



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KENEVİR BİLEŞENLERİNDEN KANNABİGEROLÜN
DU145 VE PC3 İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDEKİ ANTİ-KANSER ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Hümeysra YILMAZ

KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2024

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KENEVİR BİLEŞENLERİNDEN KANNABİGEROLÜN
DU145 VE PC3 İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ ANTİ-KANSER ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Hümeysra YILMAZ

Danışman: Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2023-2458 nolu proje ile
desteklenmiştir.**

Ankara, 2024

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kenevir Bileşenlerinden Kannabigerolün DU145 Ve PC3 İnsan Prostat Kanseri Hücre
Hatları Üzerindeki Anti-Kanser Etkisi

Hümeyra YILMAZ

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Özen Özensoy GÜLER

Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Prof.Dr. Aslıhan GÜRBÜZ BOLKAN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Esra ÇALIK VAR

Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

31.10.2024

Hümeysra YILMAZ

Canımdan çok sevdiğim vatanıma ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinin tamamlanmasında katkıları olan, desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan birçok değerli insana teşekkürü bir borç bilirim.

Öncelikle, bu tez sürecinde yol göstericiliği ve bana güveni ile her zaman beni motive eden sayın danışman hocam Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, kıymetli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e ve değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Türkiye'de ve Fransa'da üzerimde emeği olan bütün hocalara minnettarım. Türkiye'de akademiye girmemi sağlayan Mustafa Numan BUCAK'a da teşekkürü borç bilirim. Ayrıca doktora sürecim boyunca, beni destekleyen TÜBİTAK kurumuna da teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım hücreleri gönderen Doç.Dr.Fatih KOCABAŞ, Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ ve Öğr.Gör.Dr. Merve KÜRKÇÜ hocalarıma sağladıkları katkılar için müteşekkirim.

Bu süreçte yanımda olan program arkadaşlarım Şerife KILIÇ, Deniz ATAKOL, Seher ŞAHİN, Hacı Ahmet KILIÇ ve Tuğba YALÇINKAYA'ya samimi arkadaşlıkları ve destekleri için teşekkür ederim.

Doktora boyunca bana eşlik eden Rümeysa DOĞAN, Ferhan YAPAR, Selay YEBREM, Merve USLU ve Sümeyye YÜKSEL'e arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Uzaklarda olsalar da mutluluk ve üzüntülerimi her daim paylaşan arkadaşlarım Deniz OMUŞ ve Nisrine GUEZZALE'a minnettarım.

Dahil olmaktan büyük mutluluk duyduğum Dastouri lab. arkadaşlarım Dr.Öğr.Üyesi Yusuf KÜÇÜKBAĞRIÇIK, Fatıma ELMUSA, Rabia ÖZDEMİR ve Mehtap KIZILPINAR'a teşekkür ederim. Engin akademik bilgilerini ve hayat tecrübelerini her daim paylaşan, TÜBİTAK projeleri kapsamında üç yıldır beraber çalıştığım değerli hocam Dr.Öğr.Üyesi. M.Reza DASTOURI'ye desteği ve bana olan güvendiğinden dolayı minnettarım.

Babam, Ömer Faruk SİDAL, bu dünyada olmasa da hep yanımda olduğunu hissettiğim ve benimle gurur duyacağını bildiğim.

Hayat neşesi ve tatlı sohbeti ile her zaman bana güvenini hissettiren ve eğitim hayatıma devam etmem için manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım dayım Hasan KARATAŞ'a teşekkür ederim.

Kardeşim, Bilal SİDAL, her şeyimi paylaştığım en iyi arkadaşım, yeni şeyler keşfetmemi sağladığın ve her daim arkamda olduğun için çok teşekkür ederim, ablasının bir tanesi.

En büyük destekçim, Ümmügülsüm SİDAL, bizleri tek başına büyüten ve büyük fedakârlıklar yapan anneme teşekkür ederim. Annem, senin sevgin ve desteğin olmasaydı, bu noktaya gelmem mümkün olmazdı.

Doktora sürecimi güzelleştiren ve kolaylaştıran, her zaman yanımda olan ve her yaptığım işle gurur duyan sevgili eşim Mustafa YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsın birtanem, tüm desteğin ve sevgin için minnettarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Sonsuz Proliferasyon.....	3
2.1.2. Ölümden Kaçış	4
2.1.3. Son Vuruş: Metastaz.....	7
2.1.4. Kanser Epidemiyolojisi	9
2.2. Prostat Kanseri	10
2.2.1. Prostat Anatomisi ve Biyolojisi.....	10
2.2.2. Prostat Kanseri Oluşumu.....	12
2.2.3. Prostat Kanserinin Risk Faktörleri	13
2.2.4. Prostat Kanseri Teşhisi ve Evreleri	14
2.2.5. Prostat Kanserinde Kullanılan Tedaviler.....	16
2.3. Kenevir	20
2.3.1. Kenevir Bitkisi	20
2.3.2. Tarihte Kenevirin Kullanım Alanları.....	21
2.4. Kannabinoitler ve Endokannabinoit Sistem	23
2.4.1. Endokannabinoit Sistem.....	24
2.4.2. Fitokannabinoitler	30
2.5. CBG.....	33
2.5.1. CBG'nin Özellikleri ve Biyosentezi	33
2.5.2. CBG'nin Biyolojik Etkileri	35
2.5.3. CBG'nin Kanser Üzerindeki Etkileri	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	47
3.1. Materyal	48
3.1.1. Kullanılan Kimyasal-Sarf Malzemeler ve Özellikleri.....	48
3.1.2. Kullanılan Alet-Cihaz ve Özellikleri.....	49
3.1.3. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri	50

