

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUTAEKARPİNİN METASTATİK PROSTAT
KANSERİ HÜCRELERİNDE POTANSİYEL
TERAPÖTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Abdulkadir ŞEKEROĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

Tez Danışmanı : Dr. Öğr.Üyesi Erdem ÇOKLUK

Ocak 2021

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RUTAEKARPİNİN METASTATİK PROSTAT KANSERİ
HÜCRELERİNDE POTANSİYEL TERAPÖTİK
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet Abdulkadir ŞEKEROĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

“Bu tez 18/01/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Oybirliği ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ	KANAATİ	İMZA
Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN		
Doç. Dr. Hayrullah YAZAR		
Dr. Öğr.Üyesi Erdem ÇOKLUK		

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18/01/2021

Mehmet Abdulkadir ŞEKEROĞLU

TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, bana her zaman yol gösteren ve destek olan saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Erdem ÇOKLUK başta olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim dalındaki diğer tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER başta olmak üzere tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyokimya yüksek lisans öğrencisi Zeynep ÖZMAN'a ve Arş. Gör. Dr. Fatıma Betül TUNCER 'e çalışma sürecindeki destekleri için teşekkürler ederim.

Bu süreçte olduğu gibi tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen SAÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Saygılarımla

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER ..	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
SUMMARY	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. PROSTAT KANSERİ.....	3
2. 1. 1. Prostat Bezi	3
2. 1. 2. Prostat Kanseri	4
2. 1. 2. 1. Prostat kanseri etyolojisi	4
2. 1. 2. 2. Prostat kanseri kliniği	6
2. 1. 2. 3. Prostat kanseri tanısı	6
2. 1. 2. 4. Prostat kanseri skorlaması ve evrenmesi.....	7
2. 1. 2. 5. Prostat kanseri tedavisi	11
2. 2. RUTEAKARPİN.....	12
2. 2. 1. Ruteakarpinin Yapısı, Etkileri ve Metabolizması	12
2. 2. 2. Ruteakarpinin Antikanserojen Etkisi	13
2. 3. APOPTOZ	14
2. 3. 1. Apoptozun Tanımı.....	14
2. 3. 2. Apoptozun Aktivasyon Mekanizması.....	14
2. 3. 2. 1. İntrinsik yolak	15
2. 3. 2. 2. Ekstrinsik yolak	15
2. 3. 3. Apoptozun Morfolojik Özellikleri	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	32
6. KAYNAKÇA	36

7. EKLER.....	43
Ek. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik	
Araştırmalar Etik Kurulun’ndan Etik Kurulu Onayı	43
8. ÖZGEÇMİŞ	44



KISALTMALAR VE SİMGELER

TNM	:T (tümör), N (lenf nodu tutulumu), M (uzak metastaz)
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
RT	: radyoterapi
HT	: Hormonal tedavi
ADT	: Androjen baskılama tedavisi
COX-2	: Siklo-oksijenaz-2
MMP-2	: Matriks metalloproteinaz-2
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
BPH	: Bening prostat hiperplazisi
DRE	: Parmakla rektal muayene
TRUS	: transrektal ultrasonografi
MRG	: Manyetik rezonans grafisi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
TUR-P	: Transüretral prostatektomi
TROD	: Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği
ASAP	: Küçük atipik asiner proliferasyon
HGPIN	: Yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi
AJCC	: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
ADP	: Adenozin difosfat
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör

ATP	: Adenozin trifosfat
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbon dioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm domaini
FASL	: Fas ligandı
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
µM	: Mikromolar
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinaz
RNA	: Ribonükleik asit
TRADD	: TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TRAILR	: TRAIL reseptörü
WST-1	: Suda çözünür tetrazolyum-1

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 : Prostat Bezinin Zonal Anatomisi.....	3
Şekil 2 : Prostat Kanseri Yol Haritası.....	7
Şekil 3 : Modifiye Gleason Skorlaması.....	8
Şekil 4 : Rutaekarpinin Moleküler Yapısı.....	12
Şekil 5 : Apoptoz Yolaklarının Şematik Gösterimi	16
Şekil 6 : Uygulanan Rutaekarpin Konsantrasyonları.....	21
Şekil 7 : Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	26
Şekil 8 : Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi.....	28
Şekil 9 : Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Morfolojik Etkisinin Akridin Oranj Boyaması İle Görüntülenmesi.....	29
Şekil 10 :Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Kaspaz-3 Miktarı Üzerine Olan Etkisi	31

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1 : AJCC Prostat Kanseri TNM Sınıflaması 2017.....	8
Tablo 2 : Annexin V-FITC ve PI ile Boyanan Hücrelerin Özellikleri	22
Tablo 3 : Rutaekarpinin Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılığı Üzerine Olan Sitotoksikite Sonuçları.....	26



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Prostat kanseri Dünya’da ve Türkiye’de giderek artan insidansı ile halk sağlığını tehdit eden malignitelerden birisidir. Özellikle metastatik prostat kanseri birden fazla kemoterapotik ilacın kombine kullanımına ek olarak radyoterapi ve destek tedavilerine rağmen erkeklerde önemli bir ölüm nedenidir. Bu nedenle metastatik prostat kanseri hastalarında daha etkin yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut tez çalışmasında, hem COX-2’yi hem de topoizomerazları inhibe ederek antikanserojen etki gösterdiği bilinen ruteakarpinin prostat kanseri tedavisinde sitotoksik ve apoptotik etkisinin incelenmesi ve potansiyel terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Ruteakarpinin PC-3 insan metastatik prostat kanseri hücre hattı hücrelerinde terapötik etkisi canlılık (WST-1), apoptoz (annexin V), hücre döngüsü, AO boyama ve kaspas-3 (ELISA) analizleri ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR: Ruteakarpinin farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 20 ve 40 μ M) PC-3 hücrelerine 24 ve 48 saat muamelesi sonrası canlılık yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 48 saat boyunca 20 ve 40 μ M ruteakarpin uygulamasının en etkin şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). 48 saat muamele sonunda artan doza bağlı olarak erken ve geç apoptoz oranının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı hem Annexin V, hem de AO boyama ile gözlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca ELISA analizi ile ruteakarpinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak PC-3 hücrelerinde aktif kaspaz-3 miktarını anlamlı bir şekilde arttığı da tespit edilmiştir ($p<0.05$).

SONUÇ: Bu çalışmada ruteakarpinin, PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu, potansiyel terapötik bir ajan olabileceği gösterilmiştir. Yapılacak invivo çalışmalarla anti-tümör etkinin saptanması durumunda; ruteakarpinin tek başına ya da rutin kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımının tedaviyi destekleyebileceği kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Canlılık Analizi, Metastatik Prostat Kanseri, PC-3 Hücre Hattı, Ruteakarpin

SUMMARY

Investigation of the Potential Therapeutic Effect of Rutaekarpin on Metastatic Prostate Cancer Cell Lines

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Prostate cancer with an increased incidence in the world and Turkey is one of the public health-threatening malignancies. In particular, metastatic prostate cancer is an important cause of death in men despite the combined use of more than one chemotherapeutic drug in addition to radiotherapy and supportive treatments. Therefore, there is a need to develop more effective new treatment strategies in metastatic prostate cancer patients. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effect of ruteakarpine, which is known to have an anticarcinogenic effect by inhibiting both COX-2 and topoisomerases, and to investigate its potential therapeutic effect.

MATERIAL AND METHOD: The therapeutic effect of rutecarpine on the PC-3 human metastatic prostate cancer cell line was evaluated by viability (WST-1), apoptosis (annexin V), cell cycle, AO staining and caspas-3 (ELISA) assays.

RESULTS: When compared to the control group, the viability percentages of different concentrations of rutecarpine (5, 10, 20 and 40 μ M) after 24 and 48 hours treatment of PC-3 cells, it was determined that administration of 20 and 40 μ M rutaecarpine for 48 hours most effectively decreased cell viability ($p < 0.05$). After 48 hours of treatment, it was observed that early and late apoptosis rate increased significantly compared to the control group due to the increasing dose by both Annexin V analysis and AO staining ($p < 0.05$). In addition, the amount of active caspase-3 increased significantly in PC-3 cells due to the increasing concentration of ruteakarpine by ELISA analysis ($p < 0.05$).

CONCLUSION: In this study, it has been shown that ruteakarpine has a cytotoxic and apoptotic effect on PC-3 cells and may be a potential therapeutic agent. In case an anti-tumor effect is detected by in vivo studies; We believe that the use of ruteakarpine alone or in combination with routine chemotherapeutic agents may support the treatment.

Keywords: Apoptosis, Metastatic Prostate Cancer, PC-3 Cell Line, Rutecarpine, Viability Analysis,



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri dünya genelinde artan nüfusla ve özellikle yaşlı popülasyonun artmasıyla insidansı ve önemi giderek artan malignitelerden birisidir (1, 2). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı verilerine göre erkeklerde en sık görülen ikinci kanserdir ve insidansı yüz binde 37,6 olarak ifade edilmektedir (3, 4). Bu veriler prostat kanserinin dünyada ve Türkiye’de halk sağlığını tehdit eden önemli bir sağlık problemi olduğunu göstermektedir.

Prostat kanserinde gleason skorlaması ve TNM evrelemesi; prognozu, yaşam beklentisi ve tedaviyi etkileyen en önemli parametrelerdendir. Bu nedenle hastalığın tedavi ve izlem sürecinde TNM evresi, gleason skoru/ histopatolojik karakteri ve serum PSA değerlerine göre risk sınıflaması yapılmakta ve buna yönelik tedavi düzenlenmektedir (5). Prostat kanserinde tedavi; cerrahi (radikal prostatektomi), radyoterapi (RT) ve hormonal tedavi (HT) yaklaşımlarının risk grubuna göre tek ya da kombine kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ancak metastatik prostat kanserinde konvansiyonel yöntemler diğer kanserlerde olduğu kadar başarılı olamamaktadır (6, 7).

Metastatik prostat kanseri, androjen baskılama tedavisine (ADT) duyarlı ve kastrasyona dirençli olmak üzere temel olarak ikiye ayrılmaktadır (8). Metastatik prostat kanserlerinde birden fazla kemoterapotik ilacın kombine kullanımına ek olarak RT ve destek tedavilerine de başvurulabilmektedir (7). Bu tedavilere rağmen metastazlar, prostat kanseri olan erkeklerde hala önemli bir komplikasyon ve ölüm nedenidir(1). Bu nedenle metastatik prostat kanseri hastalarında daha etkin yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Rutaekarpin *Evodia rutaecarpa* adlı geleneksel bir Çin bitkisinden elde edilen alkaloid yapıda bir bileşiktir (9). Binlerce yıldır gastrointestinal hastalıklar, amenore, postpartum kanama gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bu bileşiğin anti-enflamatuvar, anti-obezite ve anti-tümör aktiviteler olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (10-14).

Rutaekarpinin anti tümör etkisi incelendiğinde ise topoizomera I ve topoizomera II'yi inhibe ederek kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (12). Rutaekarpinin antineoplastik etkisine aracılık ettiği düşünülen bir diğer özelliği ise

siklo-oksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü olarak etki göstermesidir (15). COX-2 ekspresyonunun birçok malign tümörde artış gösterdiği, kanser hücrelerinin daha invazif hale gelmesine neden olduğu ve Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi faktörlerinin salınmasını kolaylaştırarak neoplastik proliferasyonu hızlandığı bilinmektedir (16-18). Prostat kanserinde ise; ruteakarpinin yapısal bir analogu olan evodiaminin hücre döngüsünü engellediği ve apoptoz indüksiyonu yoluyla prostat kanseri hücre hatlarının büyümesini engellediği bildirilmiştir (19). Ruteakarpinin antikanser aktivitesini in vivo olarak belirlemek için farelerde oluşturulan ksenograft prostat kanseri modellerinde ruteakarpinin metastatik prostat kanserinde tümörün büyümesini ve hücre proliferasyonunu önemli ölçüde bastırdığı saptanmıştır (20). Ruteakarpinin hem COX-2 inhibisyonu sağladığı hem de topoizomazları inhibe ettiği bilinse de literatürde metastatik prostat kanseri tedavisinde potansiyel etkisine ilişkin yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, metastatik prostat kanseri tedavisinde ruteakarpinin sitotoksik ve apoptotik etkisinin incelenmesi ve potansiyel terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

