. Süzüntü vakumda buharlaştırıldı. Kalan toz kullanılmak üzere alındı.

Dosetaksel sıvı formda 0,002 M stok solusyon oluşturmak üzere DMSO" da çözüldü. *Acorus calamus* bitki ekstraktı 0,3 M stok solusyon oluşturmak üzere etanolda çözüldü. Stok solüsyonları -20°C' de saklandı. Çalışmanın başında 96' lık "well plate" kültür kaplarına her bir well (kuyucuk) içine toplam 100 µl volüm içinde 10 000 hücre olacak şekilde (sadece besiyeri koyularak negatif kontrol olarak kullanılacak kuyucuklara da 100 µl besiyeri koyularak) ve her bir konsantrasyon için üçlü kontrollü (triplicate) hücre ekimleri yapılmıştı. Dosetaksel deneyimizde çalışılan konsantrasyonlar 0,5 µg/l, 1 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 20 µg/l, 40 µg/l ve 80 µg/l olarak planlandı. *Acorus calamus* bitki ekstraktı için konsantrasyonlar 100 µg/l, 250 µg/l, 500 µg/l, 750 µg/l, 1000 µg/l, 1250 µg/l olarak belirlendi. Hücre ekim işleminden sonra 24 saat boyunca inkübatörde bekletilen kuyucuklara planlanan konsantrasyonlardaki dosetaksel, *Acorus calamus* bitki ekstraktı toplam 100 µl volüm içinde olacak şekilde, tek başlarına veya kombine edilecekleri dozlarında 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite analizleri için eklendi (her bir deney 3 kez tekrarlanacak şekilde).

3.4. Sitotoksisite Ölçümü

Sitotoksisite analizi için XTT Proliferasyon Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) kullanıldı. Analizin temeli tetrazolium tuzunun canlı hücreler tarafından metabolize edilmesinden sonra sarı renk tonundan turuncu renge dönüşmesine dayanır. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde normalde sarı renkte olan tetrazolium tuzu metabolize edilerek parçalandıktan sonra farmazan molekülüne dönüşür. Farmazan ise ortamı turuncu renge boyar ve böylece hücrenin canlılığı mitokondrideki bu kolorimetrik reaksiyon sonrası meydana gelen renk değışikliğı ile indirekt olarak saptanmış olur.

XTT solusyonu; sodium3'-[1-(phenyl-aminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate ile N-methyl

dibenzopyrazine methyl sulfate' ın 50:1 oranında karıştırılması ile elde edildi. Her bir kuyucuğa 100 µL XTT solusyonu konduktan sonra well-plate'ler (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) nemli atmosferde inkübatöre yerleştirildi. Dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerin sitotoksosite ölçümü için her bir well-platedeki kuyucuklara 24., 48. ve 72. saatlerde 100 µL XTT konduktan sonra 4 saat sonunda her kuyucuğun absorbans değeri 450 – 490 nm referans aralığında mikro plaka okuyucuda ölçüldü.

Sitotoksosite oranı; $\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - (\text{Deneysel Absorbans} / \text{Pozitif kontrol absorbansı}) \times 100$ formülü ile hesaplandı.

3.5. Apoptoz

Organizmadaki hücrelerin fizyolojik ya da fizyolojik olmayan nedenlere bağlı olarak komşu hücrelerden ayrılıp bir takım değişikliklerden sonra yok olmasına apoptoz denir. Apoptoz sonucu iltihabi bir durum görülmez. Programlı hücre ölümü olan apoptoz genetik olarak kontrol edilir. Apoptoz gelişiminde görülen basamaklar aşağıdaki gibidir;

1. Hücre yoğunluğu artar ve buna bağlı olarak hücre zarı düzgün halini kaybeder.
2. Endoplazmik retikülum (E.R.) genişler ve hücre zarına birleşir.
3. Sitozolde organeller bir araya toplanır, fakat nekrozdaki gibi şişmez ve normal yapılarını korurlar.
4. Mikrovilluslar kaybolur, hücreler arası desmozom bağlantıları kopar ve komşu hücreler birbirinden ayrılır.
5. Nükleus küçülür, nüklear kromatin yoğunlaşır. Bunun sonucunda nükleus membranında kep şeklinde görüntüler oluşur ve nükleus zarı dalgalı bir hal alır. Bu arada nükleus zarı porları da kaybolur. Nükleus zarı parçalanır.

6. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar. Kalsiyum artışına bağlı olarak hücre içi endonükleaz aktivitesi artar.
7. Endonükleaz aktivitesi sonucu DNA 180–200 baz çifti veya katları şeklinde nükleozomal bölgelerden kırılarak DNA kırıkları oluşur. Jel elektroforezinde merdiven şeklinde bant görüntüsünü alır.
8. Hücre zarında tomurcuklanma başlar ve hücre apoptotik cisimcikler halinde parçalanır. Apoptotik cisimciklerde organeller ve kromatin parçacıkları bulunur. Tomurcuklanma sırasında hücre içeriği hücre dışına sızmaz.
9. Bunu takiben, yüzey belirleyicileri yardımıyla, komşu epitelyum hücreleri ve makrofajlar tomurcuklanıp kopan apoptotik cisimcikleri fagosite ederek onların lizozomlarda sindirilmesini sağlar. O nedenle apoptoz sonucu enflamasyon görülmez.

Apoptotik yoldaki başlıca faktörler şunlardır:

Ölüm reseptörleri: Apoptoz kaspaz aktivasyonu ile ilişkili bir takım farklı hücre yüzey reseptörlerinin uyarılması sonucu gelişir. Örneğin CD95 (APO–1 Fas) reseptör ligand sistemi periferel lenfoid yapının homeostazı ve CTL tarafından yönetilen hedef hücre öldürülmesi gibi patofizyolojik ve fizyolojik süreçlerde rol alır. Fas reseptörü ligand veya agonist antikorla uyarıldığında kaspaz bağımlı programlanmış hücre ölümüne yol açan bir sinyal ileti kaskadını başlatır.

Membran değişiklikleri: Apoptozun erken evrelerinde hücre yüzeyinde ve plazma membranında bir takım değişiklikler olur. Bunlardan biri fosfatidilserinin (PS) plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştirmesidir. Bunun sonucunda PS hücre yüzeyinin dış kısmında ortaya çıkar.

Proteaz kaskadı: Bir intraselüler sistein proteaz ailesi olan kaspazların (CysteinyI-aspartate-specific proteinases) aktivasyonuna neden olan sinyaller apoptozun çeşitli uyarılar sonucunda başlaması ve sonlandırılmasında kritik

bir rol oynarlar. En iyi bilinen kaspazlardan birisi interleukin-1 aktivasyonundan sorumlu bir sistein proteaz olan kaspaz-1 veya ICE'dir (Interleukin-1-Converting Enzyme).

Mitokondrial değişiklikler: Apoptoz sırasında mitokondrial geçirgenlik değişir ve apoptoza spesifik proteazlar açığa çıkar. Spesifik olarak dış mitokondrial zarın devamsızlığı sitokrom C'nin sitozolde yeniden dağılımı ve iç mitokondrial zarın depolarizasyonuna yol açar. Sitokrom C (Apaf-2) 'nin açığa çıkması Apaf-1'e bağlanarak ve buna bağlı olarak Apaf-3 (kaspaz 9)'ü aktive ederek kaspaz aktivasyonunu uyarır. AIF (apoptosis inducing factor), sitoplazmaya salındığında proteolitik etkiye sahiptir ve apoptozu kendi başına indükleyebilir.

DNA fragmentasyonu: Apoptozun en önemli biyokimyasal göstergesi genomik DNA'nın fragmentasyonudur. Bu fragmentasyonun endojen kalsiyum ve magnezyum bağımlı nükleazın aktivasyonu sonucu geliştiği gösterilmiştir. Bu enzim DNA'yı nükleozomal birimler arasından kırarak mono ve oligonükleozomal fragmanların oluşumuna yol açar. Buna karşılık nükleozomların DNA'sı çekirdek histonlarla (H2A, H2B, H3 ve H4) sıkı sıkıya bağlıdır ve endonükleazın etkisinden korunur. Ortaya çıkan DNA fragmanları 180 bp alt birimler oluşturur ve agaroz jelde merdiven şeklinde bant görüntüsü alınır (DNA ladder). Apoptotik hücrelerin sitoplazmalarında mono ve oligonükleozomların artıyor olması DNA parçalanmasının plazma membranının yıkımından birkaç saat önce başlamasına bağlıdır.