3.2. Yöntem	51
3.2.1. Sterilite İçin Laboratuvarda Alınan Önlemler	51
3.2.2. Hücre Kültür Medyası Hazırlanması.....	51
3.2.3. Hücre Çözülmesi ve Büyütülmesi.....	51
3.2.4. Hücre Pasajlanması	52
3.2.5. Hücre Dondurulması	52
3.2.6. Hücre Sayımı.....	53
3.2.7. CBG Ve DCX'in Hazırlanışı	54
3.2.8. Sitotoksikite Testi	55
3.2.9. İki Boyutlu Migrasyon Testi/ Scratch Testi/ Yara İyileşme Testi ..	56
3.2.10. Üç Boyutlu Migrasyon Testi/ Transwell Migrasyon Testi	57
3.2.11. DNA Fragmentasyon Testi	58
3.2.12. Apoptoz Proteinlerinin İmmün Boyaması.....	60
3.2.13. İstatistiksel Analizler ve Verilerin Değerlendirilmesi	61
4. BULGULAR.....	62
4.1.CBG'nin, Normal ve Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	62
4.1.1. CBG'nin, PNT1A Normal Prostat Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi Ve DCX İle Karşılaştırılması.....	62
4.1.2. CBG'nin, DU145 Prostat Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	66
4.1.3. CBG'nin, PC3 Prostat Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	70
4.2. Normal Ve Prostat Kanseri Hücrelerinde CBG'nin Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	75
4.2.1. CBG İle Muamele Edilen Normal Ve Prostat Kanseri Hücrelerinde İmmün Boyama İle Apoptoz Yolağına Ait Proteinlerin Sentezinin Görüntülenmesi	75
4.2.2. CBG İle Muamele Edilen Normal Ve Prostat Kanseri Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Jel Üzerinde Görüntülenmesi	84
4.3. CBG'nin Prostat Kanseri Hücrelerinde Metastaz Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	85

4.3.1. CBG'nin Prostat Kanser Hücrelerinde Metastaz Üzerindeki Etkisinin İki Boyutlu Migrasyon Testi İle Tespiti	85
4.3.2. CBG'nin, Prostat Kanser Hücrelerinde Metastaz Üzerindeki Etkisinin Üç Boyutlu Migrasyon Testi İle Tespiti	87
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	94
7. KAYNAKLAR.....	96
8. EKLER.....	113
EK-1: Özgeçmiş	113



ÖZET

Kenevir Bileşenlerinden Kannabigerolün DU145 ve PC3 İnsan Prostat Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Anti-Kanser Etkisi

Prostat kanseri, dünyada ve ülkemizde en sık görülen ikinci kanser türüdür. Tedavisi için radyoterapi, kemoterapi veya hormonoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Fakat metastatik kanserlerde, bu tedaviler yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, yeni ve alternatif terapilerin geliştirilmesi önem kazanmıştır.

Kenevir bitkisi, uzun yıllardır farklı alanlarda kullanılmaktadır. Tıp alanındaki kullanımı ise, milattan önce 3200 yıla kadar dayanmaktadır. Uyuşturucu etkisi bulunduğu için, araştırmalarda kullanımı uzun yıllar göz ardı edilmesine rağmen, son yıllarda kenevir üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Özellikle içerdiği fitokannabinoitlerin, kanserin de dahil olduğu birçok hastalığa iyi geldiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Kannabigerol (CBG), uyuşturucu etki oluşturmeyen bir fitokannabinoittir. Bu nedenle, son yıllarda bu molekül ile alakalı araştırmalarda artış gerçekleşmiştir. Alzheimer, Parkinson veya kolit gibi birçok hastalık üzerindeki etkisi, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Buna ek olarak, farklı kanser tiplerini de inhibe etme kapasitesi olduğu literatürdeki birçok çalışmada gösterilmiştir. Fakat prostat kanseri üzerindeki etkisi, kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır.

Bu doğrultuda bu tez çalışmasında, CBG'nin DU145 ve PC3 insan metastatik prostat kanser hücre hatları üzerindeki anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızın, özgünlüğünü ve güvenilirliğini artırmak adına kontrol olarak normal prostat hücre hattı kullanılmıştır. Sitotoksikite testlerinden elde edilen verilere göre, rutinde kullanılan kemoterapötik ajana kıyasla CBG'nin DU145 ve PC3 hücrelerini spesifik olarak daha fazla öldürdüğü gösterilmiştir. Buna ek olarak, immün boyama ve DNA fragmentasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar, bu ölümün apoptoz mekanizması üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Son olarak, iki ve üç boyutlu migrasyon testleri, CBG'nin metastatik kanser hücrelerinin migrasyon kapasitesini inhibe edebildiğini göstermiştir.

CBG'nin prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi, apoptozunu tetiklemesi ve metastaz kapasitesini azaltması, bu bileşenin potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Kannabigerol, Kenevir, Metastaz, Prostat kanseri

ABSTRACT

Anti-Cancer Effect of Cannabigerol, a Cannabis Compound, on DU145 and PC3 Human Prostate Cancer Cell Lines

Prostate cancer is the second most common cancer type in the world and in our country. Methods such as radiotherapy, chemotherapy or hormonotherapy are used for treatment. However, in metastatic cancers, these treatments are inadequate. Therefore, developing new and alternative therapies has become important.

The cannabis plant has been used in different areas for many years. Its use in medicine dates back to 3200 years before Christ. Although it was ignored for many years due to its narcotic effects, research on hemp has gained importance in recent years. It has been shown in many studies that especially the phytocannabinoids it contains are good for many diseases, including cancer.

Cannabigerol (CBG) is a phytocannabinoid that has no narcotic effects. For this reason, there has been an increase in research on this molecule in recent years. Its effect on many diseases such as Alzheimer, Parkinson or colitis has been shown in the recent studies. In addition, the capacity of CBG to inhibit different types of cancer was demonstrated. However, the effect on prostate cancer has not been extensively studied.