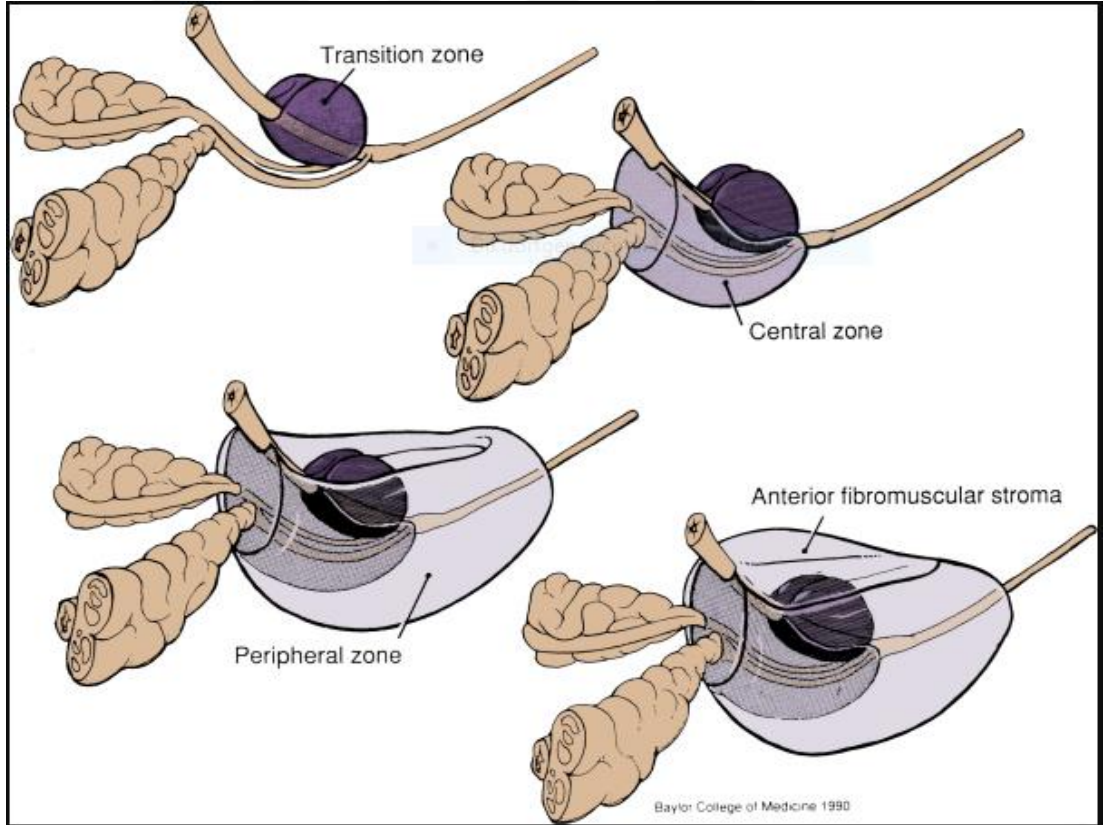
2. GENEL BİLGİLER

2.1.PROSTAT KANSERİ

2.1.1. Prostat Bezi

Prostat bezi mesanenin hemen altında bulunan glandüler ve stromal yapılardan oluşan bir organdır. Prostat bezinin zonal anatomisi McNeal tarafından tanımlanmıştır. Bu tanımlamaya göre prostat bezi anatomik olarak periferik zon, transisyonel zon, santral zon, ön fibromusküler stroma olarak dörtzona ayrılmaktadır. Dış kısmı ise fibromusküler stromanın yoğunlaşmasından meydana gelen bir kapsül ile sarılmaktadır (21, 22).

Prostat bezinin zonal anatomisi **Şekil 1'** de gösterilmektedir.



Şekil 1. Prostat Bezinin Zonal Anatomisi (23)

Histopatolojik olarak ise epitel ve stromal olarak iki hücresel yapıdan oluşmaktadır. Prostat spesifik antijen, asit fosfataz, lösin amino peptidaz salgılanmasında görev alan lüminal epitel hücreleri; kromogranin A, nöron spesifik enolaz, sinaptofizin gibi molekülleri sentezleyen nöroendokrin hücreler, bazal ve lüminal hücre arasında bir geçiş formunu oluşturan İntermediyal hücreler başlıca epitel yapıyı oluşturmaktadır. Ekstrasellüler matriks olarak ifade edilen düz kas hücreleri, fibroblastlar, nöronlar, bağ doku bileşenleri (kollajen, elastik fibriller, glikozaminoglikanlar v.b.) ise stromal yapıyı meydana getirmektedir (24).

2.1.2.Prostat Kanseri

Amerika Birleşik Devletleri Kanseri Enstitüsü (NCI) tarafından prostat dokusundan meydana gelen maligniteler prostat kanseri olarak tanımlanmaktadır. Prostat kanserleri sıklıkla multifokal olmasına rağmen,%80-85'i periferik zondan, %10 ila %15'i transisyonel zondan ve %5 ile %10'u santral zondan kaynaklanmaktadır (25).

Prostat kanseri dünya genelinde artan nüfusla ve özellikle yaşlı popülasyonun artmasıyla insidansı ve önemi giderek artan malignitelerden birisidir (2). Sıklık olarak her iki cinsiyet ele alındığında en sık görülen beşinci kanser; erkeklerde ise en sık ikinci kanser türüdür. GLOBOCAN 2018'e göre, 2018 yılında dünya çapında 1.276.106 yeni prostat kanseri vakası rapor edilmiştir. 2040 yılına kadar 2 milyondan fazla yeni vaka olacağı öngörülmektedir (26, 27).

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre erkeklerde en sık görülen ikinci kanserdir. Ülkemizde prostat kanseri insidansı yüzbinde 37,6 olarak ifade edilmektedir. ProstaTÜRK çalışmasında da benzer şekilde Türkiye'de insidansı yüzbinde 35 olarak saptanmıştır (3, 4). Elde edilen veriler prostat kanserinin dünyada ve Türkiye'de halk sağlığını tehdit eden önemli bir sağlık problemi olduğunu göstermektedir.

2.1.2.1. Prostat kanseri etyolojisi

Prostat kanserinin etiyolojisi incelendiğinde bilinen majör risk faktörleri ileri yaş, etnik köken, genetik, beslenme ve çevresel faktörlerdir. Bunlar dışında risk faktörleri diğer yaygın kanserlere kıyasla büyük ölçüde bilinmemektedir (24, 28).

Prostat kanseri etyolojisini ve insidansını etkileyen en önemli faktörlerden birisi yaşıdır. İlerleyen yaşla birlikte insidans artmakta 50 yaşın altındaki 350 erkekten sadece 1'ine prostat kanseri teşhisi konulurken, insidans oranı 50-59 yaşları arasındaki her 52 erkeğe 1; 65 yaş üstü erkeklerde ise yaklaşık %60'a ulaşacağı ifade edilmektedir (2). Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada 55 yaş üzerindeki erkeklerde, 55 yaş atındakilere kıyasla prostat kanseri görülme sıklığının 17 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (29).

Prostat kanser insidansı ülkelerin gelişmişlik seviyelerine göre de değişkenlik göstermektedir. Örneğin Avrupa'da 2018'de erkeklerde yeni kanser tanılarının %24 ünü oluşturarak birinci sırada; Amerika'da ise %9.5 ile ikinci sırada prostat kanseri yer almaktadır. İnsidansındaki bölgesel eşitsizliğin tarama testlerinin yaygınlığı, yaşlı nüfusun fazlalığı gibi sosyal nedenlere, ayrıca genetik ve çevresel nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir (26, 27). Genetik olarak incelendiğinde ise araştırmalar, Afro-Amerikan erkeklerin dünya çapında en yüksek prostat kanseri insidansına sahip olduğunu ve diğer ırk ve etnik gruplara kıyasla daha erken yaşta hastalık geliştirme olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir (30).

Kanser insidansının yanında mortalite oranı da bölgeler arası farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde erken tarama ve biyopsi ile erken tanı konulması tedaviye daha erken ulaşmayı ve kür oranını arttırmaktadır. Bu nedenle mortalite oranları Sahra Altı Afrika bölgelerinde ve Karayipler'de Amerika ve Avrupa ülkelerine göre yüksek seyretmektedir (27).

Prostat kanserinin beslenme ve çevresel faktörlerden etkilenmesi incelendiğinde ise sedanter yaşam şekli, obezite, diyetle kırmızı et, doymuş (satüre) yağ ve süt ürünlerinin fazla tüketiminin prostat kanseri riskini artırdığı ifade edilmektedir (31). Pacheco ve ark. (32), Arjantinli erkeklerin prostat kanseri tanısı öncesi ve sonrası beslenme alışkanlıklarını değerlendirdikleri olgu kontrol çalışmalarında prostat kanseri riskinin haftada üç ve daha fazla porsiyon kırmızı et tüketenlerde 2.5 kat, yağdan zengin gıdaları tüketenlerde 3.5 kat arttığını bulmuşlardır. Ayrıca meyve ve sebze tüketmek prostat kanserine karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir. Ancak İngiltere'de yapılan başka bir prospektif kohort çalışmasında diyetel besinlerin prostat kanseri riski ile ilişkili olmadığı da ifade edilmiştir (33, 34).

Çevresel faktörler incelendiğinde ise yeterli fiziksel aktivite (35), uyku düzeni (36), çalışma ortamında organofosfat ve insektisit maruziyeti (37, 38), eğitim seviyesi (32) v.b. sosyal ve çevresel etkenlerin prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

2.1.2.2. Prostat kanseri kliniği

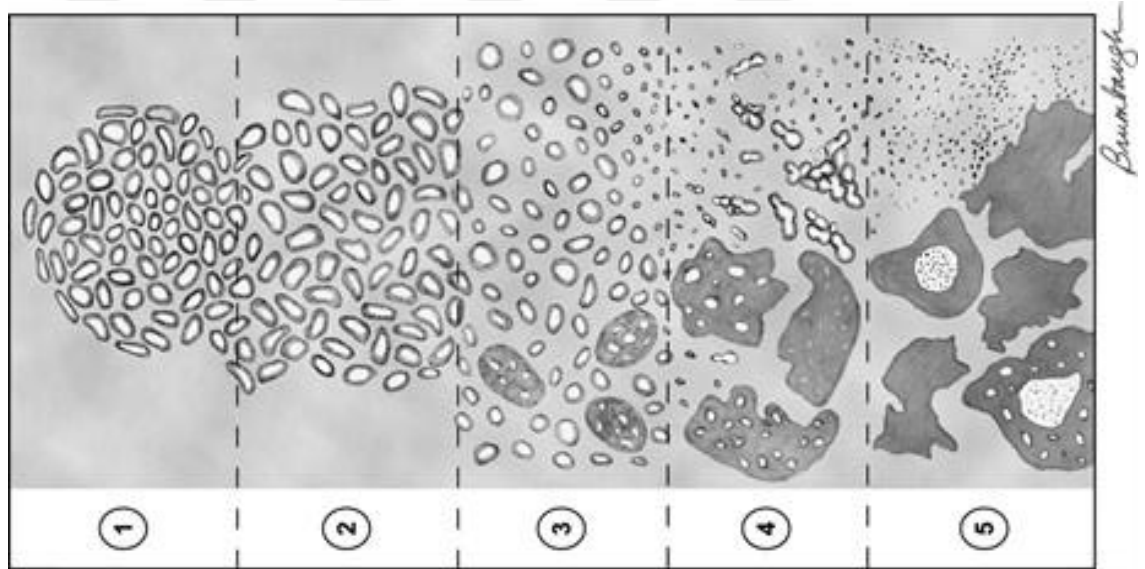
Bening prostat hiperplazisi (BPH) ve prostatit ile birlikte erkeklerde en sık görülen prostat hastalıklarından birisi de prostat kanseridir. Erken dönemde çoğunlukla alt üriner sistem belirti ve bulguları (idrar kuvvetinin ve kalınlığının azalması, idrarı boşaltmada güçlük, kesik kesik idrar yapma, sık idrara çıkma ve ani idrar yapma isteği) ile klinik göstermektedir (39). İlerleyen dönemlerde bu şikayetlere ek olarak metastaz yapılan dokuya spesifik şikayetler (Kemik ağrısı, nörolojik bulgular, anemi v.b.) de izlenebilmektedir.

2.1.2.3. Prostat kanseri tanısı

Prostat kanseri tanısında parmakla rektal muayene (DRE) ve serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyesi ölçümü ilk adımı oluşturur. Daha sonraki aşamalarda transrektal ultrasonografi (TRUS), manyetik rezonans grafisi (MRG), bilgisayarlı tomografi (BT) tanıda kullanılan yöntemlerdir. Kesin tanı transüretal prostatektomi (TUR-P) ya da prostatektomi ile alınan dokuya histopatolojik inceleme yapılarak konulmaktadır (5, 40-42).