3.5.1. Apoptozun Değerlendirilmesi

3.5.1.1. Apoptozisin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

İlaçlarla tek tek ve kombine olarak muamele edilen hücrelerden ve ilaç eklenmeyen kontrol hücrelerinden elde edilen hücre lizatları, kitin (Cell Death Detection ELISA kiti) ihtiva ettiği streptavidin kaplı plakalara eklendi. Histon proteinleri ve DNA fragmentlerine karşı (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz) antikorları içeren reaktiften 80 µl eklenen plaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında anti-histon antikoru bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunokompleks streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır. Anti-DNA-

Peroksidaz antikoru ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanmaktadır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasından sonra, nükleozomların miktarının kantitatif olarak belirlenmesi immunokomplekslere tutunmuş olan peroksidaz'ların ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda çok modlu plaka okuyucuda ölçüldü. Kitin ihtiva ettiği ve %100 apoptotik hücreler, hücre lizatlarında meydana gelen histon ve DNA fragmentleri miktarındaki artış, apoptozis miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

3.5.1.2. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 21 yazılım kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Sharpio-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Gruplar arasındaki fark tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. p değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olarak şeklinde değerlendirildi. Grafikler GraphPad Prism 8 programı ile çizdirildi. İki ayrı molekülün değişik konsantrasyonlardaki kombine sitotoksik etkilerinin derecesini belirlemede birkaç metod kullanılmaktadır; Bu metotlardan Isobologram, Nonlinear Mixture modeli ve Kombinasyon İndeksi (CI) yaygın olarak kullanılmaktadır. CI analizi, iki ayrı molekülün değişik konsantrasyonlarda kombine kullanıldığında meydana gelen sitotoksik etkinin sinerjistik, additif veya antagonistik olup olmadığı CalCusyn bilgisayar programı ile hesaplanarak saptanır.

CalCusyn bilgisayar programı ortak mekanizma veya ortak hedefi olan moleküllerin farklı mekanizma veya farklı hedeflere yönelen kombinasyonlarının sinerjistik, additif veya antagonistik etkilerini otomatik olarak hesaplamak ve grafik ile göstermek amacıyla geliştirilmiştir. Bu programda kullanılan kombinasyon indeksi (CI)'nin aldığı değer 0,1'e yaklaştıkça sinerjistik etki artar; 1,1'e doğru yaklaştıkça kombine sitotoksik etki azalır ve additif etki anlamına gelir. CI değerinin 1,1 ile 3,3 arasında olması antagonist etkiyi gösterir (49-50-51).

Tablo 5. CalCusyn bilgisayar programına göre iki molekülün kombine sitotoksik sinerjistik-aditif-antagonistik etkilerini değerlendirmek için dikkate alınacak CI değerleri.

CI (Kombinasyon İndeksi)	Kombine sitotoksik etki
0,1<	Çok kuvvetli sinerjizm
0,1 – 0,3	Kuvvetli
0,3 - 0,7	Sinerjizm
0,7 – 0,9	Hafif sinerjizm
0,9 – 1,1	Additif
1,1 – 1,45	Hafif antagonizm

4. BULGULAR

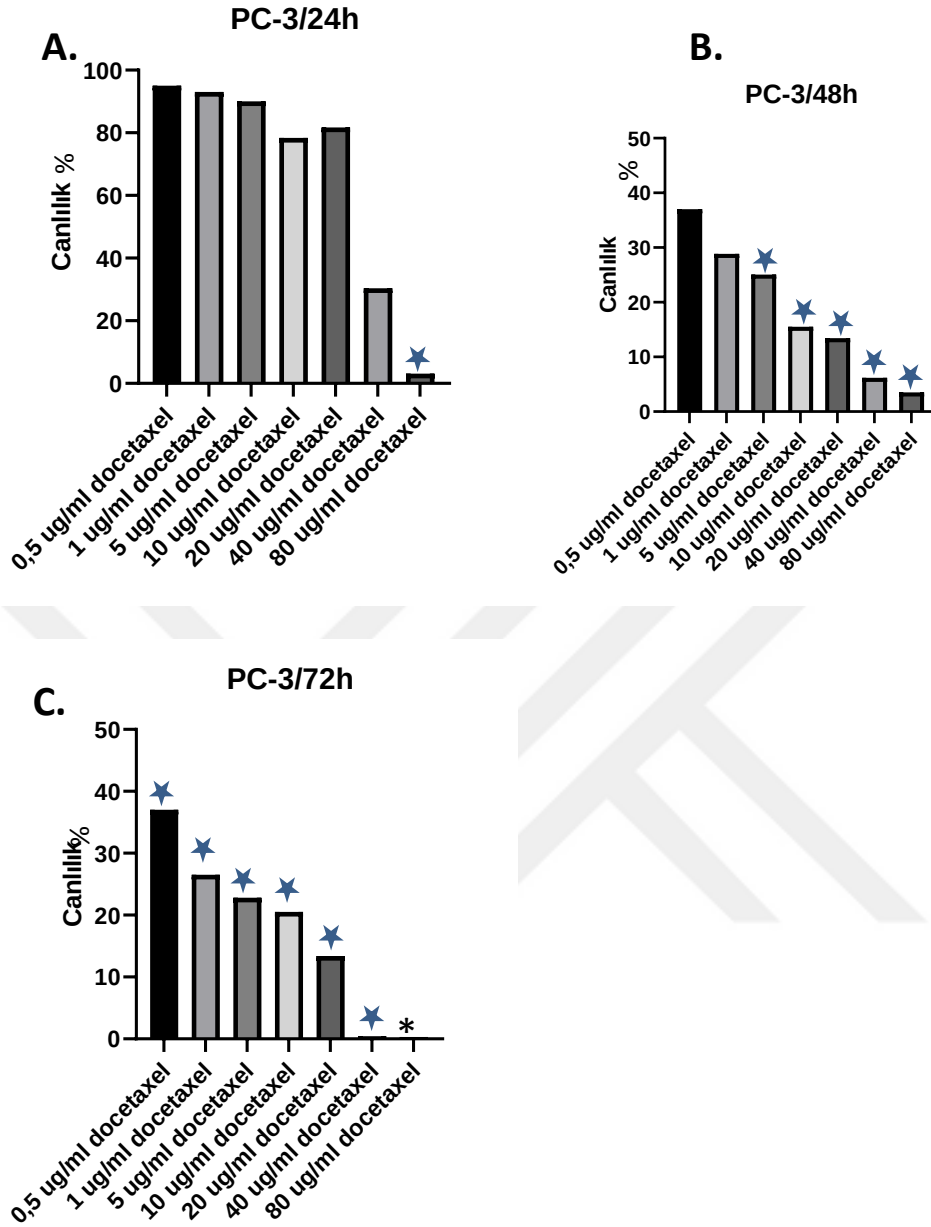
4.1. PC-3, DU-145 Hücre Hatlarında Dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktının Zamana Bağımlı Anti Tümoral Etkilerinin Gösterilmesi ve IC₅₀ Değerinin Saptanması ve IC₅₀ Konsantrasyonunun Altındaki Dozlarda İlaç Kombinasyonlarının Kombinasyon İndeksleri Hesaplanması

Acorus calamus bitki ekstraktı 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 µg/l'lık konsantrasyonları ve dosetaksel 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80 µg/l'lık konsantrasyonları 24.saat, 48.saat ve 72.saatlerdeki sitotoksitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenebilmesi için altı ayrı deney oluşturacak şekilde deney planlaması yapıldı. Her deney grubunda sadece besiyeri ve besiyeri ile birlikte hücre bulunacak şekilde iki adet pozitif kontrol sağlandı. Pozitif kontroller ve farklı ilaç konsantrasyonlarının bulunduğu her deney üç defa tekrarlandı. 24, 48. ve 72. saatlerde XTT metodu ile optik dansite ölçümlerine dayanılarak hücre canlılıkları belirlendi. Şekil 2A-C ve Şekil 4A-C 'da dosetakselin PC-3, DU-145 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi hem artan dozlarda hem de inkübasyon süresine göre gösterilmiştir. *Acorus calamus* ekstrakt 24, 48. ve 72. saatlerdeki artan dozlardaki % canlılık değerleri ise Şekil 3A-C, Şekil 5A-C'de gösterilmiştir. PC-3 hücre hattında

dosetaksel için IC₅₀ degeri: 0,04 µg/ml, *Acorus calamus* bitki ekstraktı için IC₅₀ değeri: 396,7 µg/ml olarak saptanmıştır. DU-145 hücre hattında ise dosetaksel için IC₅₀ değeri: 0,005 µg/ml, *Acorus calamus* bitki ekstraktı için IC₅₀ değeri: 168,6 µg/ml olarak görülmüştür.

IC₅₀ konsantrasyonunun altındaki dozlarda ilaç kombinasyonlarının kombinasyon indeksleri hesaplandı. PC-3 hücre hattında 100 µg/ml ekstrakt ve 1 µg/ml dosetaksel altında, DU-145 hücre hattında ise 100 µg/ml ekstrakt ve 0,5 µg/ml dosetaksel altında sinerjizm saptandı.