Accordingly, in this thesis, the anti-cancer effect of CBG on DU145 and PC3 metastatic prostate cancer cell lines was investigated. In order to increase the specificity and reliability of our study, a normal prostate cell line (PNT1A) was used as a control. The cytotoxicity tests show that CBG specifically eliminate DU145 and PC3 cells more than the routinely used chemotherapeutic agent. In addition, results obtained from immunostaining and DNA fragmentation experiments show that this cell death occurs through the mechanism of apoptosis. Finally, two- and three-dimensional migration tests showed that CBG could inhibit the migration capacity of metastatic cancer cells.

Finally, the fact that CBG inhibits proliferation, triggers apoptosis and reduces the metastasis capacity of prostate cancer cells indicates that this component may be a potential therapeutic in the near future.

Keywords: Apoptosis, Cannabigerol, Cannabis, Metastasis, Prostate cancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

‰: yüzde

°C: Santigrat derece

2-AG: 2-Araşidonil Gliserol

3NP: 3-Nitropropionik asit

5-HT1A: 5-Hidroksitriptamin 1A Reseptörü

5-LO: 5-Lipoksijenaz

7-AAD: 7-Aminoaktinomisin D

ABL-1: ABL proto-onkogen 1

AC: Adenilat Siklaz

ADH12: Alkol Dehidrojenaz 12

ADT: Androjen Yoksunluğu Tedavisi

AEA: Anandamid

AIF: Apoptoz Tetikleyici Faktör

ALOX12: 12-Lipoksijenaz

ALOX15: 15-Lipoksijenaz-1

Annexin V/PI: Aneksin V/ Propidyum İyodür

APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1

AR: Androjen Reseptörü

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

ATM: Mutasyona Uğramış Ataksi Telenjektazi

ATP: Adenozin Trifosfat

ATR: Ataksi Telenjektazi ve Rad3 ile İlgili

BAD: BCL-2 ile İlişkili Hücre Ölümü Agonisti

BAK: BCL-2 Homolog Antagonist Öldürücü

BAX: BCL-2 ile İlişkili X

BCL-2: B Hücreli Lenfoma Geni-2

BCL-X: B hücreli Lenfoma-Ekstra Büyük

BH3-only: BCL-2 Homoloji Alanı 3-Yalnızca

BID: BH3 Etkileşimli Alan Ölüm Agonisti

BIM: BCL-2 Etkileşimli Hücre Ölümü Aracısı

BIRC-5: Survivin

c-FLIP: Hücresel FLICE Benzeri İnhibitör

CB1: Kannabinoit Reseptör 1
CB2: Kannabinoit Reseptör 2
CBC: Kanabikromen
CBD: Kannabidiol
CBDV: Kannabinodiol
CBG: Kannabigerol
CBGA: Kannabigerolik Asit
CBN: Kannabinol
CBR: Kannabinoit Reseptörü
cm: Santimetre
COX-2: Siklooksijenaz-2
CRISPR/Cas9: Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri/Cas9
CSF-1: Koloni Uyarıcı Faktör 1
CTC: Dolaşımdaki Kanser Hücresi
CYP2J2: Sitokrom P450 Aile 2 Alt Aile J Üyesi 2
DAGL α : Diaçilgliserol Lipaz α
DAGL β : Diaçilgliserol Lipaz β
DCX: Docetaxel
ddH₂O: Deiyonize Distile Su
DHT: 5 α -dihidrotestosteron
DIC: Diferansiyel İnterferans Kontrast Mikroskopisi
dk: Dakika
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit
DPBS: Fosfat-Tamponlu Salin Çözeltisi
EACC: Doğu Asya Kültür Koleksiyonu
EBRT: Dış Işın Radyasyon Tedavisi
ECM: Ekstraselüler Matriks
ECS: Endokannabinoit Sistem
EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMAR: Manyetik Rezonans Görüntüleme
EMT: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm
endoCB: Endokannabinoit
ERK: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz

EZA: Enzalutamide
FAAD: Fas ile İlişkili Ölüm Alanı
FAAH: Yağ Asidi Amid Hidrolaz
FAAH2: Yağ Asidi Amid Hidrolaz 2
FasL: Fas Ligand
FasR: Fas Reseptörü
FBS: Fetal Sığır Serumu
FDA: Amerika Gıda ve İlaç İdaresi
FITC: Floresein İzotiyosiyanat
g: Gram
g.mol⁻¹: Gram Bölü Mol
GDP: Guanosin Difosfat
GEF: Guanin Nükleotid Değişim Faktörü
GLOBOCAN: Küresel Kanser Gözlem Verileri
GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPCR: G Proteinine Bağlı Reseptörler
GPP: Geranil Difosfat
GPR55: G Proteini Reseptörü
GTP: Guanosin Trifosfat
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC₅₀: Enzim Aktivitesini Yarıya Düşüren İnhibitör Konsantrasyonu
IFN- γ : İnterferon Gama
IL-10: İnterlökin-10
IL-1 β : İnterlökin-1 β
IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
iNOS: Nitrik Oksit Sentaz
JNK: Jun N-terminal Kinaz
KNTC-1: Kinetokor İlişkili 1
LD: Aydınlık/ Karanlık
LPS: Lipopolisakkarit
m: metre
M.Ö: Milattan Önce
M1: Tümörle İlişkili Makrofaj-1

MAG: Monoasilgliserol
MAGL: Monoasilgliserol Lipaz
MAPK: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
mCRPC: Metastatik Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri
mg/kg: Miligram bölü Kilogram
mL: Mililitre
MMP: Metaloproteinaz
mRNA: Mesajcı RNA
mTOR: Memeli Hedefi Rapamisin
MTS: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MTS: Metiltiazolildifenil-tetrazolyum bromür
MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
Na²⁺: Kalsiyum İyonu
NAPE-PLD: N-Asil Fosfatidiletanolamin-Spesifik Fosfolipaz D
NAT10: N-asetiltransferaz 10
NEA: N-asiletanolamin
ng/ mL: Nanogram bölü Mililitre
OL: Olivetol
OLA: Olivetolik Asit
PAP: Prostatik Asit Fosfataz
PFA: Paraformaldehit
PI3K: Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PIN: Prostat Epitelyal İçi Neoplazma
PLC β : Fosfolipaz C- β
PPAR: Peroksizom Proliferatör ile Aktive edilen Reseptörler
PSA: Prostat Spesifik Antijen
PSMA PET-scan: Prostata Özgü Membran Antijeni Pozitron Emisyon Tomografisi Taraması
qRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI: Roswell Park Memorial Institute/ Besiyeri
SOD: süperoksit dismutaz
TAE: Tris-Asetat-EDTA