Prostat kanseri tarama ve tanısında Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği (TROD) (7) tarafından belirlenen prostat kanseri yol haritası Şekil 2’de gösterilmiştir.

en yaygın görülen iki derece toplanarak gleason skoru saptanmaktadır. Gleason skoru 2 ve 10 arasında değişen puanlar alabilmektedir. Skor 8-10 olduğu zaman kanserin oldukça kötü prognozlu olduğu; 6 ve altındaki puanlarda ise iyi prognozlu olduğu ön görülmektedir. Gleason skorları ilerleyen araştırmalarla modifiye edilmiştir. Ayrıca değerlendirme yapılırken serum PSA düzeyi ve tümör sınırlarının hesaba katılması gerektiği çalışmalarda ifade edilmiştir (5, 43, 44). Modifiye gleason skorlaması **Şekil 3**'de gösterilmektedir (45).



Şekil 3. Modifiye Gleason Skorlaması (45)

Prostat kanserinin prognozu ve tedavisine karar verirken kullanılan diğer parametre ise TNM sınıflamasıdır(46). Amerikan Birleşik Kanser Komitesi tarafından yapılan (AJCC - 2017) klinik ve patolojik TNM sınıflaması **Tablo 1'** de gösterilmiştir (25).

Prostat kanserinde tümör hücrelerinin infiltre ettiği bölgesel lenf düğümleri genellikle ortak iliak arterlerin çatallanmasının altındaki pelvik lenf düğümleri olan;pelvik, hipogastrik, obturatör, iliak ve sakral (lateral, presakral veya promontory) grupları içerir. Uzak lenf düğümleri ise gerçek pelvis sınırlarının dışında yer almaktadır. Aortik, ortak iliak, derin kasık, yüzeysel kasık (yani femoral), supraklaviküler, servikal, skalen ve retroperitoneal lenf nodları uzak lenf düğümlerindendir.

Tablo 1.AJCC Prostat Kanseri TNM Sınıflaması 2017

Klinik T Kategorisi

Tx:Primer tümör değerlendirilemez.

To: Primer tümör bulgusu yok.

T1: Klinik olarak aşikar olmayan (Palpe edilemeyen ve görüntüde saptanamayan) tümör.

T1a: Rezekte edilen dokunun %5 ve daha azında tümör dokusu bulunması

T1b: Rezekte edilen dokunun %5'inden fazlasında tümör dokusu bulunması

T1c: İğne biopsisi ile tanımlanan tümör bir veya her iki tarafta da mevcut. Ancak palapsyonla ele gelmiyor.

T2:Tümör palpe edilir ve prostatta sınırlıdır.

T2a: Tümör bir lobun yarısından azını içerir.

T2b: Tümör bir lobun yarısından çoğunu içerir. Ancak iki lobu içermez.

T2c: Tümör iki lobu da tutar.

T3: Fikse olmayan ekstraprostatik tümör var.

T3a: Ekstraprostatik tümör; tek veya çift taraf

T3b: Seminal vezikül(ler)i infiltre etmiş.

T4: Tümör fiksedir. Ayrıca dış sfinkter, rektum, mesane, levator kasları ve/veya pelvik duvar gibi seminal veziküller dışındaki bitişik yapıları işgal eder.

Patolojik T Kategorisi T2: Organ sınırlı T3: Ekstraprostatik yayılım var. T3a: Ekstraprostatik yayılım var (tek taraflı veya iki taraflı) veya mesane boynunda mikroskopik invazyon var. T3b: Seminal vezikül(ler)i infiltre etmiş. T4: Tümör fiksedir. Ayrıca dış sfinkter, rektum, mesane, levator kasları ve/veya pelvik duvar gibi bitişik yapıları işgal eder.
N Kategorisi NX: Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemedi. N0: Pozitif lenf düğümleri metastazı yok. N1: Bölgesel lenf düğümlerinde metastaz var.
M Kategorisi M0: Uzak metastaz yok. M1: Uzak metastaz mevcut. M1a: Bölgesel olmayan lenf nodları metastazı var. M1b: Kemik metastazı var. M1c: Kemik dışı uzak organ metastazları var.

T:Tümörün organa sınırlı olması, N:lenf nodu metastazı, M: Uzak organ metastazını ifade etmektedir.

Organ metastazı ise en sık kemik, akciğer, karaciğer, plevra, sürrenal bez, dura ve beyin parankimine olmaktadır. Kemikler, prostat kanseri metastazının en yaygın nodal olmayan bölgeleridir. Kemik metastazı en sık vertebralara olmaktadır. Metastatik kemik lezyonları genellikle osteolitik değil osteoblastik türde izlenmektedir. Akciğer ve karaciğer metastazları da genellikle hastalığın ilerleyen safhalarında tespit edilmektedir (25, 46).

Amerika Birleşik Devletleri'nde prostat kanseri hastalarından elde edilen son veri analizi, özellikle 55-69 yaş grubundaki erkeklerde metastatik prostat kanseri oranının arttığını göstermiştir. Kayıtlı tüm vakalarda metastaz insidansı oranı 2012 yılından itibaren yılda %2.74 olarak anlamlı şekilde artmıştır (47). Metastaz, prostat kanseri hastalarında komplikasyonlara ve hatta ölüme neden olmaktadır. Prostat kanseri

kaynaklı ölümlerin büyük çoğunluğunda lenf bezleri, akciğer, karaciğer, kemik veya diğer bölgelere metastaz bulunduğu da saptanmıştır (1).

2.1.2.5. Prostat kanseri tedavisi

Prostat kanserinde hastalığın tanı, tedavi ve izlem süreciyle ilgili araştırmalar sonucunda elde edilen uluslararası kılavuzlar literatürde mevcuttur (48-51). Kılavuzlar çerçevesinde tümörün TNM evresi, gleason skoru/ histopatolojik karakteri ve serum PSA değerlerine göre risk sınıflaması yapılmakta ve buna yönelik tedavi düzenlenmektedir (5). NCCN kılavuzuna göre risk grupları çok düşük, düşük, orta, yüksek, çok yüksek, metastatik olarak detaylı altı sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflamada tümörün T3b (seminal veziküle infiltrate) ve ileri olması hastayı çok yüksek risk grubuna sokarken; T evresi farketmeksizin lenf ve organ metastazı varlığı tümörü metastatik prostat kanseri grubuna sokmaktadır (5, 7).

Prostat kanserinde tedavi, cerrahi (radikal prostatektomi), radyoterapi (RT) ve hormonal tedavi (HT) yaklaşımlarının risk grubuna göre tek ya da kombine kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ancak metastatik prostat kanserinde konvansiyonel yöntemler prostat kanserinde diğer kanserlerde olduğu kadar başarılı olamamaktadır (6, 7).

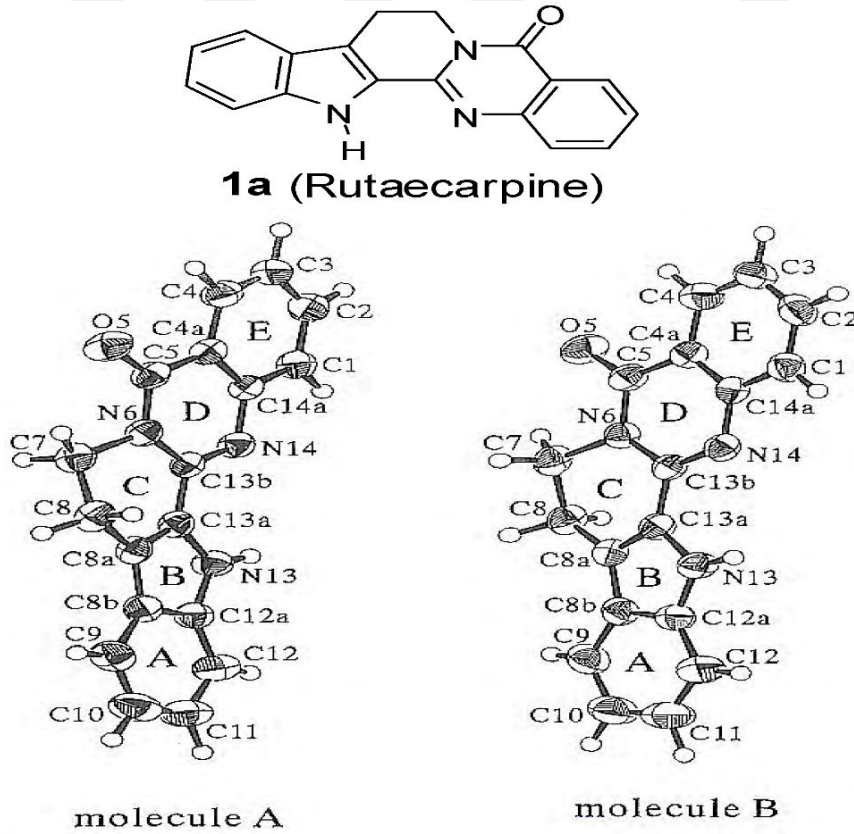
Metastatik prostat kanseri temel olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu gruplar androjen baskılama tedavisi duyarlı yani daha önce hiç HT almamış; kastrasyona dirençli (daha önce HT almış) olarak ayrılmaktadır. ADT duyarlı metastatik prostat kanserinde sadece ADT (LHRH analogları veya bilateral orşiyektomi veya LHRH antagonisti) ya da ADT +Kemoterapi (KT) uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalar KT alabilecek durumda olan hastalar için bu kombine tedavinin sağ kalıma katkısı olduğunu göstermiştir (8). Kastrasyona dirençli metastatik prostat kanserinde (CRPC) ise birden fazla KT ilaç verilmekte, bu sürede ADT de verilmeye devam edilmektedir. CRPC’de kemik metastazı da sık görülmektedir. Bu durumda ek olarak kemik hedefli ajanlar (zoledronik asit, denosumab (RANK-ligand inhibitörü)), palyatif RT ve destek tedavilerine (diyet, vitamin desteği, psikososyal destek, egzersiz v.b.) de başvurulabilmektedir (7). Bu tedavilere rağmen metastazlar, prostat kanseri olan erkeklerde hala önemli bir komplikasyon ve ölüm nedenidir. Prostat kanserinden ölen neredeyse tüm erkeklerin kemiğe veya lenf düğümleri, akciğer ve

karaciğer dahil diğer bölgelere metastazları saptanmıştır (1). Bu nedenle metastatik prostat kanseri hastalarında daha etkin yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. RUTEAKARPİN

2.2.1. Ruteakarpinin Yapısı, Etkileri ve Metabolizması

Ruteakarpin *Evodia rutaecarpa* adlı geleneksel bir Çin bitkisinden elde edilen indolopiridokinazolinon alkaloididir(9). Binlerce yıldır gastrointestinal hastalıklar, amenore, postpartum kanama gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan alkaloid yapıda bir bileşiktir. Ruteakarpinin antienflamatuar, antiobezite ve antitümör (10-14) aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (52). Ruteakarpinin moleküler yapısı incelendiğinde ise; A, B, C, D ve E olarak 5 düzlemsel halkadan oluşmakta ve doğada 2 ayrı moleküler yapıda bulunabilmektedir (Şekil 4). Özellikle E halkasının antikanserojen etkide (topoizomeraz I ve II üzerine inhibitör etki ile) rol aldığı bilinmektedir (53).



Şekil 4.Ruteakarpinin Moleküler Yapısı (53)

Ruteakarpinin vücuttan uzaklaştırılması ise faz I ve faz II reaksiyonları ile karaciğer mikrozomlarında gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonu sonucunda monohidroksi metabolitleri idrar, feçes ve safra ile atılmaktadır. Az miktarda dihidroksi metabolitleri ise idrar ve feçes ile atılabilmektedir. Faz II reaksiyonu ise sülfatla konjugasyon sonucu oluşan metabolitler feçes ve idrarda; glukoronid ile konjugasyon sonucu meydana gelen metabolitler ise idrarda saptanabilmektedir (9).

2.2.2. Ruteakarpinin Antikanserojen Etkisi

Ruteakarpinin antikanserojen etkisi incelendiğinde topoizomera I ve topoizomera II enzimlerini inhibe ederek DNA replikasyonu sırasında süperkoillerin açılmasına bağlı interkalasyon yoluyla sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (12). Topoizomera inhibitörleri, bir grup anahtar enzimi inhibe eden klinik uygulamada tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanlardır. Bu ajanlar DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında hücrenin normal fonksiyonuna müdahale ederek sitotoksik etki oluşturmakta ve bu etkileriyle neoplastik hastalıkların tedavisinde önemli yer tutmaktadırlar (12, 54).

Ruteakarpinin antineoplastik etkisine aracılık ettiği düşünülen bir diğer özelliği ise siklo-oksijenaz-2 (COX-2) inhibitör özelliği göstermesidir (15). COX-2 ekspresyonunun birçok malign tümörde artış gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca COX-2 ekspresyonunun kanser hücrelerinin invaziv özelliklerini etkileyerek hücrelerin daha invazif hale gelmesine neden olduğu ve matriks metalloproteinaz-2 düzeyiyle de ilişkili olduğu bulunmuştur. COX-2 ekspresyonu sonucunda prostaglandinlere bağlı inflamasyon artmakta, artan inflamasyona bağlı olarak da tümör mikroçevresinde epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin salınması kolaylaşarak neoplastik proliferasyon hızlanmaktadır (16-18). Ruteakarpinin renal, meme ve akciğer kanseri hücre hatları gibi çeşitli hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (9).