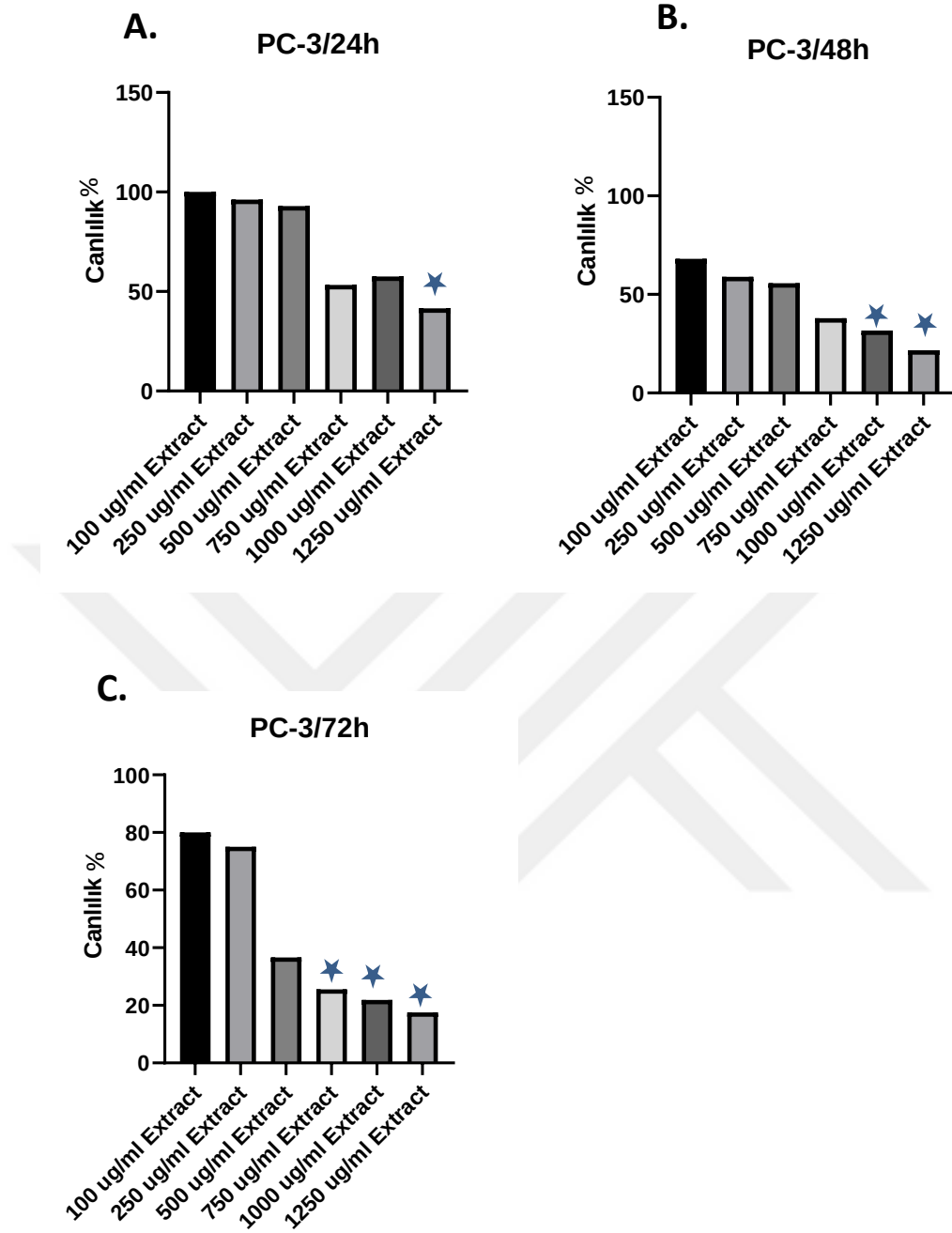
Kontrol grubuna göre anlamlı olanlar (P<0.05 olanlar) grafikte yıldızla işaretlendi.



Şekil 2 A-C: 24-48-72 saatte PC-3 hücre hattında dosetakselin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite A: 24 saatte B:48 saatte C: 72 saatte

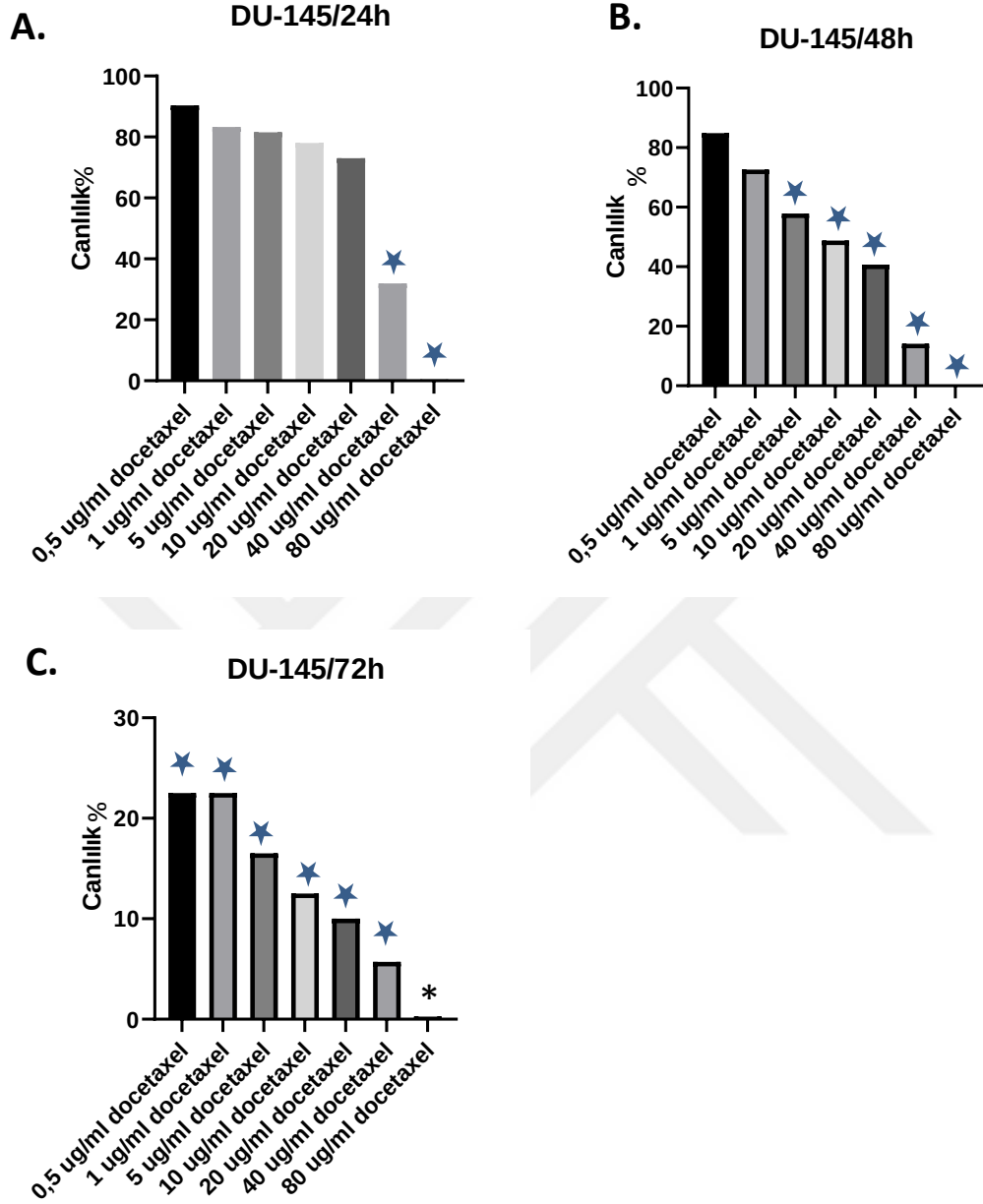
★ : $p<0.005$, * : $p<0.001$

PC-3 hücre hattında dosetaksel'in 24. saatte 80 µg/ml dozda, 48. saatte 5 µg/ml den itibaren, 72. Saatte ise tüm dozlarda sitotoksositeyi kontrole göre istatistiksel olarak doz ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde artırdığı saptandı. En fazla ise $p<0.001$ ile 72. saatte 80 µg/ml dozda artırdığı saptandı.