TAM: Tümörle İlişkili Makrofaj
THC: Tetrahidrokannabinol
TME: Tümör Mikro Çevresi
TMZ: Temozolomid
TNF-R1: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1
TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü- α
TNM: Tümör–Düğüm–Metastaz
TR: Tat Tepkisi
TRAIL-R: Tümör Nekroz Faktörü ile İlgili Apoptoz İndükleyici Ligandın Reseptörü
TRP: Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları
TRPA1: TRP Ankirin Alt Ailesinin Tek Üyesi
TRPC: TRP Kanonik
TRPM: TRP Melastatin
TRPML: TRP Mukolipin
TRPN: TRP Mekanoreseptör Olmayan Potansiyel C
TRPP: TRP Polisistin
TRPV: TRP Vanilloid
UV: Ultraviyole
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
WST-8: (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium,
YAP: Evet-ilişkili Protein 1
 α PD-L1: Programlı Ölüm Ligandı-1
 Δ 9-THC: Delta-9 Tetrahidrokannabinol
 μ g/mL: Mikrogram bölü Mililitre
 μ L: mikrolitre
 μ M: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İçsel ve dışsal apoptoz yolları.....	4
Şekil 2.2 Metastaz aşamaları.....	8
Şekil 2.3 2020 yılında kanser vakaları	9
Şekil 2.4 2020 yılında erkeklerde görülen kanserler:	10
Şekil 2.5 Erkekte üreme ve idrar organları	11
Şekil 2.6 Prostat bezinin anatomik ve hücresel yapısı.....	11
Şekil 2.7 Prostat kanserin oluşumu ve ilerleme evreleri	13
Şekil 2.8 DCX'in moleküler yapısı	19
Şekil 2.9 Kenevir türleri	20
Şekil 2.10 Kenevirin kullanım alanları.....	23
Şekil 2.11 Endokannabinoid sistem ve öğeleri	24
Şekil 2.12 Kannabinoid reseptörleri ve sinyal yolları	26
Şekil 2.13 Prostat kanseri hücrelerinde kannabinoid reseptörlerinin aktivasyonu....	29
Şekil 2.14 THC'nin moleküler yapısı.....	30
Şekil 2.15 CBD'nin moleküler yapısı	31
Şekil 2.16 CBG'nin moleküler yapısı	33
Şekil 2.17 CBG'nin biyosentezi	34
Şekil 3.1 Tez çalışmasında takip edilen iş akış şeması	47
Şekil 3.2 Optik invert mikroskop altında Thoma lamında sayım yapılan alan (X10)	54
Şekil 3.3 Sitotoksikite deneyi için dizayn edilen 96 kuyucuklu plaka	56
Şekil 3.4 2D boyutlu migrasyon testinin iş akışı.....	57
Şekil 4.1 CBG'nin PNT1A normal prostat hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 metodu ile belirlenmesi.....	64
Şekil 4.2 PNT1A normal prostat hücrelerinin 30 ile 60µM arasında CBG ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra DIC mikroskop görüntüleri.	64
Şekil 4.3 40 µM CBG veya 4 nM maruz kalan PNT1A normal prostat hücrelerinde, canlılığının karşılaştırılması.	65
Şekil 4.4 CBG'nin DU145 prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 metodu belirlenmesi.....	67
Şekil 4.5 DU145 prostat kanser hücreleri, 30 ile 60µM arasında CBG ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra DIC mikroskop görüntüleri.	68

Şekil 4.6 40 μ M CBG veya 4nM DCX'e maruz kalan DU145 prostat kanser hücrelerinin hücre canlılığının karşılaştırılması.	69
Şekil 4.7 CBG'nin PC3 prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 metodu belirlenmesi.	70
Şekil 4.8 PC3 prostat kanser hücreleri, 30 ile 60 μ M arasında CBG ile 24 saat muamele edildikten sonra DIC mikroskop görüntüleri.	72
Şekil 4.9 PC3 prostat kanser hücrelerinde 40 μ M CBG'ye veya 4 nM DCX'e maruz kalma sonrasında hücre canlılığının kıyaslanması.	73
Şekil 4.10 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	75
Şekil 4.11 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-8 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	76
Şekil 4.12 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-9 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	76
Şekil 4.13 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra BAX proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	77
Şekil 4.14 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	78
Şekil 4.15 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-8 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	79
Şekil 4.16 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-9 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	79
Şekil 4.17 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra BAX proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	80
Şekil 4.18 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	81
Şekil 4.19 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-8 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	82
Şekil 4.20 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-9 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	82
Şekil 4.21 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra BAX proteinin immün boyama ile görüntülenmesi.	83
Şekil 4.22 DNA fragmentasyonunun agaroz jel görüntüsü.	84

Şekil 4.23 *DUI45 prostat kanser hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda CBG'ye maruz kalması sonrasında migrasyon oranının yara iyileşme testi ile gösterilmesi. 85*

Şekil 4.24 *PC3 prostat kanser hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda CBG'ye maruz kalması sonrasında migrasyon oranının yara iyileşme testi ile gösterilmesi. 86*

Şekil 4.25 *DUI45 prostat kanser hücrelerinin 40µM CBG'ye maruz kalması sonrasında kuyucuk arası migrasyon oranının kuyucuk arası (transwell) testi ile gösterilmesi.87*