Prostat kanseri ve ruteakarpin incelendiğinde ise; E. rutaecarpa'nın bir başka alkaloid bileşeni ve ruteakarpinin yapısal bir analogu olan evodiaminin, G₂-M fazında hücre

döngüsünü engellediği ve apoptoz indüksiyonu yoluyla da prostat kanseri hücre hatlarının büyümesini engellediği bildirilmiştir (19). Hücre döngüsünün incelendiği başka bir çalışmada ise ruteakarpinin doza bağımlı bir şekilde farelerde G₀-G₁ fazında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu saptanmıştır (55). Prostat kanseri hücre hattında her iki bileşiğinde sitotoksik etkileri olduğu ifade edilmiştir (56). Ruteakarpinin antikanser aktivitesini in vivo belirlemek için farelerde oluşturulan ksenograft prostat kanseri modellerinde ruteakarpinin CRPC büyümesini ve hücre proliferasyonunu önemli ölçüde bastırdığı saptanmıştır (20) .

2.3. APOPTOZ

2.3.1. Apoptozun Tanımı

Apoptoz, hücrelerde hayatta kalma / ölüm dengesini koruyan programlanmış hücre ölümü şeklidir. Apoptoz normal dokuların gelişim ve homeostazında kritik bir rol oynamaktadır. Yetersiz apoptoz kanser veya artmış otoimmüniteye neden olurken; apoptozun artması durumunda hızlandırılmış hücre ölümü akut ve kronik dejeneratif hastalıklara, immün yetmezliklere, infertiliteye neden olabilmektedir. DNA hasarı, kontrolsüz proliferasyon gibi durumlarda apoptozun aktivasyonu ile karsinogenez bloke edilmekte ve apoptotik sinyaller genomik bütünlüğün korunmasına yardımcı olmaktadır (57-59). Ayrıca apoptotik yolların düzensizliği sadece tümör oluşumunu teşvik etmekle kalmayıp, aynı zamanda kanser hücrelerinin tedaviye dirençli hale gelmesi ve metastazı kolaylaştıran bozulmuş apoptotik sinyallere de neden olmaktadır. Bu nedenle apoptoz kusurları artık protoonkogen aktivasyonunun önemli bir tamamlayıcısı olarak kabul edilmektedir. Kanser hücreleri de çeşitli mekanizmalarla apoptozdan kaçınmakta ve kontrolsüz hücre bölünmesini sağlamaktadır (60-63). Bu nedenle, apoptozun moleküler mekanizmalarının ve hücre ölümünün daha iyi anlaşılması özellikle kanser tedavisinde önem arz etmektedir.

2.3.2. Apoptozun Aktivasyon Mekanizması

Apoptoz, spesifik olarak sisteinin aspartil grubunu hedefleyen "kaspazlar" olarak bilinen proteazlar tarafından başlatılmaktadır. Hücrelere apoptoza girme talimatı

veren spesifik sinyaller alındığında hücrede bir dizi değişiklik meydana gelmektedir. Kaspazlar tipik olarak apoptozun erken aşamalarında aktive edilerek hücre iskeletindeki yapısal proteinler ve DNA onarım enzimleri gibi nükleer proteinler dahil olmak üzere normal hücresel işlev için gerekli olan temel hücresel bileşenleri ayırır. Ayrıca çekirdekteki DNA'yı parçalamaya başlayan DNazlar gibi diğer parçalayıcı enzimleri de aktive ederler. Apoptoz süreci proapoptotik ve antiapoptotik protein düzenleyicileri arasındaki denge ile sürdürülür (64-66).

2.3.2.1. İntrinsik yolak

Apoptozun içsel yolağı olarak ifade edilen intrinsik yolak mitokondri ve mitokondriyal proteinler kullanılarak meydana gelmektedir. DNA hasarı, protoonkogenlerin upregülasyonu, fazla Ca^{2+} , oksidanlar, mikrotübülü hedefleyen ilaçlar v.b. nedenlerle bu yol aktive olmaktadır (57, 67). Yolak Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmekte BH3 proteinlerinin yukarı regülasyonu ile hem Bax hem de Bak aktive edilmektedir. Bax p53 tarafından düzenlenen tümör baskılayıcı bir gendir. Aktive edildikten sonra, Bax ve Bak oligomerize olarak mitokondriyal dış membran geçirgenliğine (MOMP) yol açmaktadır (67, 68).

MOMP, intrinsik apoptozun tanımlayıcı olayıdır ve geri dönüşü olmayan nokta olarak kabul edilmektedir. Artan dış membran geçirgenliği, sitokrom c'nin salınımını sağlamakta ve sitokrom c'nin salınmasıyla sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1), dATP ve procaspase-9'dan oluşan apoptozom meydana gelmektedir. Apoptozom içinde, procaspase-9, kaspaz-3 ve -7'yi etkinleştiren kaspaz-9'a dönüştürülür. Bu sayede proteinler hızla parçalanarak hücre ölümü meydana gelmektedir (57, 59, 68).

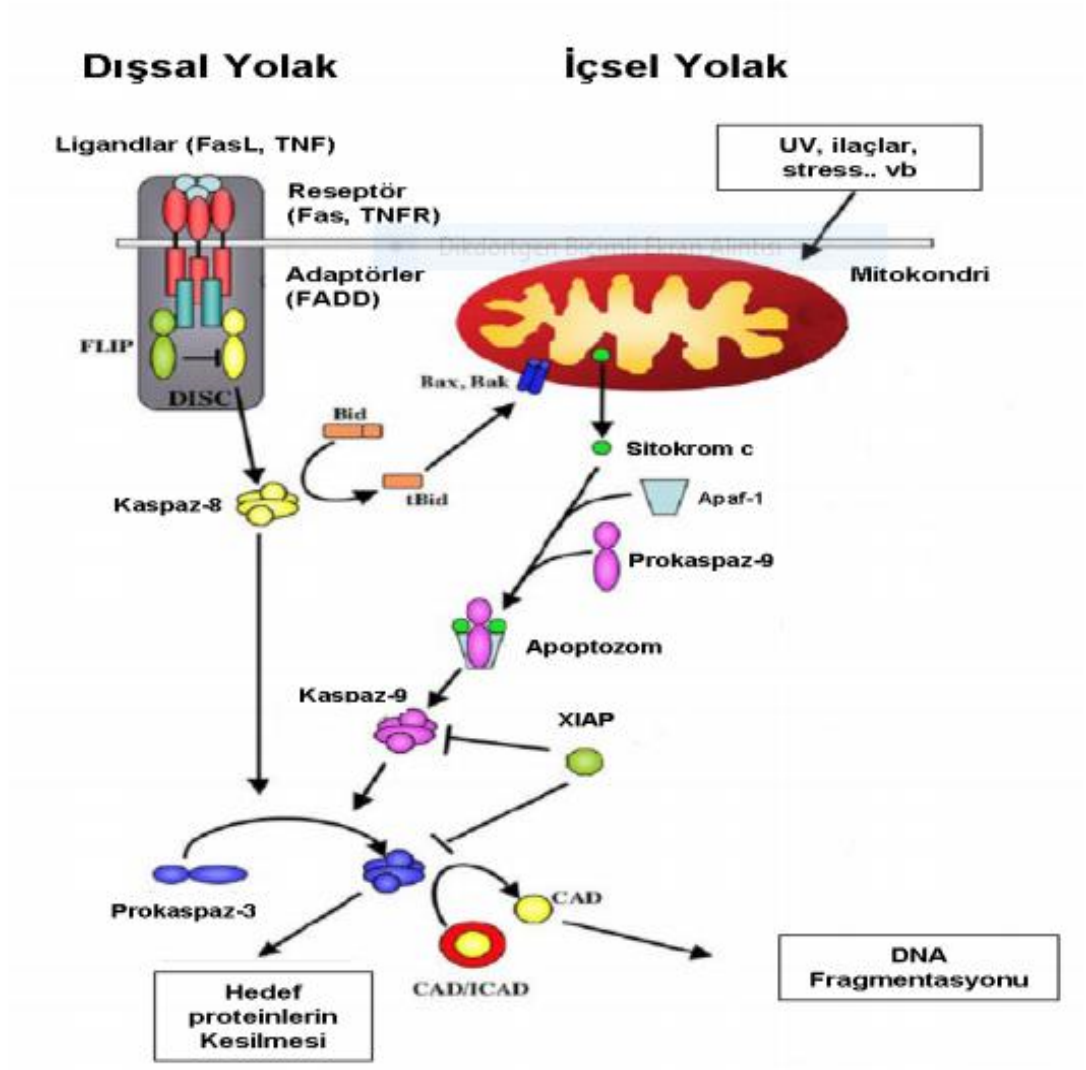
2.3.2.2. Ekstrinsik yolak

Ekstrinsik yolda apoptozu indüklemek için hücre dışı sinyaller kullanılmaktadır. Ölüm ligandları olarak da bilinen hücre ölüm sinyalleri (Fas ligandı (Fas-L), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) ve tümör nekroz faktörü (TNF)) ölüm reseptörlerine bağlanır. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) gibi çekirdek proteinlerini harekete geçiren bileşenlere sahiptir. Ligand-reseptör bağlanması ile başlatıcı

prokaspaz-8 ve -10, aktive olarak ölüme neden olan sinyal iletme kompleksini (DISC) oluşturur.Daha sonra kaspaz-3, -6 ve -7 aktive edilerek hücre ölümü başlar (69-71).

Apoptotik yollar **Şekil 5**'te gösterilmiştir.





Şekil 5. Apoptoz Yolaklarının Şematik Gösterimi (72)

2.3.3. Apoptozun Morfolojik Özellikleri

Apoptotik süreç sırasında hücreler, hücre iskeletindeki laminlerin ve aktin liflerinin bölünmesinin ardından küçülmeye başlar. Çekirdekte kromatinin apoptotik parçalanması genellikle nükleer zarın çevresinden başlayarak kromatinin yoğunlaşmasıyla "at nalı" benzeri bir görünüme yol açar. Bu durum karyoreksis olarak adlandırılır. Hücre küçülerek ve yuvarlaklaşarak makrofajlar tarafından fagosit edilebilecek şekilde küçük paketlere dönüştürülür. Makrofajlar tarafından

fagositozu kolaylaştırmak için apoptotik hücreler sıklıkla makrofaj yanıtını tetikleyen plazma membran değişikliklerine uğrarlar. Bu değişikliklerden biri, fosfatidilserinin hücrenin içinden dış yüzeye yer değiştirmesidir. Apoptozun son aşaması ise membran tomurcuklanmasıyla apoptotik cisimler olarak adlandırılan küçük veziküllerin ortaya çıkmasıyla karakterize edilir (59, 69, 71).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- -80°C derin dondurucu (Haier, Çin)
- Buzdolabı (Regal, Türkiye)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Stuart, Birleşik Krallık)
- Distile su cihazı (Nüve, Türkiye)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Orbital çalkalayıcı (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)
- Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- CO₂ inkübatör (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- İnverted mikroskop (BestScope, Çin)
- Countees hücre sayım cihazı (Invitrogen, ABD)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- EVOS Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- ELİSA Plaka Okuyucu (Hangzhou Allsheng, Çin)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck Milipore, Almanya)
- Rutaekarpın (Sigma Aldrich, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Trypsin/EDTA (%0.25) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)

- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, ABD)
- Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) reaktifi (Biovision, ABD)
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)
- Akridin oranj (Sigma Aldrich, ABD)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- Tripan mavisi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Caspase 3 Human Instant ELISA™ Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücre Hattının Özellikleri ve İnkübasyon Koşulları

Mevcut tez çalışmasında kullanılan PC-3 (ATCC® CRL-1435™) insan metastatik prostat kanseri hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak temin edildi. Hücreler %10 Fetal Bovin serum (FBS) ve Penisilin /Streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) besiyerinde ve %5 CO₂ ile %95 hava bulunan 37°C inkübatör içerisinde T25 ya da T75'lik flasklarda kültüre edildi.

3.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

PC-3 hücrelerinin alt kültürleri yapılırken %0.25 Trypsin-EDTA (Gibco) ve PBS (Gibco) kullanıldı. Hücreler konflue olduktan sonra T25 flasklardan besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile 1 kez yıkandı ve hücreler tripsin ile kaldırıldı. Tripsin enzimini inaktive etmek için RPMI 1640 besiyeri eklenerek hücreler toplandı. Steril falkona aktarılan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Hücreler çoğaltılmak üzere T75'lik flasklara ekildi. T75'lik flasklarda yeterli hücre miktarına ulaşıldığında ise tekrar hücreler pasajlandı ve deneyler için 96 kuyulu ya da 6 kuyulu hücre kültürü plakalarına ekim yapıldı.