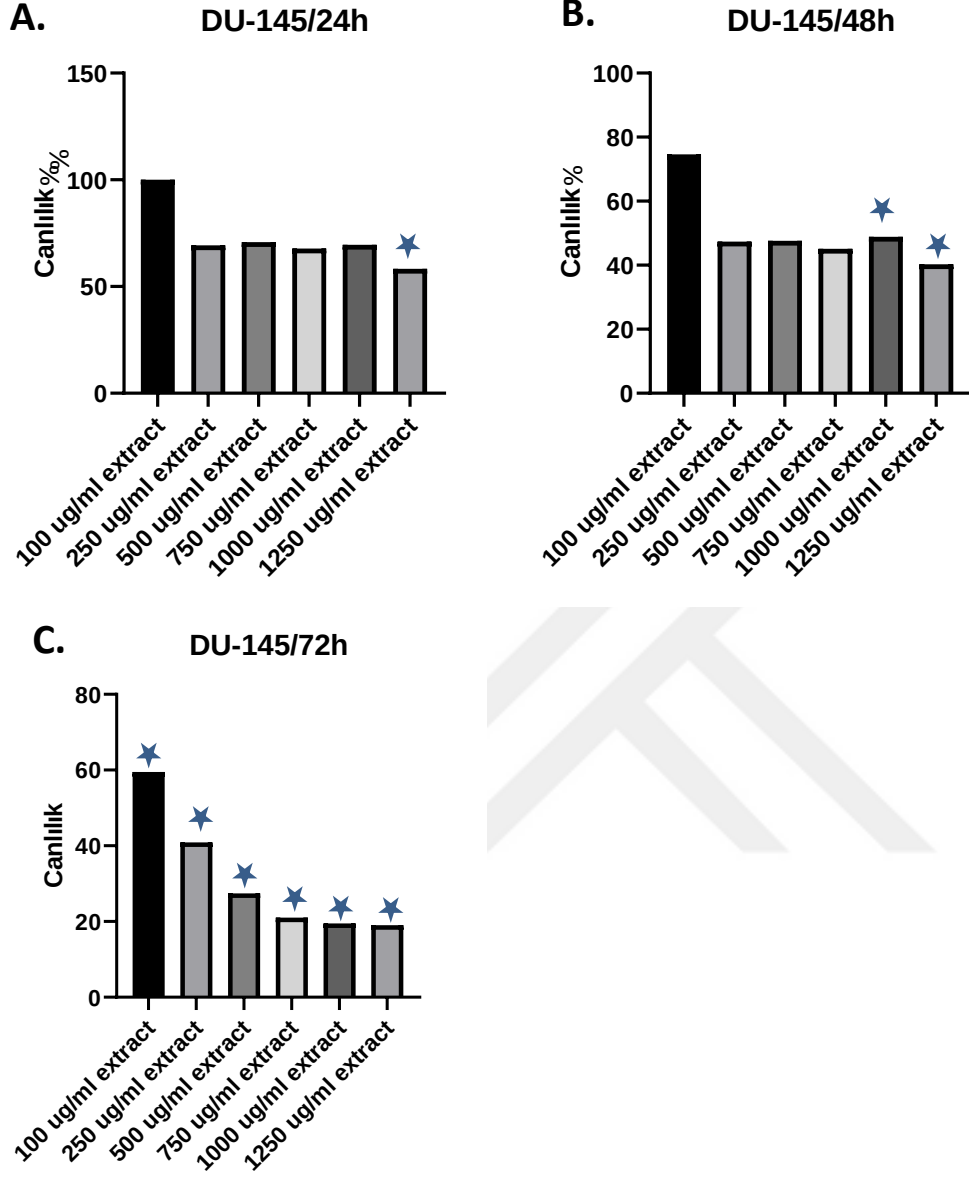
Şekil 3 A-C: 24-48-72. saatte PC-3 hücre hattında *Acorus calamus* bitki ekstraktının değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte

PC-3 hücre hattında *Acorus calamus* bitki ekstraktın 24. saatte 1250 µg/ml dozda, 48. saatte 1000 µg/ml den itibaren, 72. Saatte ise 750 µg/ml den itibaren sitotoksositeyi kontrole göre istatistiksel olarak doz ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde artırdığı saptandı.



Şekil 4 A-C: 24-48-72. saatte DU-145 hücre hattında dosetakselin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite A: 24. saatte B: 48. satte C:72. saatte

DU-145 hücre hattında dosetaksel'in 24. saatte 40 µg/ml dozdan itibaren, 48. saatte 5 µg/ml den itibaren, 72. saatte ise tüm dozlarda sitotoksositeyi kontrole göre istatistiksel olarak doz ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde artırdığı saptandı. En fazla sitotoksositeyi $p<0.001$ ile 72. saatte 80 µg/ml dozda artırdığı görüldü.



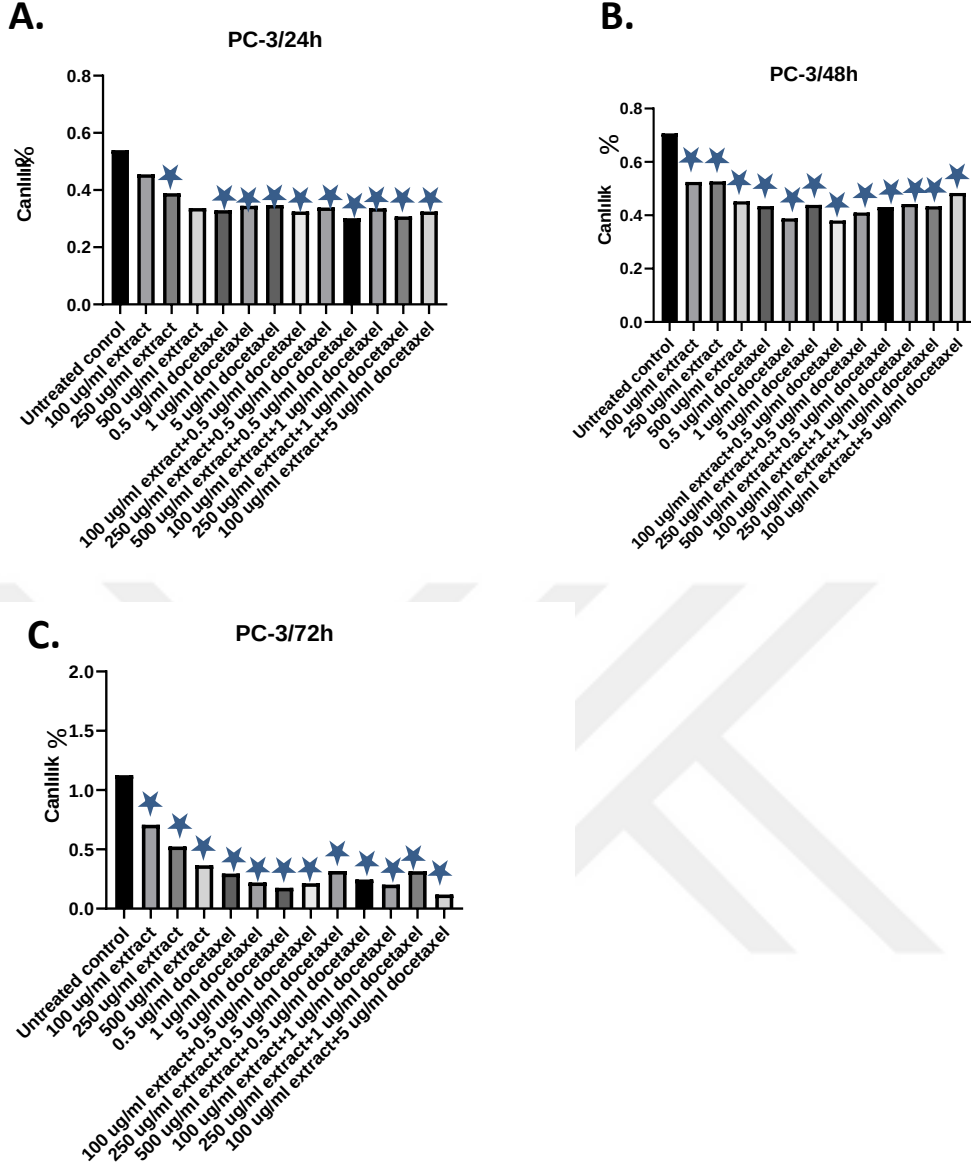
Şekil 5 A-C: 24-48-72. saatte DU-145 hücre hattında *Acorus calamus* bitki ekstraktının değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte

DU-145 hücre hattında *Acorus calamus* ekstrakt ın 24. saatte 1250 µg/ml dozda, 48. saatte 1000 µg/ml den itibaren, 72. Saatte ise tüm dozlarda sitotoksisiteyi kontrole göre istatistiksel olarak doz ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde artırdığı saptandı.