Şekil 4.26 *PC3 prostat kanser hücrelerinin 40µM CBG'ye maruz kalması sonrasında kuyucuk arası migrasyon oranının kuyucuk arası (transwell) testi ile gösterilmesi.88*



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 <i>Prostat kanserinde TNM sınıflandırması</i>	<i>15</i>
Tablo 2.2 <i>Prostat kanserinde D'Amico sınıflandırılması</i>	<i>16</i>
Tablo 2.3 <i>Literatürde CBG'nin kanser hücrelerinde kullanım konsantrasyonları ...</i>	<i>45</i>
Tablo 3.1 <i>Tez çalışmasında kullanılan kimyasal listesi</i>	<i>48</i>
Tablo 3.2 <i>Tez çalışmasında kullanılan kimyasal listesi</i>	<i>49</i>
Tablo 3.3 <i>Tez çalışmasında kullanılan cihaz listesi</i>	<i>49</i>
Tablo 4.1 <i>Sitotoksikite deneylerinde elde edilen IC50 değerleri</i>	<i>73</i>



1. GİRİŞ

Kanser hastalığı, normal hücrelerin transformasyona uğraması sonucunda anormal hücreye dönüşmesi ve bu hücrelerin aşırı bölünerek tümör oluşturmaları ile ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu tümör kan dolaşımı ile uzak dokulara sıçrayabilmekte ve metastaz oluşturabilmektedir (Brown vd., 2023).

Kanser, dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunudur ve her geçen gün vaka sayılarında artış gözlemlenmektedir. Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanserlerde ikinci sırada gelmektedir (Cancer Today, 2022). İlerleyen yaş, genetik bozukluklar, yaşam tarzı gibi faktörler prostat kanseri riskini artırmaktadır. Prostat kanserinde, ilk olarak epitelyal dokuda neoplazma denilen aşırı bir hücre proliferasyonu görülmektedir. Ardından, adenokarsinoma oluşturan bu hücreler metastaz yaparak kemik gibi başka dokulara yerleşebilmektedir.

Prostat kanserinin tedavisinde prostatektomi, radyoterapi, hormonoterapi veya kemoterapi gibi metotlar kullanılmaktadır. Fakat, ileri seviyede metastatik kanser tiplerinde genellikle bu tedavilerden olumlu sonuç alınamamaktadır (Crawford vd., 2015). Bu nedenle, yeni ve alternatif tedavilerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu doğrultuda, doğal bileşenlerin kullanılması Dünya Sağlık Örgütü tarafından desteklenmektedir (WHO Traditional Medicine Strategy: 2014–2023).

Kenevir bitkisi, çok uzun yıllardır kullanılmakla birlikte, son yıllarda tıp alanında yapılan çalışmalarda önemli bir artış gerçekleşmiştir. Kenevir, 500’den fazla biyomolekül içermektedir ve özellikle fitokannabinoitlerin, farklı hastalıklarda etkili oldukları gösterilmiştir (Çalışkan & Yildirim, 2020). Doğal olarak hücrelerimizde, kannabinoit reseptörlerinin de dahil olduğu endokannabinoit sistemin (ECS) bulunması, bu bileşenlerin etkisini artırmaktadır. Prostat kanserinde, ECS’de bozulmalar görülmektedir. Bu nedenle, kannabinoitlerin prostat kanserinin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Díaz-Laviada, 2011).

Kannabigerol (CBG), bazı fitokannabinoitlerin aksine psikolojik veya bilişsel değişikliğe sebep olmadığı için, psikoaktif değildir. Bu nedenle, farklı hastalıkların

tedavisi için kullanılma potansiyelinin olduğu gösterilmiştir. Örneğin, CBG'nin anti-enflamatuvar ve anti-oksidan etkileri ile birlikte nöroprotektif etkisinin de olduğu gösterilmiştir (Borrelli vd., 2013; Calapai vd., 2022; Giacoppo vd., 2017). CBG'nin kanser üzerindeki etkisi, birçok çalışmada ele alınmıştır. İlk alışmalar, 1996 yılında başlamıştır ve günümüzde de hız kazanarak artmıştır. CBG'nin, meme kanseri, kolorektal kanseri, melonama veya glioma gibi çeşitli kanser tiplerindeki etkisi yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (S.-H. Baek vd., 1996; Lah vd., 2021; Ligresti vd., 2006; Yüksel vd., 2023).

Fakat, CBG'nin prostat kanseri üzerindeki etkisi, kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır. Bu sebeple bu tez çalışmasında CBG'nin, prostat kanser hücre hatlarının proliferasyonunu, apoptozunu ve metastaz kapasitesini nasıl etkilediği araştırılmak amaçlanmıştır. Buna ek olarak, CBG'nin kanser hücrelerini spesifik olarak hedeflediğini göstermek için ise normal prostat hücre hattı da kullanılmıştır.

Bu amaç kapsamında elde edeceğimiz sonuçların, doğal bir bileşen olan CBG'nin, prostat kanserinin tedavisinde kullanılması için literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, normal hücrelerin anormal hücrelere dönüşerek aşırı şekilde bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Fakat yapılan çalışmalar, kanseri tanımlamanın bu kadar kolay olmadığını her geçen gün yeni özellikler ekleyerek ortaya koymaktadır. Hanahan ve Weinberg “Kanserin ayırt edici özellikleri” olarak adlandırdıkları derlemelerinde 2000 yılına kadar yapılan çalışmalardan yola çıkarak kanserin 6 özellik üzerinden tanımlanabileceğini göstermişlerdir (Hanahan & Weinberg, 2000). 2012 yılında bu özellikler 10’a çıkarılmış ve en son 2022 yılında ise 14’e yükselmiştir (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). Bu özellikler 1. Proliferatif sinyallerin sürdürülmesi, 2. Büyüme baskılayıcılardan kaçış, 3. Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, 4. Bağışıklık sisteminden kaçış, 5. Replikatif ölümsüzlüğün etkinleştirilmesi, 6. Tümörü tetikleyen inflamasyon, 7. Polimorfik mikrobiyomlar, 8. İnvazyon ve metastazın etkinleştirilmesi, 9. Damar oluşumunun veya damarlara erişimin tetiklenmesi, 10. Senesent hücreler, 11. Genom kararsızlığı ve mutasyon, 12. Hücre ölümüne direnç, 13. Hücresel metabolizmanın deregülasyonu, 14. Fenotipik esnekliğin açılması olarak sınıflandırılmaktadır.