3.2.1.3. Hücrelerin Stoklanması

Çoğalan hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücrelerin stoklanması için; hücrelerden santrifüj sonrası elde edilen pellet 900 µL besiyeri ile süspanse edildi ve hücre stoklanması için kullanılan kryotüplere aktarıldı. Hücre süspanسیونunun üzerine kriyoprotektif bir ajan olan dimetilsülfoksit (DMSO)'dan 100 µL eklenerek hücreler -80°C dondurucuda stoklandı.

3.2.1.4. Hücrelerin Çözdürülmesi

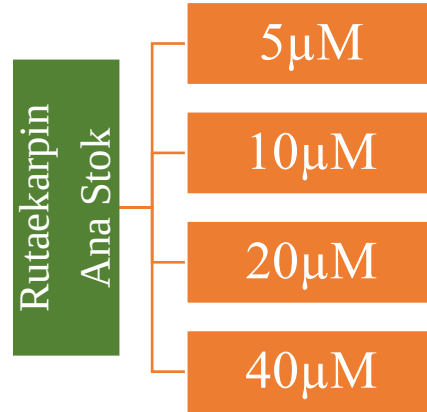
Hücre bulunan kryotüpler -80°C dondurucudan çıkarılarak 37°C su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek çözdürüldü. İçerisine önceden 37°C'ye ısıtılmış RPMI 1640 besiyeri dikkatlice eklenerek pipetlendi ve hücreler filtreli flasklara ekildi.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

Tripsin ile kaldırılarak elde edilen hücre pelleti 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Hücre süspanسیونundan 10 µL alınarak bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 10 µL tripan mavisi eklenerek pipetlendi. Hazırlanan hücre-boya karışımının tamamı (20 µL) özel bir lam içerisine konuldu. Lam, Countess hücre sayım cihazına (Invitrogen, ABD) yerleştirildi ve cihazda hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.2.1.6. Rutaekarpin Hazırlanması

Rutaekarpin (R3277-25MG, Sigma-Aldrich) etken maddesi toz halinde ticari olarak satın alındı. Kabin içerisinde steril koşullarda DMSO eklenerek çözüldü ve ana stok çözelti hazırlandı. Literatür taraması ile uygulanacak doz aralığı belirlendi (**Şekil 6**). Belirlenen konsantrasyonlarda rutaekarpin, ana stoktan besiyeri ile dilüsyon yapılarak hazırlandı.



Şekil 6. Uygulanan rutaekarpin konsantrasyonları.

3.2.2. Hücre Canlılık Testi (WST-1) Analizi

WST-1 hücre canlılığının ve proliferasyonunun ölçümü için kullanılan radyoaktif olmayan kolorimetrik bir yöntemdir. Hücrelere eklenen tetrazolium tuzlarının yardımıyla hücre sitotoksitesi değerlendirilir. Tetrazolium tuzları, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşerek renk değişimini gerçekleştirir. Bu oluşan renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir.

WST-1 kit protokolüne göre 96 kuyulu hücre kültürü plakalarının her kuyusuna 100 µL besiyeri içerisinde 2×10^4 hücre/mL PC-3 hücresi ekildi. 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 40 µM rutaekarpin maddesi hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyuya 10 µL WST-1 boyası eklenilmiş ve 45 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümü için 460-620 nm dalga aralığında ELISA okuyucuda (Allsheng, China) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Annexin V Analizi

Annexin V testi hücrelerin canlı, erken ve geç apoptotik ve nekrotik yüzdelerini ve konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Testin prensibi, annexin boyasının apoptotik hücrelerin yüzeyi üzerindeki fosfatidilserine (PS) bağlandıktan sonra floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlendiğinde akış sitometrisi yöntemi ile erken apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Geç apoptotik

evrede ise hücre membranının bütünlüğü bozulduğu için, Annexin V-FITC boyası membrana bağlanarak yeşil floresan verirken, propidyum iyodür (PI) boyası hücre içine girerek kırmızı floresans vermektedir. Nekrotik hücreler ise sadece PI ile boyanmaktadır.

Annexin V, PS karşı yüksek afiniteye sahip kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı bir proteindir. Canlı hücrelerde PS, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunur. Hücrelerde apoptoz meydana geldiğinde membran bütünlüğü bozulur ve PS molekülleri Annexin V'nin kolayca bağlanabildiği hücre zarının dış yüzeyine taşınır. Apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla, 6 kuyulu hücre kültürü plakalarının her kuyusuna 1×10^5 PC-3 hücresi ekilmiştir. Hücreler 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. WST-1 analizi verileri sonucuna göre uygun olan 20 µM ve 40 µM rutaekarpin maddesi hücrelere uygulanarak 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler tripsin ile pasajlanmış ve PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında süpernatant atılmış ve pellet PBS ile süspanse edilmiştir. Süspanse hücrelerin her bir tüpüne 100 µL Muse Annexin V & Dead Cell Assay kiti Annexin V boyası eklenmiştir. Boyanan hücreler 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir tüp Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edilmiş ve canlı/ölü hücre yüzdeleri belirlenmiştir.

Tablo 2. Annexin V-FITC ve PI İle Boyanan Hücrelerin Özellikleri

Hücrelerin Özellikleri	Annexin V-FITC	PI
Canlı Hücre	-	-
Erken Apoptotik Dönem	+	-
Geç Apoptotik Dönem	+	+
Nekrotik Hücre	-	+

3.2.4. Akridin Oranj Boyama

Akridin oranj (AO), çift zincirli DNA'ya bağlandığında yeşil floresan ışımaya yayan bir hücre-geçirgen nükleik asit bağlayıcı boyadır. Bu özellik AO boyasını hücre çalışmaları için yararlı kılmaktadır. Boyama protokolü uygulandıktan sonra hücrelerin morfolojik analizi floresan mikroskop ile gerçekleştirilebilmektedir(73). Rutaekarpinin PC-3 hücrelerinde morfolojik bir değişime neden olup olmadığının incelenmesi için AO boyaması yapıldı. Hücreler flasklardan tripsin ile kaldırılarak sayıldı ve 6 kuyulu hücre kültürü plakalarına kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Sonrasında, hücrelere 48 saat süre ile rutaekarpinin WST-1 analiziyle belirlenen etkin konsantrasyonları olan 20 ve 40 μM dozları uygulandı. 48 saat inkübasyonun ardından her bir kuyuya 1 mL %4 paraformaldehit eklenerek 30 dakika çalkalayıcıda hücrelerin fiksasyonu sağlandı. Fiksasyon gerçekleştirildikten sonra paraformaldehit uzaklaştırıldı ve her bir kuyu PBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca çalkalayıcıda yıkandı. Yıkama bittikten sonra her bir kuyuya 1 mL AO (100 mg/ml) boyası yavaşça ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda kuyular 3'er kez 5 dakika çalkalayıcıda PBS ile yıkandı. Boyama işlemi tamamlanan hücreler EVOS Hücre Görüntüleme Sisteminde (Thermo Fisher Scientific, ABD) görüntülendi.

3.2.5. Kaspaz-3 ELISA Analizi

Metastatik prostat kanseri PC-3 hücrelerine rutaekarpin uygulanması ile, apoptoza ilişkin bir marker olan kaspaz-3 miktarındaki değişimin incelenmesi için Caspase 3 Human Instant Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA)TM Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Kitin prensibi; sandviç ELISA metodu ile birbiriyle eşleşen bir antikor çifti arasında bağlanan hedef proteinin miktarının ölçülmesine dayanmaktadır.

Kaspaz-3 ölçümü analizi için, 6 kuyulu hücre kültürü plakalarının her bir kuyusuna 1×10^6 hücre ekildi ve 48 saat boyunca rutaekarpinin 20 ve 40 μM dozları ile inkübe edildi. Inkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler bir kez PBS ile yıkandı. Her bir kuyudaki hücreler scraper ile toplanarak ayrı ependorf tüplere alındı ve tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen hücre pelletinin üzerine kit içerisinde mevcut olan 1X lizis tamponundan 1 mL eklendi ve 60 dakika

Çalkalayıcıda hücrelerin lizisi sağlandı. Sonrasında uygun kit protokolüne göre, her bir lizat kuyulara eklenerek ELISA okuyucu cihazında (Allsheng, Çin) 450 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz çalışmaları için GraphPad Prism 6.0 programından yararlanılarak, elde edilen verilerde gruplar arası farklılıklar One Way ANOVA (Tukey) analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar arasından $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

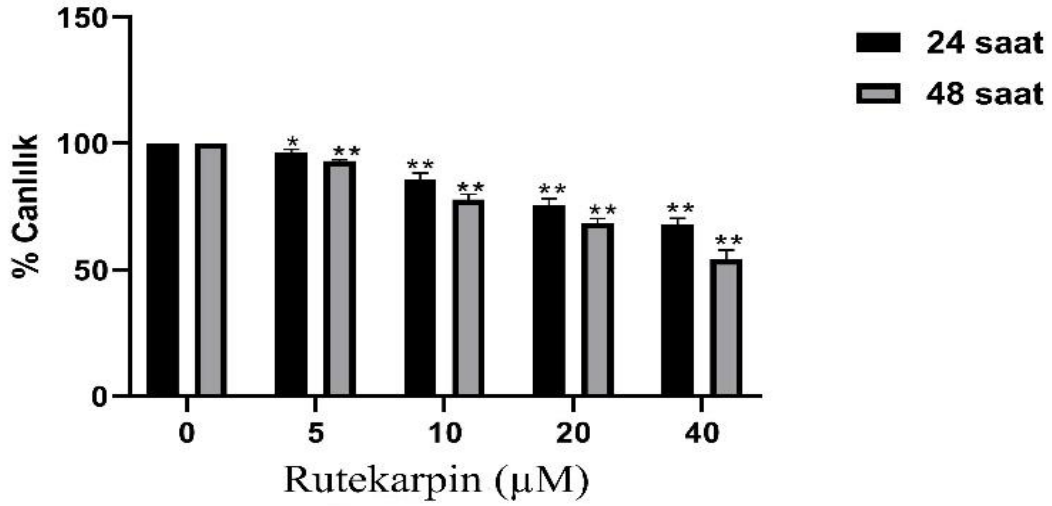
4.1. Rutaekarpinin Metastatik Prostat Kanserinde Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında *Evodia rutaecarpa* bitkisinde bulunan bir alkaloid ve aynı zamanda COX-2 inhibitörü olan rutaekarpinin metastatik prostat kanseri üzerine olan etkileri analiz edilmiştir. Rutaekarpinin PC-3 metastatik prostat kanseri hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi WST-1 canlılık analizi ile belirlenmiş ve analiz sonuçları Şekil 6 ve Tablo 2’de verilmiştir. Rutaekarpinin farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 20 ve 40 μ M) PC-3 hücrelerine 24 ve 48 saat muamelesi sonrası canlılık yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hücrelerde canlılık oranının artan doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 6, $p<0.01$, $p<0.05$). 24 saat boyunca 5, 10, 20 ve 40 μ M rutaekarpin uygulanan PC-3 hücrelerinde canlılık oranı sırası ile $\%96.43\pm0.65$, $\%85.86\pm1.83$, $\%75.70\pm0.51$ ve $\%67.96\pm0.92$ olarak hesaplanmıştır ($p<0.05$)(Şekil 6, Tablo 2). Ayrıca 48 saat boyunca 5, 10, 20 ve 40 μ M rutaekarpin uygulanan hücrelerde canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla $\%93.06\pm1.41$, $\%77.83\pm0.56$, $\%68.56\pm0.23$ ve $\%54.23\pm1.47$ ’ye azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$)(Şekil 7, Tablo 2).

Tablo 3. Rutaekarpinin Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılığı Üzerine Olan Sitotoksikite Sonuçları

	PC-3	
Konsantrasyon (μ M)	24 saat	48 saat
Kontrol	%100	%100
5	%96.43	%93.06
10	%85.86	%77.83
20	%75.70	%68.56
40	%67.96	%54.23

Bu verilerden elde edilen sonuçlara göre, PC-3 hücrelerine 48 saat boyunca 20 ve 40 μM rutaekarpin uygulamasının en etkin şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlendiği için Annexin V analizi, AO boyaması ve ELİSA analizinde hücelere 20 ve 40 μM rutaekarpin muamelesinin 48 saat boyunca uygulanması gerçekleştirilmiştir.