4.2. *Acorus Calamus* Bitki Ekstraktı ve Dosetaksel Kombinasyonlarının Sitotoksosite Analizi

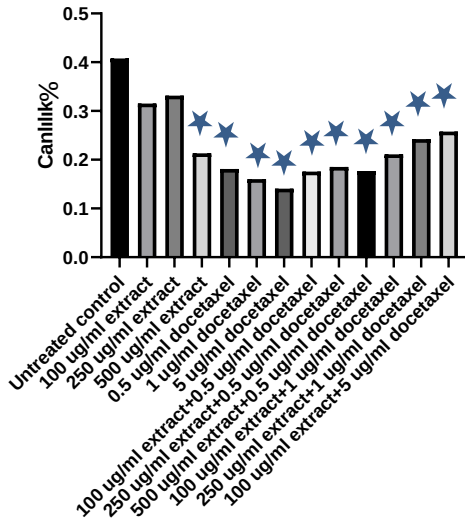
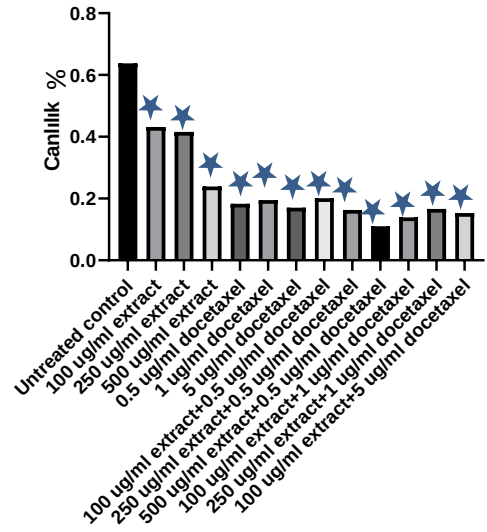
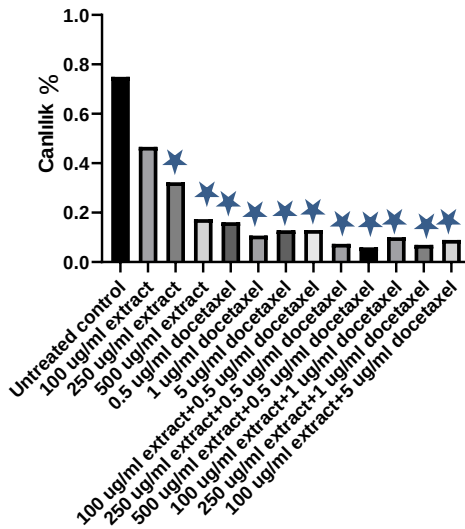
PC-3, DU-145 hücre hatlarında *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetaksel'in değişen konsantrasyonlarda doza ve zamana bağlı olarak artan sitotoksosite verileri elde edildikten sonra, bu ilaçların klinik kullanıma uygun ve IC₅₀ değerlerinin altındaki konsantrasyonlar seçilerek kombinasyonlar oluşturuldu ve 72. saatteki sitotoksosite oranları saptandı (şekil 6-7A-C). Kontrol grubuna göre anlamlı olanlar (P<0.05 olanlar) grafikte yıldızla işaretlendi.





Şekil 6 A-C: PC-3 hücre hattında 24-48-72. saatte dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksisite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte

Kombinasyon deneyinde PC-3 hücre hattında 24. saatte 250 µg/ml ekstrakt ve 0,5 µg/ml dosetaksel den itibaren sitotoksisitenin istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı; 48. Ve 72. saatte tüm dozlarda sitotoksisitenin istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı saptandı.

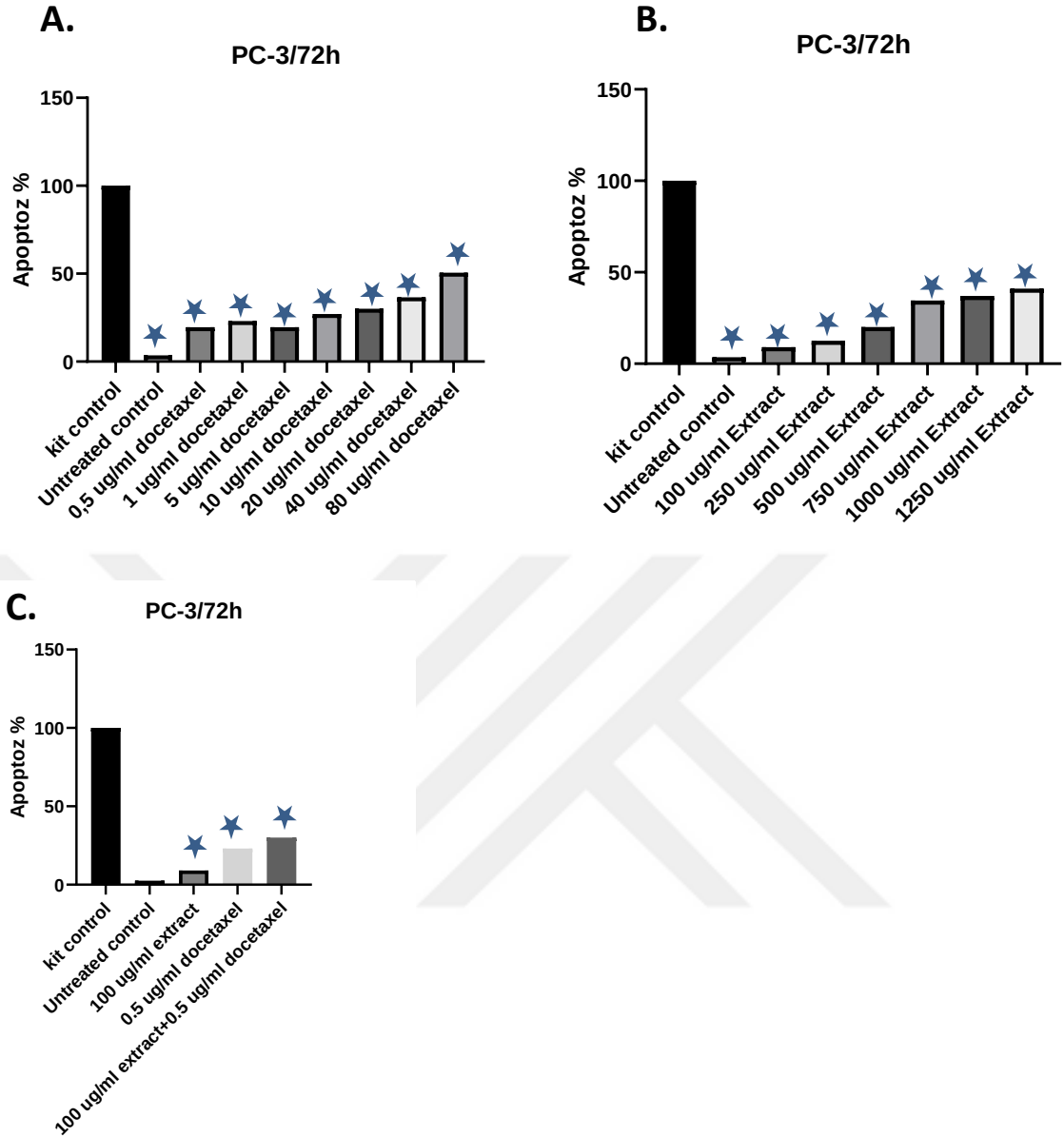
A.**DU-145/24h****B.****DU-145/48h****C.****DU-145/72h**

Şekil 7 A-C: DU-145 hücre hattında 24-48-72. saatte dosetaksel ve *Acorus calamus* ekstrakt kombinasyonunun değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite A: 24. saatte B: 48. saatte C:72. saatte

DU-145 hücre hattında 24. Saatte 500 µg/ml den itibaren sitotoksitenin istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı; 48. ve 72. saatte tüm dozlarda sitotoksiteni istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı saptandı.

4.3. Dosetaksel ve *Acorus calamus* ekstraktı PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında sitotoksosite gösteren tekli uygulamalarının ve kombinasyonlarının apoptotik etkileri