2.1.1. Sonsuz Proliferasyon

Kanser hücreleri, kronik olarak proliferen olan hücrelerdir. Bu özelliklerinin temeli proliferasyon sinyallerini sürdürmeleri ile gerçekleşmektedir ve bu sinyaller mitojenik sinyaller olarak adlandırılmaktadır. Bu sinyallerin sürdürülebilmesi için kanser hücresi farklı yollara başvurmaktadır. Kanser hücresi büyüme faktörü salgılayarak ve hücre membranında daha fazla veya daha hassas büyüme faktörü reseptörü ifade ederek kendi proliferasyonunu tetikleyebilmektedir. Diğer yandan, normal komşu hücrelerin büyüme faktörleri salgılamasını sağlayarak da büyümesini sürdürebilmektedir. Buna ek olarak, büyüme faktörü veya reseptörünün bağlanmasından bağımsız bir şekilde hücresel yolları aktif hale getirerek sonsuz bir bölünme sağlayabilmektedir (Bhowmick vd., 2004; Cheng vd., 2008).

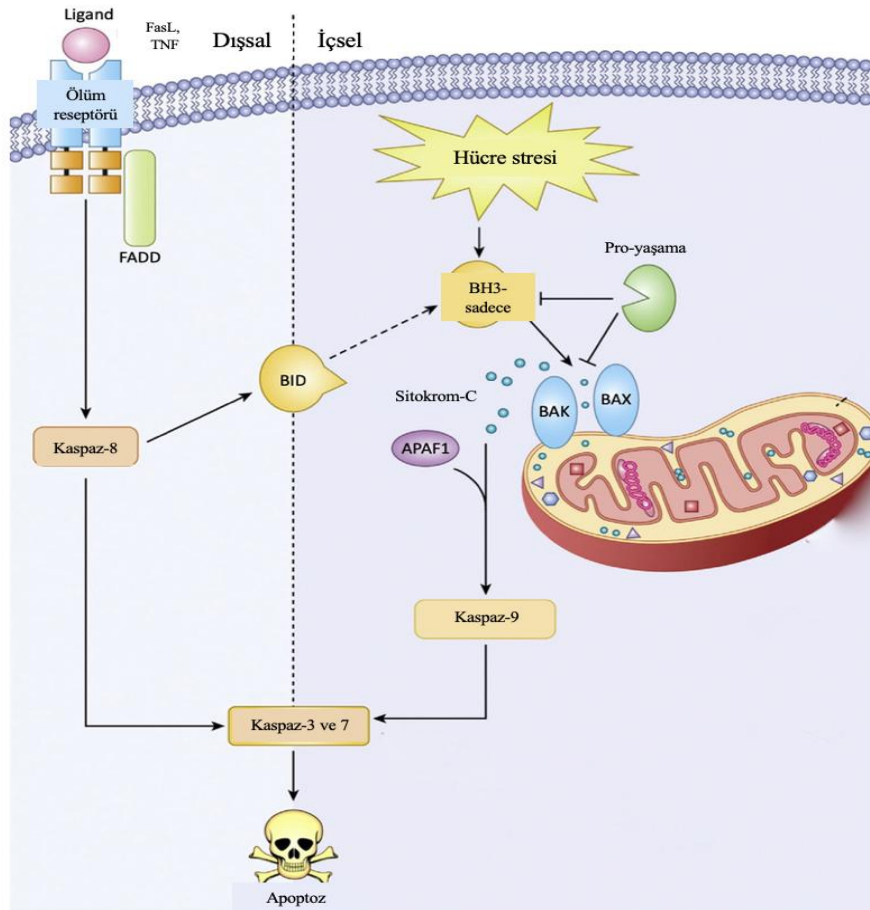
Kanser hücreleri büyüme faktörlerini aktif hale getirdikleri gibi, proliferasyonu inhibe eden yolları da devre dışı bırakıp sınırsız bir şekilde bölünmektedirler. Bu

kapsamda, hücrenin proliferasyon veya apoptozunda rol oynayan proteinlerde, işlevsizlik veya inhibisyon görülmektedir. Bu durum ise kanser hücrelerinin sınırsız bir şekilde bölünmesine sebep olmaktadır (Deshpande vd., 2005; Lipinski & Jacks, 1999).

Kanser hücrelerinin sınırsız bir şekilde bölünmelerini sağlayan bir diğer mekanizma ise sınırsız replikasyonun devreye girmesidir. Normal hücreler telomer kısalması yüzünden belirli bir replikasyon sonrasında senesense girerek bölünme evreleri durmaktadır. Bunun aksine kanser hücrelerinde telomerlerin kısalmasını engelleyen telomerez enziminin aşırı ifadesi ile kanser hücreleri sınırsız bir replikasyon kapasitesine sahip olurlar (Robinson & Schiemann, 2022).