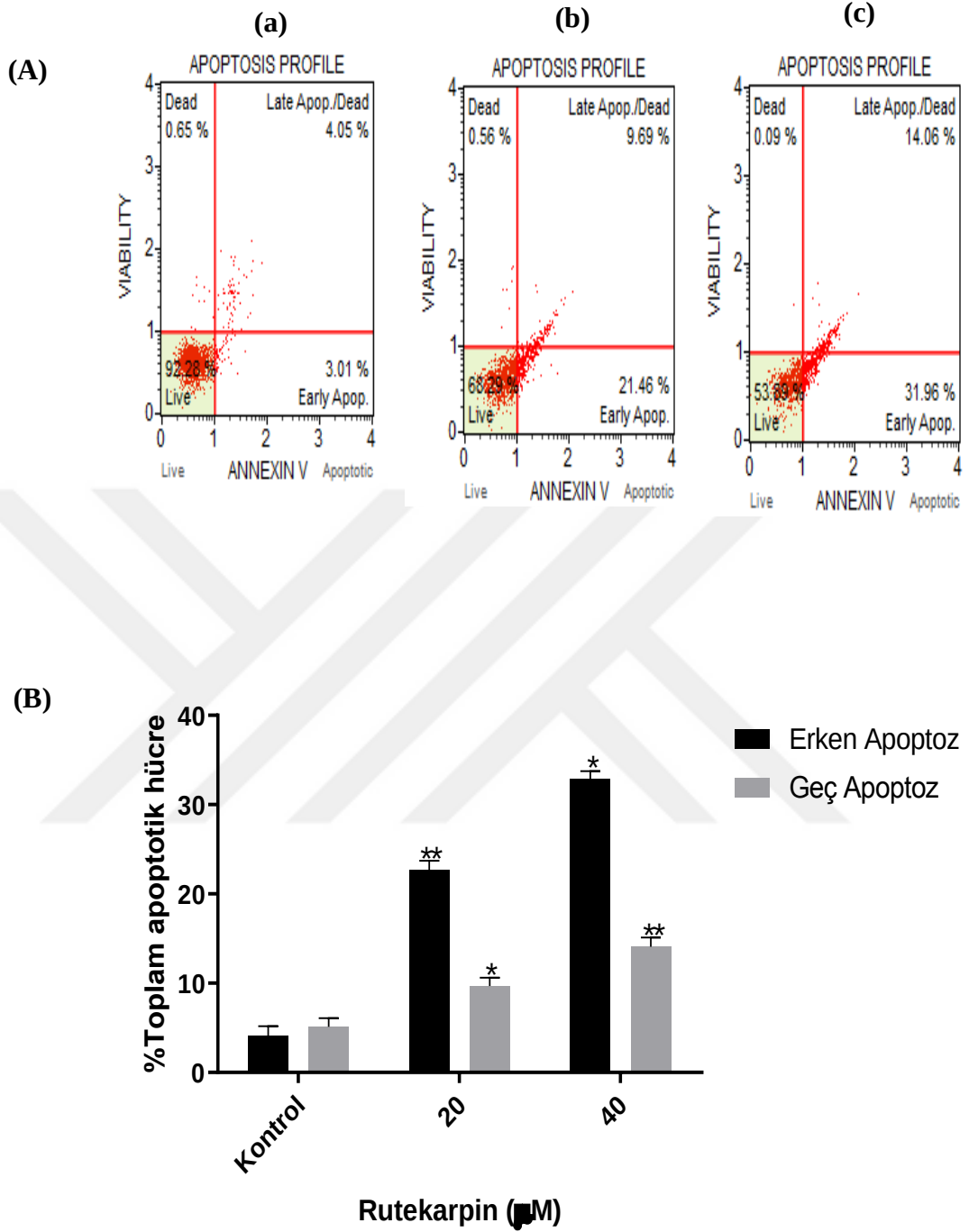


Şekil 7. Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi. PC-3 Hücreleri Üzerine Rutaekarpinin Farklı Konsantrasyonlarının (5, 10, 20 ve 40 μM) 24 ve 48 Saat Muamelesi Sonrası Canlılık Yüzdelерinin Kontrol Grubu İle Karşılaştırılması (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4.2. Rutaekarpinin Metastatik Prostat Kanseriinde Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

Rutaekarpinin PC-3 metastatik prostat kanseri hücre hattı üzerine olan apoptotik etkisi Annexin V analizi ile belirlenmiş ve analiz sonuçları Şekil 7’de sunulmuştur.

Rutaekarpinin PC-3 hücrelerindeki apoptotik etkisi incelendiğinde, 48 saat muamele sonunda artan doza bağlı olarak özellikle erken apoptotik hücre sayısını anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir ($p<0.01$, Şekil 8A). PC-3 hücrelerinde rutaekarpinin kontrol grubunda toplam apoptotik hücre yüzdesi 7.25 ± 0.62 iken, 20 μM rutaekarpin uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla 21.496 ± 0.87 ve 9.69 ± 0.46 olarak tespit edilmiş ve 40 μM rutaekarpin uygulandığında ise bu oranların sırasıyla 31.96 ± 1.65 ve 14.06 ± 1.54 ’e yükseldiği gösterilmiştir (Şekil 8B, $p<0.01$).

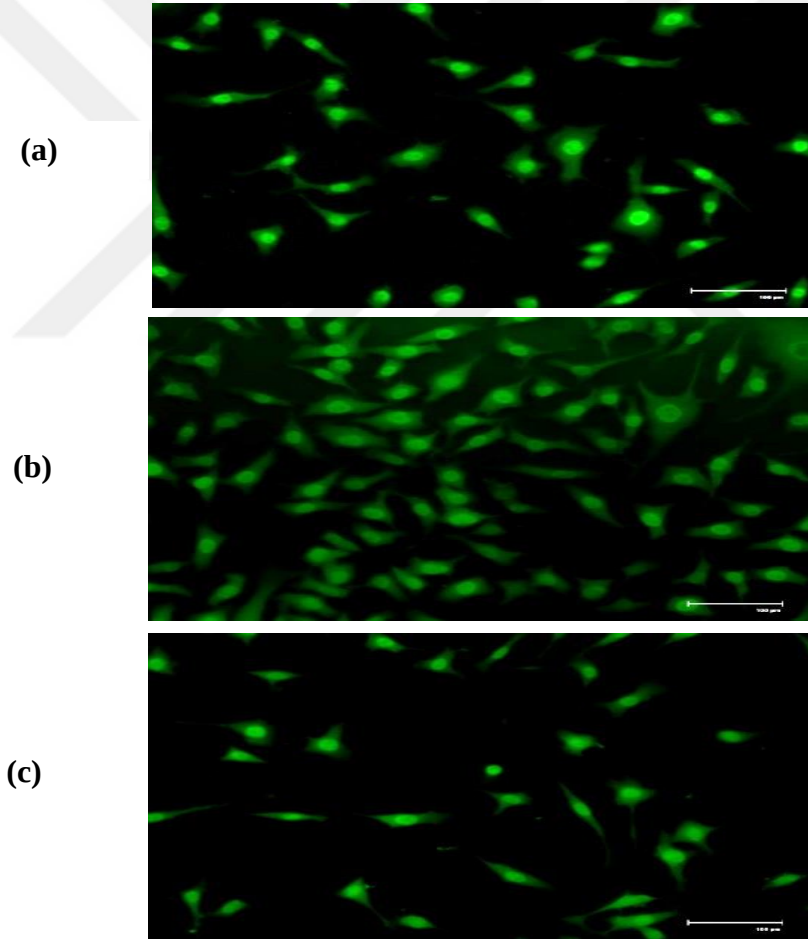


Şekil 8. Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi. **(A)** (a) Kontrol, (b) 20 μ M ve (c) 40 μ M Rutaekarpin Uygulanan PC-3 Hücrelerinde 48 Saat Sonraki Apoptotik Etki, **(B)** Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerinde Erken ve Geç Apoptotik Hücre Yüzdesi Kontrol Grubu İle Karşılaştırılarak İstatistiksel Olarak Analizi (* p <0.05, ** p <0.01).

Sonuç olarak, rutaekarpinin metastatik prostat kanseri hücrelerinde özellikle erken apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Rutaekarpinin Metastatik Prostat Kanseri Hücre Morfolojisi Üzerine Neden Olduğu Değişikliklerin Görüntülenmesi

Rutaekarpinin PC-3 metastatik prostat kanseri hücre morfolojisi üzerine olan etkisi AO boyama ile değerlendirilmiş ve analiz sonuçları Şekil 9’da verilmiştir. 48 saat boyunca 20 ve 40 μ M rutaekarpin ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin genel morfolojik yapısının bozulduğu, hücre ve sitoplazma oranının azaldığı ve DNA fragmentasyonuna neden olduğu gözlenmiştir.

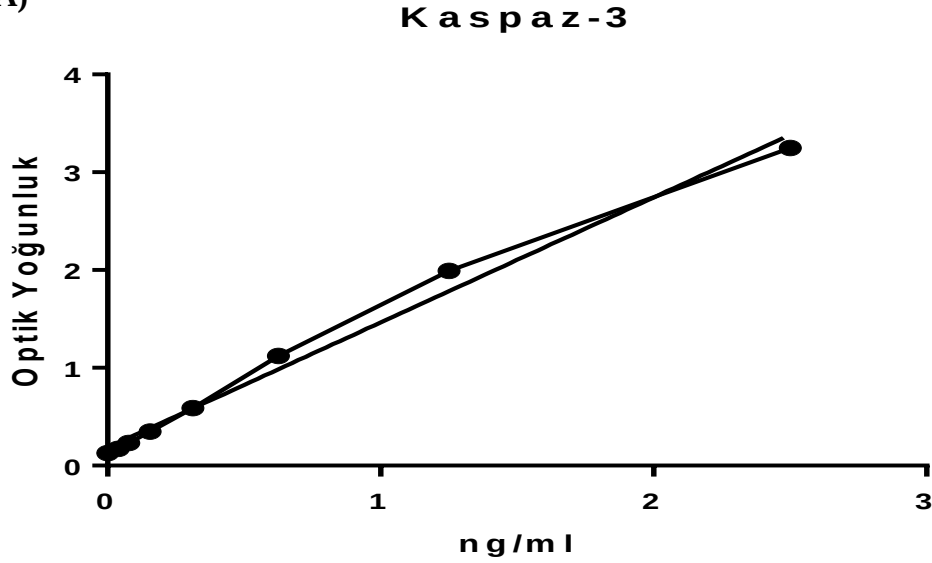


Şekil 9. Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Morfolojik Etkisinin Akridin Oranj Boyaması İle Görüntülenmesi. (a) Kontrol, (b) 20 μ M ve (c) 40 μ M Rutaekarpin Uygulanan PC-3 Hücrelerinde 48 Saat Sonraki Morfolojik Değişimler.

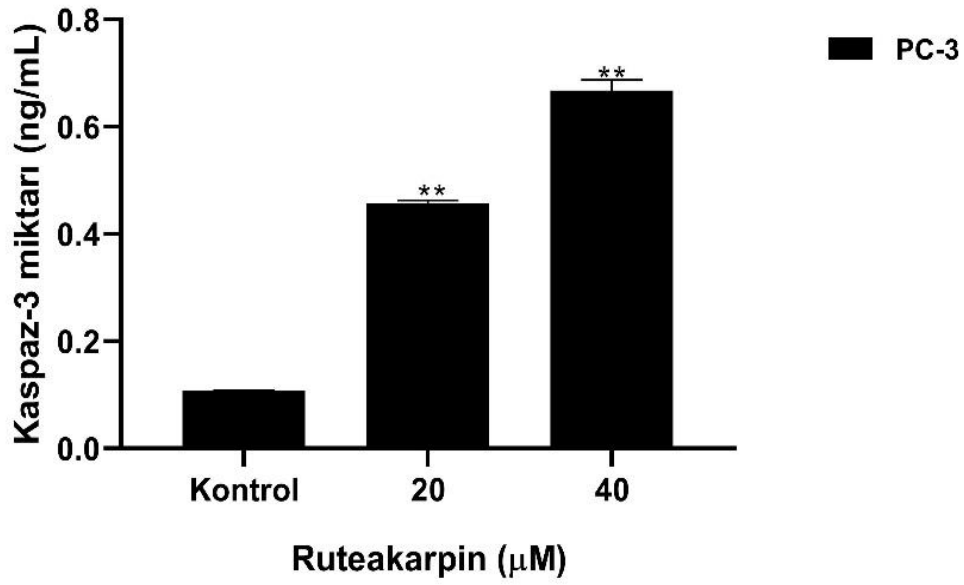
4.4. Rutaekarpinin Metastatik Prostat Kanserinde Kaspaz-3 Miktarı Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Rutaekarpinin PC-3 metastatik prostat kanseri hücrelerindeki apoptotik sürecin bir göstergesi olan aktif kaspaz-3 proteini (cleaved caspase 3) üzerine etkisi ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz için öncelikle oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 9A'da gösterilmiştir. Hücrelere 48 saat 20 ve 40 μ M rutaekarpin uygulaması ile elde edilen kaspaz-3 protein miktarına ilişkin veriler Şekil 9B'de gösterilmiştir. Rutaekarpin uygulanan PC-3 hücre hattında kaspaz-3 protein seviyesi kontrole göre artış göstermiş olup, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 9B, $p < 0.01$). PC-3 hücrelerinde kontrol grubunda kaspaz-3 protein miktarı 0.105 ng/ml iken; 20 ve 40 μ M rutaekarpin dozları uygulandığında sırasıyla 0.461 ve 0.651 ng/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 10B, $p < 0.01$).