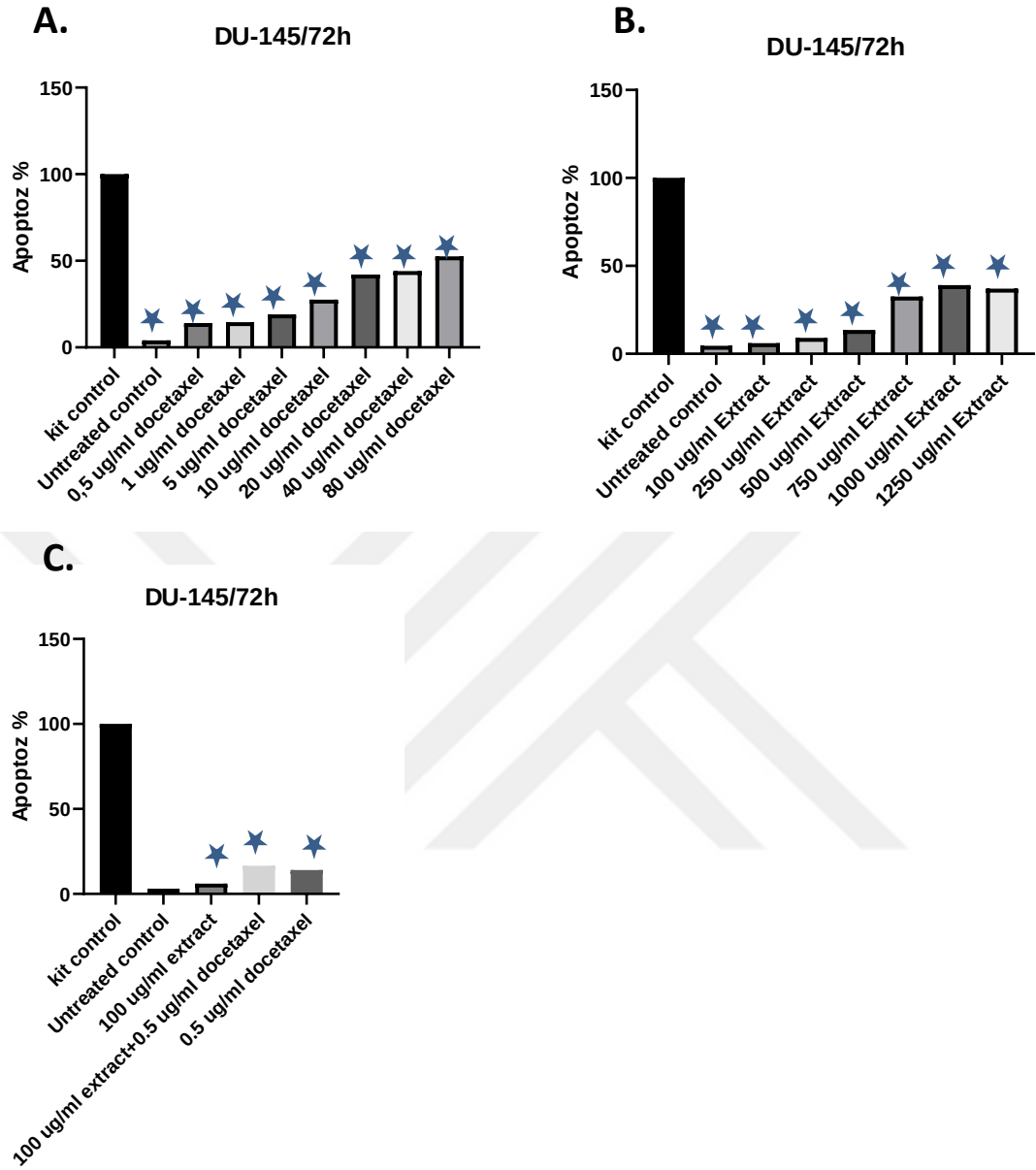
XTT ile yapılan sitotoksosite deneyleri ile dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktının sinerjik sitotoksitesinin gösterilmesinden sonra tek başlarına ve kombinasyonların prostat kanser hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkilerinin araştırılması amacıyla Cell Death Detection ELISA yöntemiyle apoptoz deneyi yapıldı. Dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı tekli ve kombinasyonlarının PC-3, DU-145 hücre hatlarında apoptotik etkilerini araştırmak için 72. saatte DNA fragmentasyon yüzdeleri ölçüldü. Sonuçlar şekil 8-9 da gösterildi. Grafiklerde dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı tekli deneyleri için One-way ANOVA ardından Dunnett testi kombinasyonlar için One-way ANOVA ardından Tukey testi uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlı olanlar ($P < 0.05$ olanlar) grafikte yıldızla işaretlendi.



Şekil 8 A-C: PC-3 hücre hatlarında *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetakselin tekli ve sinerjik kombinasyonlarının hücre hatlarında 72. saatteki apoptotik etkileri A: Dosetaksel B: *Acorus calamus* ekstrakt C: Kombinasyon

PC-3 hücre hattında *Acorus calamus* bitki ekstrakt ve dosetaksel in tekli çalışmasında tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak apoptozun anlamlı derece artırdığı;

Kombinasyonda deneyinde ise 100 µg/ml ekstrakt, 0,5 µg/ml dosetaksel ve kombinasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede apoptozun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 9 A-C: DU-145 hücre hatlarında *Acorus calamus* ekstrakt ve dosetaksel tekli ve sinerjik kombinasyonlarının hücre hatlarında 72. saatteki apoptotik etkileri A: Dosetaksel B: *Acorus calamus* ekstrakt C: Kombinasyon

DU-145 hücre hattında *Acorus calamus* bitki ekstrakt ve dosetaksel in tekli çalışmasında tüm dozlarda istatistiksel olarak apoptozun anlamlı derece artırdığı;

Kombinasyonda deneyinde ise 100 µg/ml ekstrakt, 0,5 µg/ml dosetaksel ve kombinasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede apoptozun arttığı gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetakselin prostat kanseri hücre hatları olan PC-3, DU-145 hücre hatlarındaki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetaksel kombinasyonunun prostat kanseri hücre hatlarındaki antitümoral etkisi ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda Dosetaksel uygulamasının, hücre hatları üzerindeki sitotoksitesi saptandıktan sonra sitotoksitenin apoptoz aracılığı ile olduğunu gösterilmesi için hücrelere artan dozlarda dosetaksel uygulanıp 72 saat sonra hücrelerdeki DNA fragmentasyon yüzde oranları incelendi. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptotik etkiyi artırdığı saptandı (şekil 8-9A-C). Bu veriler, dosetakselin monoterapi ile, agresif yapıdaki prostat kanseri hücre hatlarında artan dozlarda doz ile doğru orantılı olarak apoptoz aracılıklı sitotoksisteye yol açtığını göstermektedir.

Dosetaksel kastrasyon duyarlı ve dirençli metastatik prostat kanserinde hala etkili bir tedavi yöntemidir. Dosetakselin hem prelinik hem de klinik çalışma sonuçları bunu desteklemektedir. Docetakselin prednol ile kombine yapılan metastatik hormon dirençli prostat kanserlerde randomize TAX 327 faz 3 klinik çalışmasında görülmüş ki; prednolun dosetaksel ile kombinasyonu, mitoksantron ve prednol kombinasyonuna göre serum PSA düzeylerini düşürdüğü, sağkalımı artırdığı, ağrıyı azalttığı, tedaviye yanıtı ve progresyon süresini uzattığı saptandı. (52) CHAARTED çalışmasında yeni tanı aldığında metastatik olan yüksek volümlü hastalarda androjen baskılanmasına ilave edilen 6 kür dosetaksel tedavisi ile sağkalımda ileri derecede anlamlı artış gösterilmiştir (28). Bunu takip ederek STAMPEDE çalışması, metastatik tanı konan, takipte metastaz gelişen hastalarda, risk grubu ayırd etmeksizin, kemoterapinin sağkalıma katkısı olduğunu göstermiştir (29). 2015 ESMO kılavuzu, metastatik hormon duyarlı prostat kanseri tedavisinde, ADT ile birlikte dosetaksel uygulanmasını, kemoterapi alabilecek kadar performansı iyi her hastada önermektedir (30).

Bunula birlikte dosetakselin diğ er ilaçlarla kombinasyonunun klinik olarak fayda verdiği bugüne kadar gösterilememiştir. Bu nedenle dosetakselin kombine kullanıldığı bir ajan ihtiyacı bulunmaktadır. Burdaki kombinasyonun amacı sinerjik bir etki oluştururken daha düşük dozlarda ilacı kullanarak yan etkiyi azaltmaktır.

Acorus calamusun literatürde antikanser etki mekanizması halen tartışmalı ve yetersizdir. *Acorus calamus* biyolojik aktif ajanlarından olan beta asarone ile ilgili sınırlı çalışmalar mevcuttur. İnvitro olarak yapılan bir  alışma, LoVo kolon kanseri hücre hatları üzerindeki inhibitör etkileri belirlemek ve in vitro ve in vivo altta yatan mekanizmaları açıklığa kavuşturmayı amaçlamıştır. Doz-yanıt ve zamana bağlı anti-proliferasyon etkileri MTT analizi ile incelenmiş olup bulgular LoVo hücre canlılığının  -asarone' da doz ve zaman bağımlılığı gösterdiğini ortaya koymuştur. Flow sitometri kullanarak anneksin V-floresein izotiosiyanat / propidyum iyodür protokolüyle  -asaronun apoptotik etkisi gösterilmiştir. Kaspaz-9 ve kaspaz-3 kaskadlarını harekete geçirmenin yanı sıra mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak ve Bcl-2-Bax oranını düşürerek mitokondriyal / caspase yolu ile apoptozu tetiklediği görülmüştür. LoVo tümör ksenograftlarını taşıyan nude farelerde  -asaron ile tedavi edildiğinde, tümör hacimlerinin azaldığı ve eksize edilen dokunun TUNEL yöntemi ile de apoptotik değişiklikler olduğu gösterildi. Birlikte ele alındığında, bu bulgular ilk kez  -asaron' un kolon kanserinin büyümesini baskılayabileceğinin kanıtı sağladığı ve bunun sonucunda ortaya çıkan apoptozun muhtemelen mitokondri / caspase yolaklar aracılığıyla aracılık ettiği ortaya konmuştur. (38-39-40) Yapılan bir diğ r çalışmada  -asarone un lamin B1 üzerinden etki ettiği düşünülmüştür. B-asarone lamin B1' i artırdığı ve lamin B1' in de p53, p21, oct-1 ve p15 üzerinden apoptozu tetiklediği öngörülmüştür. (41)