2.1.2. Ölümünden Kaçış

Apoptoz



Şekil 2.1 İçsel ve dışsal apoptoz yolları (McArthur & Kile, 2018)

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, çok hücreli canlılarda proliferasyonu kontrol altında tutmakla homeostaziyi sağlamaktadır. Bu mekanizma sayesinde organizmada bulunan zararlı veya ihtiyaç duyulmayan hücreler kontrollü bir şekilde elimine edilmektedir. Nekrozun aksine apoptoz herhangi bir enflamasyona sebep olmadan hücreleri öldürmektedir. Apoptoz hücresel boyutta kromatinin yoğunlaşması, hücrenin büzülmesi, apoptotik cisimciklerin oluşumu ve komşu hücreler veya ekstraselüler matriks (ECM) ile bağların kopması ile karakterize edilmektedir (Goldar vd., 2015). Biyokimyasal seviyede, apoptoza giren hücrelerde Deoksiriboz Nükleik Asit (DNA) fragmente olmakta ve bu kesim sistematik bir şekilde internükleozomik bölgelerden gerçekleşmektedir (Kaufmann vd., 2000; McArthur & Kile, 2018). Diğer yandan, membranda bulunan fosfatidil serinler membranın iç yüzünden dış yüzüne geçmektedir. Makrofajların fosfatidil serinlere karşı reseptörleri bulunmaktadır ve bu şekilde enflamasyon oluşturmada apoptotik hücreleri elimine etmektedirler (Vallabhapurapu vd., 2015).

Biyokimyasal boyutta en önemli değişim ise kaspaz proteinlerin aktivasyonunda gerçekleşmektedir. Farklı kaspazların rol oynadığı ve apoptozun aktivasyonunun sağlandığı iki yolak bulunmaktadır.

İçsel apoptoz yolağı

İçsel (intrinsik), klasik veya mitokondrial olarak adlandırılan yolak, memeli hücrelerinde en sık kullanılan apoptoz yolağıdır (McArthur & Kile, 2018). Hücrenin içsel yolak üzerinden apoptoza girip girmemesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler içeren B Hücreli Lenfoma Geni-2 (BCL-2) protein ailesinin dengesine bağlıdır. DNA hasarı, radyasyon, oksidatif stres gibi hücre içi stresler dengenin pro-apoptotik kısma kaymasını sağlar ve hücre apoptoza yönelir. BCL-2 ailesine ait anti-apoptotik proteinler olan B Hücreli Lenfoma-Ekstra Büyük (BCL-X) ve BCL-2 proteinleri, pro-apoptotik olan BCL-2 ile ilişkili X Proteini (BAX) ve BCL-2 Homolog Antagonist Öldürücü (BAK) proteinlerini inhibe ederler. Hücresel stresler ilk olarak, BCL-2 ailesine ait pro-apoptotik BCL-2 homoloji alanı 3-yalnızca (BH3-only) Proteinlerinin (BCL-2 Etkileşimli Hücre Ölümü Aracı (BIM), BH3 Etkileşimli Alan Ölüm Agonisti (BID), BCL-2 ile ilişkili Hücre Ölümü Agonisti (BAD)) aktivasyonunu sağlar. BH3-only proteinleri BCL-X ve BCL-2 proteinlerini inhibe eder ve bu sayede BAX ve BAK proteinleri mitokondrinin dış membranına bağlanarak por oluşturulabilirler. Bu porlardan salgılanan sitokrom-c, sitoplazmada bulunan

Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (APAF-1) proteinlerine bağlanır ve kaspaz-9 ile birleşen bu komplekse “apoptozom” adı verilir. Hücrede, kaspazlar pro-kaspaz halinde bulunurlar ve aktivasyon sonrasında kesilerek kaspaz olarak sürece dahil olurlar. Başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9, diğer kaspaz-9’ları aktive ettikten sonra “cellat kaspaz” olarak adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7’nin aktivasyonunu sağlarlar. Bu kaspazlar ise hücrenin DNA’sının parçalanması (fragmentasyon) ve sitoskelet proteinlerinin degradasyonunu ile hücrenin büzüşerek apoptotik cisimciklere ayrılmasını sağlamaktadır (Jin & El-Deiry, 2005; Yuan & Akey, 2013). Sitokrom-c ile mitokondriden Apoptoz Tetikleyici Faktör (AIF) ve endonükleaz G proteinleri salgılanır. Bu proteinler, kromatinin yoğunlaşmasını ve DNA’nın fragmentasyonunu tetikleyerek apoptoza katkı sağlamaktadır (Sevrioukova, 2011).

Dışsal apoptoz yolağı

Dışsal (ekstrinsik) apoptoz yolağı hücre membranında bulunan reseptörlere (Fas Reseptörü (FasR), Tümör Nekroz Faktörü ile İlgili Apoptoz İndükleyici Ligandın Reseptörü (TRAIL-R), Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1 (TNF-R1)) ölüm ligandlarının (TNF- α , Fas Ligand (FasL), TRAIL) bağlanması ile başlamaktadır (Kashyap vd., 2021). Bağlanma sonucunda, Fas ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini (FADD) adaptör protein aracılığı ile reseptöre bağlanması ile kaspaz-8 aktif hale gelmektedir. Başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8, diğer kaspaz-8’leri aktif hale getirdikten sonra “cellat kaspaz” olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7’leri aktive etmektedir. Bu aktivasyona paralel olarak kaspaz-8, içsel yolağı BID proteinini aktive ederek tetiklemektedir. Aktif BID proteini, BH3-only proteinlerini aktive ederek sitokrom-c salgılanmasını tetiklemektedir. Sonuç olarak, iki yolak da, ortak cellat kaspazların aktivasyonu sonucunda hücrenin apoptoza gitmesini sağlamaktadır (Elmore, 2007; Goldar vd., 2015; Jin & El-Deiry, 2005).