(A)



(B)



Şekil 10. Rutaekarpinin PC-3 Hücrelerindeki Kaspaz-3 Miktarı Üzerine Olan Etkisi. PC-3 Hücreleri Üzerine Rutaekarpinin Farklı Konsantrasyonlarının (20 ve 40 µM) 48 Saat Muamelesi Sonrası Oluşturulan (A) Standart Eğri Kullanılarak (B) Kaspaz-3 Miktarının Kontrol Grubu İle Karşılaştırılarak İstatistiksel Olarak Analizi (*p<0.05, **p<0.01)

Elde edilen sonuçlara göre, rutaekarpinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak PC-3 hücrelerinde aktif kaspaz-3 miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prostat kanseri ülkemizde ve dünyada insidansı giderek artan halk sağlığını tehdit eden önemli sağlık problemlerinden birisidir (2). Hastalığın tanı, tedavi ve izlem sürecinde tümörün TNM evresi, gleason skoru ve serum PSA değerlerine göre risk grupları belirlenmektedir(5). Tedavi ise cerrahi (radikal prostatektomi), radyoterapi (RT) ve hormonal tedavi (HT) yaklaşımlarının risk grubuna göre tek ya da kombine kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (6, 7).

Prostat kanserinde tümör evresi fark etmeksizin lenf ve organ metastazı varlığı tümörü metastatik prostat kanseri grubuna sokmaktadır. Metastazlar, prostat kanseri olan erkeklerde önemli bir komplikasyon sonucu ölüm nedenidir ve tedavi başarısını büyük ölçüde etkilemektedir (1). Metastatik prostat kanseri; daha önce ADT almış (kastrasyona dirençli) ya da almamış (HT duyarlı) olarak ikiye ayrılmaktadır. İki alt tür içinde farklı tedavi algoritmaları planlanmaktadır. Ancak metastatik prostat kanseri tedavisinde konvansiyonel yöntemler diğer kanserlerde olduğu kadar başarılı olamamaktadır (6-8). Bu nedenle metastatik prostat kanseri hastalarında daha etkin yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Ruteakarpin, antienflamatuvar, antiobezite ve antitümör (10-14) olmak üzere farklı biyolojik etkilere sahip bir alkaloiddir (52) Prostat kanserinde ruteakarpinin yapısal bir analogu olan evodiaminin, G₂-M fazında hücre döngüsünü engellediği ve apoptoz indüksiyonu yoluyla prostat kanseri hücre hatlarının büyümesini de engellendiği bildirilmiştir (19). Ruteakarpinin doza bağlı olarak farelerde G₀-G₁ fazında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu bilinmektedir (55). Bu nedenle prostat kanseri hücre hattında her iki bileşiğinde sitotoksik etkileri olduğu belirlenmiştir (56).

Ming ve ark.(74), kolon kanseri (HT-29), meme kanseri (MCF-7), karaciğer kanseri (HepG2) hücre hatlarında ruteakarpinin ve diğer *Evodia* meyvelerinden izole edilen bileşiklerin topoizomerez I ve II üzerine inhibisyon etkileri ve sitotoksik etkileri(IC₅₀) incelenmiştir. Çalışma sonucunda kolon, meme ve karaciğer hücre hattında sırasıyla 42, 18, >100 µM dozunda rutaekarpin uygulanmasının sitotoksik etki(IC₅₀) gösterdiğini ancak 20 ve 100 µM dozunda rutaekarpin uygulanmasının topoizomerez I üzerinde etkili olmadığını sadece 100 µM dozunda ruteakarpinin topoizomerez II yi %3 inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kim ve ark.(75) ise 100 µM

dozunda rutaekarpin uygulanmasının topoizomeras I ve II aktivitesini zayıf bir şekilde inhibe ettiğini ancak rutaekarpin analogu olan 10-bromorutaecarpin ve 3-Klororutakarpin uygulanmasının hem 20 hem de 100 μ M dozunda güçlü bir şekilde inhibe ettiğini (%39-84) ifade etmişlerdir. Rutaekarpin ve türevlerinin HELA hücreleri üzerine etkin dozunun incelendiği bir başka çalışmada da ise rutaekarpin 26.1 ± 6.1 μ M, 3-klororutakarpinin ise 7,2 μ M dozunda EC_{50} ye ulaştığı saptanmıştır (76). Yang ve ark. (77), ruteakarpinin halka yapısında değişiklikler yaparak farklı rutaekarpin analogları sentezlemişler ve kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. 11-Metoksiruteakarpin akciğer ve renal kanseri üzerinde seçici sitotoksikite gösterirken, 10,11-metilendioksi analogunun ise over kanserinde seçici sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Nie ve ark.(56) ise, rutaekarpin ve türevlerinin çalışmamızda kullandığımız PC-3 hücre hattı üzerinde etkin dozlarını MTT analiziyle araştırdıkları çalışmalarında IC_{50} dozunun ruteakarpinin biyokimyasal yapısına göre 12-100 μ M arasında değişiklik gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise, rutaekarpinin PC-3 hücrelerinde potansiyel sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile araştırılmıştır. 24 ve 48 saat boyunca 5, 10, 20 ve 40 μ M rutaekarpin uygulanan PC-3 hücrelerinde uygulanan doz ve süre arttıkça canlılık oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. 48 saat boyunca 20 ve 40 μ M rutaekarpin uygulanan hücrelerde canlılık oranı sırasıyla 68.56 ± 0.23 ve 54.23 ± 1.47 olarak belirlenmiştir.

Sonuçlarımız ile literatürde etkin dozlar arasında bazı farklar bulunmaktadır. Bu farkın çalışmada kullanılan hücre hattının tipinin özelliklerinden, ruteakarpinin türevlerinin biyokimyasal yapısından ve bitkisel kökenli izolasyon ile elde edilmesinden ve ilaç uygulama sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünüyoruz.

Ching ve ark.(78), evodiamin ve rutaekarpinin SKOV3 over kanseri hücre hattında sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemişlerdir. İki maddenin de MTT analizinde doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada hem evodiamin hem de ruteakarpinin anneksin V testi kullanılarak 48 ve 72 saate SKOV3 hücre büyümesini inhibe ederek, hücre apoptozunu indüklediğini ifade etmişlerdir. Zhang ve ark.(79) ise gastrik kanser SGC-7901 hücre hattı üzerinde

ruteakarpinin hem MTT analizi ile sitotoksik etki yaptığını hemde kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu güçlü bir şekilde indüklediğini göstermiştir.

Ruteakarpinin antitümör etkisinin yanında serabral iskemi reperfüzyonda neoprotektif etkisi (80), miyokardiyal hücre hattı H9c2'de hipoksi-reoksijenasyon (H-R) hasarına karşı NADPH oksidaz - ROS yolağının inhibisyonuna bağlı antiapoptotik etkisi olduğu (81), insan hepatom (Hepa-1c1c7) hücrelerinde hidrojen peroksite bağlı DNA hasarını önlediği de (82) ifade edilmiştir. Bu çalışmalar tümör dışı dokularda ruteakarpinin protektif etkisinin de olabileceğini göstermektedir. Yine Park ve ark. (83) insan benign prostat hiperplazi epitel hücre hattı (BPH-1) üzerine E. rutaecarpa (rutaevin, evodiamin, rutaecarpine içeren) nın alkol ekstresini (EEER) hazırlayarak 24 ve 48 saat boyunca uyguladıkları çalışmalarında prostat tümör dışı dokuda apoptotik etki de gösterebileceğini ifade etmişlerdir.

Liao ve ark (20) insan prostat epitel hücre hattı (WPMY-1); androjen reseptörü (AR) pozitif (LNCaP, C4-2 ve 22Rv1); ve AR-negatif prostat kanseri hücre hatlarında (PC3 ve DU145) 0-20 μ M dozlarında rutaekarpin AR pozitif hücre hatlarında canlılığı azalttığı, normal prostat ve AR negatif hücre hatlarının ise 0 -20 μ M konsantrasyonda tedaviye duyarlı olmadığını saptamışlardır. Aynı çalışma kapsamında AR pozitif hücrelerle (22Rv1) farelerde oluşturdukları ksenograft tümör dokusunda intraperitoneal rutaekarpin tedavisinin tümör boyutları ve tümör ağırlıklarını önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır. Ayrıca antiandrojen tedaviye rağmen AR anormal aktivasyon gösteren prostat kanseri hastalarında androjen duyarlılığını arttırdığı için kombine tedavide ümit verici olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda PC-3 hücrelerinde rutaekarpinin apoptotik etkisi Annexin V ile incelendiğinde, kontrol grubunda toplam apoptotik hücre yüzdesi 7.25 ± 0.62 iken, 20 μ M rutaekarpin uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla 21.49 ± 0.87 ve 9.69 ± 0.46 olarak tespit edilmiş ve 40 μ M rutaekarpin uygulandığında ise bu oranların sırasıyla 31.96 ± 1.65 ve 14.06 ± 1.54 'e arttığı saptanmıştır. Apoptozu saptamak için kaspaz-3 protein miktarına ELİSA ile bakıldığında ise rutaekarpin uygulanan PC-3 hücre hattında kaspaz-3 protein seviyesi kontrol grubunda 0.105 ng/ml iken; 20 ve 40 μ M rutaekarpin dozları uygulandığında sırasıyla 0.461 ve 0.651 ng/ml olarak belirlenmiştir kontrole göre anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlarımız ruteakarpinin farklı tümör hücrelerinde

apoptotik etkisi konusunda daha önce yapılan çalışmaları (78, 79) desteklemektedir. Ancak Liao ve ark. (20) tarafından 0-20 μ M doz aralığında rutaekarpinin PC-3 hücrelerinde antiproliferatif etkisinin sınırlı olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında 40 μ M rutaekarpinin de hücrelerde etkisi analiz edilmiş ve kontrol gurubuna göre canlılık oranında anlamlı azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PC-3 hücrelerinde rutaekarpinin apoptotik etkisi artan kaspaz 3 düzeyi ve hücre morfolojisinde apoptotik morfolojik değişimlerle de desteklenmiştir. Bu nedenle rutaekarpinin PC-3 metastatik prostat kanseri hücrelerinde hem sitotoksik hemde apoptotik etkiye neden olduğu belirlenmiştir.

Ancak, bu çalışmada rutaekarpinin hücrelerde neden olduğu apoptotik ölümün moleküler mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir. Ayrıca, kanser hücreleri ile karşılaştırmalı olarak sağlıklı ve hiperplazik prostat hücrelerinde rutaekarpinin etkisinin araştırılmasıyla metastatik prostat kanseri tedavisinde hormonal tedaviye destek ve kombin yeni tedavilere öncü olabileceğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak, çalışmamızda rutaekarpinin PC 3 hücrelerinde in vitro olarak sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Sonuçlarımızın in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz. İn vivo çalışmalar sonucunda antitümör etkinin saptanması durumunda tek ya da rutin kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımının tedaviyi destekleyeceğini öngörüyoruz. Ayrıca PC-3 hücrelerinde rutaekarpin ve türevlerinin etkisinin hem sağlıklı hem de kanser hücreleri üzerine değişen doz ve sürelerde uygulamayla daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

KAYNAKÇA

1. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide treatment and metastasis-free survival in prostate cancer. 2018;378(15):1408-18.
2. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid A. The risk factors of prostate cancer and its prevention: a literature review. 2016;48(3):228-38.
3. Zorlu F. Türkiye’de Prostat Kanseri İnsidansı: Epidemiyolojik bir Çalışma (PROSTATTURK). (Erişim Tarihi:11.09.2020)
4. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yillığı 2010 Ankara.
5. Akdemir E. Prostat Kanseri Hastalarda Primer Evrelemede Ve Nüks Hastalığın Saptanmasında 68ga-Psma Pet-Bt’nin Yeri. 2017.
6. Asa S. Prostat Kanseri Metastazların Saptanmasında PET/BT ile PET/MR’ın Kıyaslanması. 2019;5(1):20-3.
7. Önerileri KY, Başaran M, Bavbek S, Çal Ç, İğdem Ş, Özen H, et al. Prostat Kanseri Yol Haritası: Uluslararası Kılavuzlar ve Klinik Deneyimler Işığında Prostat.
8. James N, Mason M. Docetaxel and/or zoledronic acid for hormone-naïve prostate cancer: first survival results from STAMPEDE. 2015;33(33):5001.
9. Lee SH, Son J-K, Jeong BS, Jeong T-C, Chang HW, Lee E-S, et al. Progress in the studies on rutaecarpine. 2008;13(2):272-300.
10. Jiang J, Hu C. Evodiamine: a novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa*. 2009;14(5):1852-9.
11. Liu Y-N, Pan S-L, Liao C-H, Huang D-Y, Guh J-H, Peng C-Y, et al. Evodiamine represses hypoxia-induced inflammatory proteins expression and hypoxia-inducible factor 1 α accumulation in RAW264. 7. 2009;32(3):263-9.
12. Pešek T. Design and synthesis of rutaecarpine analogs as potential cytotoxic agents for cancer chemotherapy treatment. 2015.
13. Wang T, Wang Y, Kontani Y, Kobayashi Y, Sato Y, Mori N, et al. Evodiamine improves diet-induced obesity in a uncoupling protein-1-independent manner: involvement of antiadipogenic mechanism and extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. 2008;149(1):358-66.