Türkiye' de yapılan bir çalışmada *Acorus calamus* kökünün etanolik ekstraktının insan prostat kanser LNCaP hücre dizisinde hücre çoğalmasına, anjiogeneze ve apoptozise olası etkileri in vitro ortamda çalışılmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca çeşitli ekstrakt konsantrasyonlarıyla muamele edilip bu konsantrasyonlardaki ekstraktlar 24 ve 48 saatte LNCaP hücre canlılığını

kontrolle karşılaştırıldığında doza ve zamana bağlı olarak %44'lere kadar azalttığı görülmüş. Bölünmüş PARP, VEGF-A proteini ve gen ekspresyon miktarlarında 24 ve 48 saat sonra belirgin değişiklikler gözlemlenmiş. Bu çalışma *Acorus calamus* kökünün etanolik ekstraktının zaman ve doz bağımlı olarak güçlü bir anti-kanser, anti-anjiogenik ve apoptotik etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır (42). Bizim çalışmamızda *Acorus calamus* bitki ekstraktının doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkili olduğu gösterilmiştir. (şekil 3-5-6-7-8-9A-B-C)

Çalışmamızda prostat kanseri hücre hatlarındaki *Acorus calamus* bitki ekstraktı tekli ve dozetaksel ile kombine uygulamasında 72.saat DNA fragmentasyon yüzde oranlarına baktığımızda PC-3 ve DU-145 hücre hattında tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptotik etkiyi artırdığı saptandı (Şekil 8-9A-C).

Bugün için metastatik prostat kanseri tedavisinde çok fazla miktarda tedavi seçeneği bulunmamaktadır. İn vitro sinerjistik sitotoksite gösteren bu iki ajanın kombinasyonu gelecekte hormon dirençli metastatik prostat kanseri tedavisinde yan etkisi az ve etkinliği fazla olan bir tedavi seçeneği olabilir. Bunun için in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır. Geçtiğimiz on yıl içerisinde önemi giderek artan *Acorus calamus* maddesinin kanser hücrelerinde antiproliferatif etkinliği artık kanıtlanmıştır. Ancak etki mekanizmaları hala net değildir. Bizim çalışmamızda eksik yönü bu kombinasyon uygulamasının antiapoptotik etkisinin olası mekanizmaları çalışılmamış olmasıdır. *Acorus calamus* bitki ekstraktının anti-kanser etkinliğinin tam anlaşılması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetaksel kombinasyonun invitro olarak PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında antitümöral etkinliğe sahip olduğu gösterildi. Ayrıca bu çalışmada hazanbel ekstrakt ve dosetaksel kombinasyonun invitro kombine kullanıldığı ilk çalışmadır.

Bizim çalışmamızda *Acorus calamus* uygulamasının, hücre hatları üzerindeki sitotoksitesi saptandıktan sonra sitotoksitenin apoptoz aracılığı ile olduğunu gösterilmesi için hücrelere artan dozlarda *Acorus calamus* bitki ekstraktı uygulanıp 72 saat sonra hücrelerdeki DNA fragmentasyon yüzde oranları incelendi. PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptotik etkiyi artırdığı saptandı. Bu veriler, *Acorus calamusun* monoterapi ile, agresif yapıdaki prostat kanseri hücre hatlarında artan dozlarda doz ile doğru orantılı olarak apoptoz aracılıklı sitotoksiteye yol açtığını göstermektedir. Çalışmamızda dosetakselin önceki prelinik çalışmalara benzer bir şekilde tekli uygulamada prostat kanseri hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkisi gösterilmiştir. Ayrıca *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetaksel kombinasyon deneylerinde prostat kanseri hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etki gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızın eksik yönü bu kombinasyon uygulamasının apoptotik etkisinin olası mekanizmalarının çalışılmamış olmasıdır. *Acorus calamus* bitki ekstraktının anti-kanser etkinliğinin tam anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çalışmamıza göre prostat kanserinde dosetaksel ile kombine kullanılabilecek bir ajan literatüre sunulmuş olmaktadır.

7. ÖZET

Amaç: Prostat kanseri hücre hatlarında (PC-3, DU-145) dosetaksel ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Dosetaksel 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 80 µg/l'lık konsantrasyonları ve *Acorus calamus* bitki ekstraktı 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 µg/l'lık konsantrasyonları 24, 48 ve 72. saatlerde sitotoksitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenebilmesi için altı ayrı deney oluşturacak şekilde deney planlaması yapıldı. XTT ile yapılan sitotoksite deneyleri ile *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetakselin sinerjik sitotoksitesinin gösterilmesinden sonra tek başlarına ve kombinasyonların prostat kanser hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkilerinin araştırılması amacıyla Cell Death Detection ELISA yöntemiyle apoptoz deneyi yapıldı. *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetaksel tekli ve kombinasyonlarının PC-3, DU-145 hücre hatlarında apoptotik etkilerini araştırmak için 72. saatte DNA fragmentasyon yüzdeleri ölçüldü.

Bulgular: Çalışmamızda prostat kanseri hücre hatlarındaki *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetakselin tekli ve kombine uygulamalarında 72.saat DNA fragmentasyon yüzde oranlarına baktığımızda PC-3 ve DU-145 hücre hattında tüm dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde apoptotik etkiyi artırdığı saptandı.

Sonuçlar: *Acorus calamus* bitki ekstraktı ve dosetaksel kombinasyonunun invitro olarak PC-3, DU-145 prostat kanseri hücre hatlarında antitümöral etkinliğinin apoptozise bağlı olduğu gösterildi. Olası apoptozis mekanizmalarının araştırılarak çalışmanın genişletilmesi önerilir.

Anahtar Kelimeler: *Acorus calamus*, dosetaksel, sitotoksite, apoptoz

8. SUMMARY

Aim: We aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effect of docetaxel and *Acorus calamus* plant extract combination in prostate cancer cell lines. (PC-3, DU-145)

Material and Method: Docetaxel 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml concentrations and *Acorus calamus* plant extract 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 µg/ml concentrations 24, 48, 72. hours in order to determine the cytotoxicity by spectrophotometric method, test planning was performed in six different tests. Cytotoxicity tests with XTT showed that synergistic cytotoxicity of *Acorus calamus* plant extract and docetaxel apoptosis test was performed by Cell Death Detection ELISA method to investigate the apoptosis inducing effects of the single and combinations on prostate cancer cell lines. Percentage of DNA fragmentation was measured at 72. h to investigate the apoptotic effects of *Acorus calamus* plant extract and docetaxel singles and combinations in PC-3, DU-145 cell lines.

Results: In our study, when we looked at the percentage of DNA fragmentation in single and combined applications of *Acorus calamus* plant extract and docetaxel in prostate cancer cell lines, it was found that the PC-3 and DU-145 cell line increased apoptotic effect significantly at all doses compared to the control group.

Conclusion: The antitumoral activity of *Acorus calamus* plant extract and docetaxel combination in vitro PC-3, DU-145 prostate cancer cell lines was shown to be due to apoptosis. Investigating possible mechanisms of apoptosis it is recommended to expand the study.

Key words: *Acorus calamus*, docetaxel, cytotoxicity, apoptosis

9. KAYNAKLAR

1. <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero>
2. <https://www.saglik.gov.tr/Eklenti/8635,kanser-istatistikleridocx>
3. Incidence and Risk Factors for Prostate Cancer, b. yilmaz, d. sarikaya
4. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, ve ark. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med 2004; 351: 1502–12.
5. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>
6. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet 2003; 361: 859–64
7. Platz EA, Rimm EB, Willett WC ve ark. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 2009–17.
8. Krupski TL, Kwan L, Afifi AA, Litwin MS. Geographic and socioeconomic variation in the treatment of prostate cancer. J Clin Oncol 2005; 23: 7881–8.
9. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88: 4043-54.
10. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, ve ark. Body mass index and risk of prostate cancer in U.S. health professionals. J Natl Cancer Inst. 2003; 95: 1240-4.
11. Schuurman AG, Goldbohm RA, Dorant E, ve ark. Anthropometry in relation to prostate cancer risk in the Netherlands Cohort Study. Am J Epidemiol. 2000; 151: 541-9.
12. Kane CJ, Bassett WW, Sadetsky N, ve ark. Obesity and prostate cancer clinical risk factors at presentation: data from CaPSURE. J Urol. 2005; 173: 732-6.
13. Freedland SJ, Aronson WJ, Kane CJ, ve ark. Impact of Obesity on Biochemical Control After Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer: A Report by the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital Database Study Group. J Clin Oncol. 2004; 22: 446-53.