14. Yan L, Li QF, Rong YT, Chen YH, Huang ZH, Wang ZZ, et al. The protective effects of rutaecarpine on acute pancreatitis. 2018;15(3):3121-6.
15. Moon T, Murakami M, Kudo I, Son K, Kim H, Kang S, et al. A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa*. 1999;48(12):621-5.
16. Destek S, Gül Vo, Kapran Y, Balik E, Buğra D, Akyüz A. Mide Kanseri Gelişiminde Duodenogastrik Reflünün Rolü: Siklooksijenaz-2 İnhibitörlerinin ve Balın Önleyici Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması. 2019;24(1).
17. Regulski M, Regulska K, Prukala W, Piotrowska H, Stanisiz B, Murias M. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. 2016;21(4):598-615.
18. Tüzün A. Cyclooxygenase-2 ve Karsinogenez.
19. Kan SF, Huang WJ, Lin LC, Wang PS. Inhibitory effects of evodiamine on the growth of human prostate cancer cell line LNCaP. 2004;110(5):641-51.
20. Liao Y, Liu Y, Xia X, Shao Z, Huang C, He J, et al. Targeting GRP78-dependent AR-V7 protein degradation overcomes castration-resistance in prostate cancer therapy. 2020;10(8):3366.
21. McNeal J. The zonal anatomy of the prostate. 1981;2(1):35-49.
22. Fine SW, Reuter V. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. 2012;60(1):142-52.
23. http://www.aboutcancer.com/prostate_anatomy.htm (Erişim Tarihi: 11.09.2020)
24. Dülgeroğlu Y. Prostat kanseri, benign prostat hiperplazisi ve kronik prostatitli hastalarda bazı mikrorna'ların dolaşımdaki düzeylerinin araştırılması: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; 2019.
25. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Prostate cancer—major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. 2017;67(3):245-53.
26. Rawla P. Epidemiology of prostate cancer. 2019;10(2):63.
27. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2018;68(6):394-424.

28. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004;101(10 Suppl):2371-490.
29. Bashir M. Epidemiology of prostate cancer. 2015;16(13):5137-41.
30. Kheirandish P, Chinegwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *British journal of cancer*. 2011;105(4):481-5.
31. Yang M, Kenfield SA, Van Blarigan EL, Batista JL, Sesso HD, Ma J, et al. Dietary patterns after prostate cancer diagnosis in relation to disease-specific and total mortality. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2015;8(6):545-51.
32. Pacheco SO, Pacheco FJ, Zapata GM, Garcia JM, Previale CA, Cura HE, et al. Food habits, lifestyle factors, and risk of prostate cancer in Central Argentina: a case control study involving self-motivated health behavior modifications after diagnosis. 2016;8(7):419.
33. Açıkgöz A, Çımrın D, Ergör G. Meme, prostat, kolorektal ve akciğer kanserlerinde çevresel risk faktörleri ve risk düzeylerinin belirlenmesi: olgu-kontrol çalışması. 2018;43(2):411-21.
34. Lane JA, Oliver SE, Appleby PN, Lentjes MA, Emmett P, Kuh D, et al. Prostate cancer risk related to foods, food groups, macronutrients and micronutrients derived from the UK Dietary Cohort Consortium food diaries. 2017;71(2):274-83.
35. Friedenreich CM, Wang Q, Neilson HK, Kopciuk KA, McGregor SE, Courneya KS. Physical Activity and Survival After Prostate Cancer. *European urology*. 2016;70(4):576-85.
36. Sigurdardottir LG, Markt SC, Rider JR, Haneuse S, Fall K, Schernhammer ES, et al. Urinary melatonin levels, sleep disruption, and risk of prostate cancer in elderly men. *European urology*. 2015;67(2):191-4.
37. Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S, et al. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. 2010;28(21):3457-62.
38. Jones RR, Barone-Adesi F, Koutros S, Lerro CC, Blair A, Lubin J, et al. Incidence of solid tumours among pesticide applicators exposed to the organophosphate insecticide diazinon in the Agricultural Health Study: an updated analysis. 2015;72(7):496-503.
39. Bayraktar N, Aydın N. Prostat Tümörlerinde Cerrahi ve Bakım. 2018;4(2):123-8.

40. Okotie OT, Roehl KA, Han M, Loeb S, Gashti SN, Catalona W. Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. 2007;70(6):1117-20.
41. Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, Schröder F. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. 2008;54(3):581-8.
42. Richman EL, Kenfield SA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Chan J. Egg, red meat, and poultry intake and risk of lethal prostate cancer in the prostate-specific antigen-era: incidence and survival. 2011;4(12):2110-21.
43. Kelloff GJ, Choyke P, Coffey D. Challenges in clinical prostate cancer: role of imaging. 2009;192(6):1455-70.
44. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein J. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. 2013;111(5):753-60.
45. Epstein JI, Allsbrook WCJ, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. 2005;29(9):1228-42.
46. Karaarslan E. Prostat Kanseri Evrelemesi. 2017.
47. Bhagirath D, Yang TL, Dahiya R, Saini S. MicroRNAs as regulators of prostate cancer metastasis. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*: Springer; 2018. p. 83-100.
48. Carroll PR, Parsons JK, Andriole G, Bahnson RR, Barocas DA, Catalona WJ, et al. Prostate cancer early detection, version 1.2014. Featured updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2014;12(9):1211-9; quiz 9.
49. Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2015;26 Suppl 5:v69-77.
50. Lowrance WT, Murad MH, Oh WK, Jarrard DF, Resnick MJ, Cookson MS. Castration-Resistant Prostate Cancer: AUA Guideline Amendment 2018. *The Journal of urology*. 2018;200(6):1264-72.

51. Mottet N, Bastian P, Bellmunt J, van den Bergh R, Bolla M, van Casteren N, et al. P: European Association of Urology. Guidelines on prostate cancer. 2016.
52. Guo H, Liu D, Gao B, Zhang X, You M, Ren H, et al. Antiproliferative activity and cellular uptake of evodiamine and rutaecarpine based on 3D tumor models. 2016;21(7):954.
53. Hirayama N, Fujii I, Kobayashi YJ. Molecular structures of two indole alkaloids, evodiamine and rutecarpine, from evodia fruit. 2000;215(12):762-5.
54. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. 2016;8:93.
55. Jeon TW, Jin CH, Lee SK, Jun IH, Kim GH, Lee DJ, et al. Immunosuppressive effects of rutaecarpine in female BALB/c mice. 2006;164(2):155-66.
56. Nie L-F, Wang S-S, Cao J-G, Liu F-Z, Xiamuxi H, Aisa HA, et al. Straightforward synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation of hybrids of natural alkaloid evodiamine/rutaecarpine and thieno [2, 3-d] pyrimidinones. 2020;22(1):69-82.
57. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. 2014;2014.
58. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. 2012;4(5):330.
59. Lopez J, Tait SJ. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. 2015;112(6):957-62.
60. Fulda S.. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. 2010;2010.
61. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis T. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. 2010;11(3):220-8.
62. Plati J, Bucur O, Khosravi- Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. 2008;104(4):1124-49.
63. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000;21(3):485-95.
64. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. 1998;12(11):1551-70.
65. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. 1998;281(5381):1312-6.

66. Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. 2019;37(3):459-75.
67. Xu W, Jing L, Wang Q, Lin C-C, Chen X, Diao J, et al. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. 2015;6(30):30017.
68. Lomonosova E, Chinnadurai GJO. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. 2008;27(1):S2-S19.
69. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. 2015;16(6):2129-44.
70. Liu H, Su D, Zhang J, Ge S, Li Y, Wang F, et al. Improvement of pharmacokinetic profile of TRAIL via trimer-tag enhances its antitumor activity in vivo. 2017;7(1):1-11.
71. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. 2018;19(2):448.
72. Petit F, Arnoult D, Viollet L, Estaquier J. Intrinsic and extrinsic pathways signaling during HIV-1 mediated cell death. 2003;85(8):795-811.
73. Liu C-H, Sahoo SL, Tsao M. Acridine orange coated magnetic nanoparticles for nucleus labeling and DNA adsorption. 2014;115:150-6.
74. Xu M-L, Moon D-C, Lee C-S, Woo M-H, Lee ES, Jahng Y, et al. Cytotoxicity and DNA topoisomerase inhibitory activity of constituents isolated from the fruits of *Evodia officinalis*. Archives of Pharmacal Research. 2006;29(7):541-7.
75. Kim SI, Lee SH, Lee E-S, Lee C-S, Jahng Y. New topoisomerases inhibitors: Synthesis of rutaecarpine derivatives and their inhibitory activity against topoisomerases. Archives of Pharmacal Research. 2012;35(5):785-9.
76. Huang G, Drakopoulos A, Saedtler M, Zou H, Meinel L, Heilmann J, et al. Cytotoxic properties of the alkaloid rutaecarpine and its oligocyclic derivatives and chemical modifications to enhance water-solubility. 2017;27(21):4937-41.
77. Yang L-M, Chen C-F, Lee K. Synthesis of rutaecarpine and cytotoxic analogues. 1995;5(5):465-8.
78. Yu C-H, Lin R-C, Wang PS. Anti-Proliferative Effects of Evodiamine and Rutaecarpine on Human Ovarian Cancer Cell Line SKOV3. Biology of Reproduction. 2010;83(Suppl_1):134-5.

79. ZHANG Y-x, GE Y-k. Effect of Rutaecarpine on Cell Cycle and Apoptosis in SGC-7901 Cells. 2013(4):35.
80. Yan C, Zhang J, Wang S, Xue G, Hou Y. Neuroprotective effects of rutaecarpine on cerebral ischemia reperfusion injury. Neural regeneration research. 2013;8(22):2030-8.
81. Bao M-H, Dai W, Li Y-J, Hu C. Rutaecarpine prevents hypoxia–reoxygenation-induced myocardial cell apoptosis via inhibition of NADPH oxidases. 2011;89(3):177-86.
82. Lee SJ, Ahn H, Nam KW, Kim KH, Mar W. Effects of rutaecarpine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in murine hepa-1c1c7 cells. Biomolecules & therapeutics. 2012;20(5):487-91.
83. Park E, Lee M-Y, Seo C-S, Jang J-H, Kim Y-u, Shin H. Ethanol extract of Evodia rutaecarpa attenuates cell growth through Caspase-dependent apoptosis in benign prostatic Hyperplasia-1 cells. 2018;10(4):523.

**Ek. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulun’ndan Etik Kurulu Onayı**



ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Mehmet Abdulkadir Şekeroğlu

2. Doğum Tarihi

3. Unvanı : Eczacı

4. Öğrenim Durumu : Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Eczacılık Fakültesi	İstanbul Medipol Üniversitesi	2011-2016
Y. Lisans	Tıbbi Biyokimya	Sakarya Üniversitesi	2017-2021

5. Akademik Unvanlar

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1. Yüksek Lisans Tezleri

6.2. Doktora Tezleri

7. Yayınlar

7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

7.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

7.3. Yazılan Uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

7.4. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Çokluk, E., Tuncer, F. B., Şekeroğlu, M., Çokluk, S. T., Akdoğan, M., Şekeroğlu, M. A., & Zehra, U. S. T. A. Mezuniyet Öncesi Tıbbi Biyokimya Eğitimine İlişkin Tutum Değerlendirmesi: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Örneği. *Sakarya Tıp Dergisi*, 10(2), 253-263.

7.5. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