14. Rodriguez C, Patel AV, Mondul AM Jacobs EJ, ve ark. Diabetes and risk of prostate cancer in a prospective cohort of US men. *Am J Epidemiol.* 2005; 161: 147-52.
15. Polychronakos C, Janthly U, Lehoux JG, ve ark. Mitogenic effects of insulin and insulin-like growth factors on PA-III rat prostate adenocarcinoma cells: characterization of the receptors involved. *Prostate* 1991; 19: 313-21.
16. Lehrer S, Diamond EJ, Stagger S, ve ark. Increased serum insulin associated with increased risk of prostate cancer recurrence. *Prostate.* 2002; 50: 1-3.
17. Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, ve ark. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 1995; 141: 732–40.
18. Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: Current status. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 414–28.
19. Thompson, IM, Goodman, PJ, Tangen, CM, ve ark. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 215–24.
20. Jacobs EJ, Rodriguez C, Mondul AM, ve ark. A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Nati Cancer Inst* 2005; 97: 975–80.
21. Narayan, P. : Neoplasm of the Prostate Gland. *Smith's Urology*, Tanagho, EA. Mc Aninch, JW. , 14. Edition, Connecticut-San Mateo, Lange, : 392-433 , 1995.
22. di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update on recent developments. *Ann Oncol* 2001; 12 (2): 135–40.
23. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111: 58–64.
24. Gonzalgo ML, Bastian PJ, Mangold LA, ve ark. Relationship between primary Gleason pattern on needle biopsy and clinicopathologic outcomes among men with Gleason score 7 adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 2006; 67: 15–9.
25. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14(1):19–30

26. Albertsen PC, Hanley JA, Fine J, et al. 20-year outcomes following conservative management of clinical localized prostate cancer. *JAMA* 2005; 293: 2095–101.
27. Mottet N, Bellmunt J, Briers M, et al. European Association of Urology. Guidelines on Prostate Cancer. Update March 2015. <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>
28. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998 Sep 16;280(11):969-74.
29. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, Wong YN, Hahn N, Kohli M, Cooney MM, Dreicer R, Vogelzang NJ, Picus J, Shevrin D, Hussain M, Garcia JA, DiPaola RS. Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med*. 2015 Aug 20;373(8):737-46.
30. James ND. Docetaxel and/or zoledronic acid for hormone-naïve prostate cancer: First overall survival results from STAMPEDE (NCT00268476). 2015 ASCO Annual Meeting *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 5001)
31. Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A; ESMO Guidelines Committee. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26 (suppl 5):v69-v77
32. Hoyle, Alex P., Adnan Ali, Nicholas D. James, Adrian Cook, Christopher C. Parker, Johann S. de Bono, Gerhardt Attard, Simon Chowdhury, William R. Cross, David P. Dearnaley, Christopher D. Brawley, Clare Gilson, Fiona Ingleby, Silke Gillessen, Daniel M. Aebbersold, Rob J. Jones, David Matheson, Robin Millman, Malcolm D. Mason, Alastair W. S. Ritchie, Martin Russell, Hassan Douis, Mahesh K. B. Parmar, Matthew R. Sydes, and Noel W. Clarke. 2019. "Abiraterone in 'High-' and 'Low-Risk' Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer." *European Urology*.
33. https://kanser.org/saglik/upload/prostat_kanseri/binder1.pdf
34. Cookson MS, Lowrance WT, Murad MH, Kibel AS. Castration-resistant prostate cancer: AUA guideline amendment. *J Urol*. 2015 Feb;193(2):491-9.

35. Lavelle F, Bissery MC, Combeau C, Riou JF, Vrignaud P, Andre S. Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere). *Semin Oncol* 1995; 22: 3–16.
36. Boudny V, Nakano S. Src tyrosine kinase augments taxotere – induced apoptosis through enhanced expression and phosphorylation of Bcl-2. *Br J Cancer* 2002; 86(3): 463-69.
37. 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(15): 1513–20.
38. Ghosh, Modhumita. 2006. “Antifungal Properties of Haem Peroxidase from *Acorus Calamus*.” *Annals of Botany*.
39. Nath, Purobi and Arun K. Yadav. 2016. “Anthelmintic Activity of a Standardized Extract from the Rhizomes of *Acorus Calamus* Linn. (Acoraceae) against Experimentally Induced Cestodiasis in Rats.” *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*.
40. https://www.researchgate.net/publication/335826737_bb82_Hazanbel/link/5d7de4ac299bf1d5a97f1e0f/download
41. Liu L, Wang J, Shi L, Zhang W, Du X, Wang Z, Zhang Y. β -Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression. *Phytomedicine*. 2013 Apr 15;20(6):512-20. doi: 10.1016/j.phymed.2012.12.008. Epub 2013 Jan 26.
42. Zou X, Liu SL, Zhou JY, Wu J, Ling BF, Wang RP. Beta-asarone induces LoVo colon cancer cell apoptosis by up-regulation of caspases through a mitochondrial pathway in vitro and in vivo. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):5291-8.
43. Liu, Linna, Jingjie Wang, Lei Shi, Wenjuan Zhang, Xiaoyan Du, Zhipeng Wang, and Yan Zhang. 2013. “ β -Asarone Induces Senescence in Colorectal Cancer Cells by Inducing Lamin B1 Expression.” *Phytomedicine*.
- Shenvi S, Diwakar L, Reddy GC. Nitro Derivatives of Naturally Occurring β -Asarone and Their Anticancer Activity. *Int J Med Chem*. 2014;2014:835485. doi: 10.1155/2014/835485. Epub 2014 Oct 1.
44. Koca, Halit Buğra, Tülay Köken, Mete Özkurt, Gökhan Kuş, Selda Kabadere, Nilüfer Erkasap, and Ömer Çolak. 2018. “Effects of *Acorus Calamus* Plant

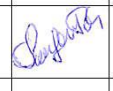
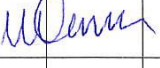
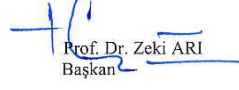
Extract on Prostate Cancer Cell Culture.” *Anatolian Journal of Botany* 2(1):46–51.

45. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979 Jul;17(1):16-23.
46. Chakraborty, J. and G. A. Von Stein. 1986. “Pleomorphism of Human Prostatic Cancer Cells (DU 145) in Culture-The Role of Cytoskeleton.” *Experimental and Molecular Pathology*
47. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 1978 Mar 15;21(3):274-81.
48. Chou, T.C. and Hayball, M.P. 1996. *CalCusyn Windows Software for Dose Effect Analysis*, Biosoft, Cambridge, MA.
49. Chou TC, Rideout D, Chou J, and Bertino JR. Relationships between inhibition constants and fractional inhibitions in enzym catalysed reactions with different number of reactants, different reaction mechanisms ,and different types of mechanisms of inhibition. *Mol. Pharmacol.* 1974; 10; 235-47.
50. Chou TC and Talalay P. Quantitative analysis of dose effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 1984; 22: 27–55.
51. Tannock, Ian F., Ronald De Wit, William R. Berry, Jozsef Horti, Anna Pluzanska, Kim N. Chi, Stephane Oudard, Christine Théodore, Nicholas D. James, Ingela Turesson, Mark A. Rosenthal, and Mario A. Eisenberger. 2004. “Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer.” *New England Journal of Medicine*.



10. EKLER

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	20 / 12 / 2017 / 20.478.486 -						
ARAŞTIRMANIN ADI	Prostat Kanseri Hücre Hatlarında (PC-3) Dosetaksel ve Acarus Calamus Bitki Ekstraktı Kombinasyonunun Additif/Sinerjistik Antitümöral Etkilerinin Araştırılması						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Ahmet DİRİCAN - Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi-İç Hastalıkları AD						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Arş. Gör. Dr. Hamza ÇATUK						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☒		YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ ☐		AKADEMİK AMAÇLI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	19 / 12 / 2017 / Tarih ve 59004 sayılı; araştırma dosyası						
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir						
Ünvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Ünvanı /Adı /Soyadı		Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Zeki ARI Tıbbi Biyokimya AD		☐	☐	Doç. Dr. Serdar TOK Spor Bilimleri Fakültesi		☐	☐
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD		☐	☐	Doç. Dr. Ayşen TÜREDİ YILDIRIM Çocuk Hematolojisi BD	-----	☐	☒
Prof. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ İç Hastalıkları Hemşireliği AD	-----	☐	☒	Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		☐	☐
Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		☐	☐	Mukadder YILMAZER Avukat		☐	☐
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD		☐	☐	İhsan AVCI Sivil Üye	-----	☐	☒
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme – Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir.</u> Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.  Prof. Dr. Zeki ARI Başkan							