Kanserde deregüle olan mekanizmalar

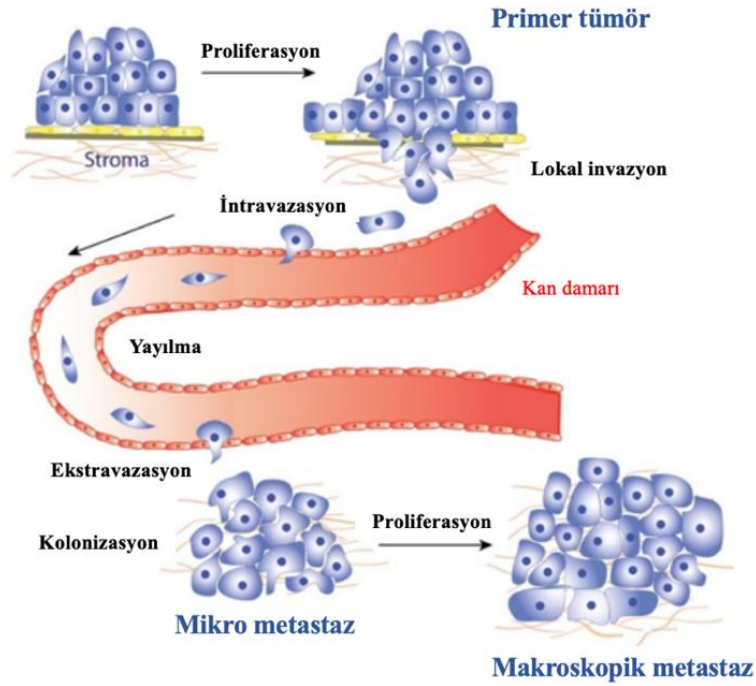
Hücre, ölüm ile yaşam arasında bir dengede durmaktadır. Bu dengenin bozulması hücrede patolojilere sebep olmaktadır. Kanserde, apoptozu tetikleyen proteinlerin azalması ve/veya apoptozu inhibe eden proteinlerin artışı gözlemlenmektedir (Goldar vd., 2015). Bu bozukluklar hem içsel hem dışsal apoptoz yolaklarında rol oynayan aktörlerde görülmektedir. Farklı kanserlerde, BCL-2 protein ailesinde bulunan anti-apoptotik proteinlerinde artış ve/veya pro-apoptotik

proteinlerinde düşüş görülmektedir (Fulda, 2009; Kang & Reynolds, 2009). Diğer yandan, dışsal yolla kaspaz-8'i inhibe eden hücresel FLICE Benzeri İnhibitör (c-FLIP) proteininde artış, kanser oluşumuna neden olabilmektedir (Safa & Pollok, 2011). Bunlara ek olarak, iki apoptoz yolağında da önemli rol oynayan kaspazlarda ortaya çıkacak herhangi bir alterasyon kansere sebep olabilmektedir (Fong vd., 2006). Bu nedenle, kansere karşı geliştirilmeye çalışılan tedavilerde apoptozu spesifik olarak kanser hücrelerinde tetikleyen çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Bu kapsamda günümüzde yürütülen klinik araştırmalar ve Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayını almış ilaçlar bulunmaktadır (Green & Kroemer, 2005). Fakat, kanser hücrelerinin sürekli geliştirdikleri kaçış stratejileri, apoptozu indükleyecek yeni tedavilerin geliştirilmesini gerektirmektedir (Fulda, 2010).

2.1.3. Son Vuruş: Metastaz

Hücre göçü ve istilası olarak adlandırılan metastaz kanser hücrelerinin kaynak dokudan başka bir dokuya kan dolaşımı aracılığı ile göç etmesine verilen addır (Wittekind & Neid, 2005). Normal hücrelerde hücre hareketi sıkı bir kontrol altındadır. Embriyogenez veya yara iyileşmesi gibi durumlarda hücreler, kontrollü bir şekilde bir bölgeden bir başka bölgeye göç (migrasyon) edebilirler. Bu durumun gerçekleşebilmesi için organize ve epitelyal karaktere sahip hücreler Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüme (EMT) girmek durumundadır (Vanharanta & Massagué, 2013). Bu dönüşüm metastatik kanser hücrelerinde parsiyel veya tamamen gerçekleşerek hücrenin migrasyonuna olanak sağlamaktadır. Metastaz, ilk olarak invazyon basamağı ile başlamaktadır. Bu aşamada, epitelyal olarak organize olan hücrelerin, hücrelerarası ve Ekstraselüler Matriks (ECM) bağları zayıflamaktadır. Bunun nedeni ise kanser hücrelerinin EMT'ye girmeleridir. Bu dönüşüme giren hücreler E-kaderin yerine N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal markörleri ekspres etmeye başlamaktadırlar. Bu ekspresyona paralel olarak matriks Metaloproteinazların (MMP) ifadesinde ve aktivasyonunda da artış meydana gelmektedir. Bu da kanser hücrelerinin, bazal membranı ve ECM'nin degradasyonunu sağlamaktadır. ECM'nin degradasyonu, sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasına neden olmaktadır. Bu ise, kanser hücrelerinin proliferasyonuna katkı sağlamaktadır (Lamouille vd., 2014). İnvazyon aşamasında kanser hücreleri toplu veya tekli olarak göç edebilmektedirler (Friedl vd., 2012). İnvazyondan sonra kanser hücreleri, intravazyon veya diğer

adıyla trans-endotelyal göç aşamasına geçmektedirler. Bu etapta bazal membranı ve ECM'yi degrade eden hücreler, kan veya lenfatik dolaşıma geçmektedirler. Bu aşamada kemoatraktanların etkisi altında, hücrelerin moleküler yapısının ve sitoskeletoninin değişime uğradığı görülmektedir (Zavyalova vd., 2019). Kan veya lenfatik damarın lümenine geçen kanser hücresi Dolaşımdaki Kanser Hücresi (CTC) olarak adlandırılmaktadır. Dolaşıma geçen CTC'ler, hidrodinamik kesme kuvveti, bağışıklık sistemi hücreleri, besleyici faktörlerin eksikliği gibi önemli sayıda stresle karşı karşıya gelmektedirler. Fakat CTC'ler, bu sorunlarla başa çıkmak için trombositlere bağlanarak, hedefledikleri dokuya korumalı bir yolculuk ile ulaştıkları gösterilmiştir (Joyce & Pollard, 2009).



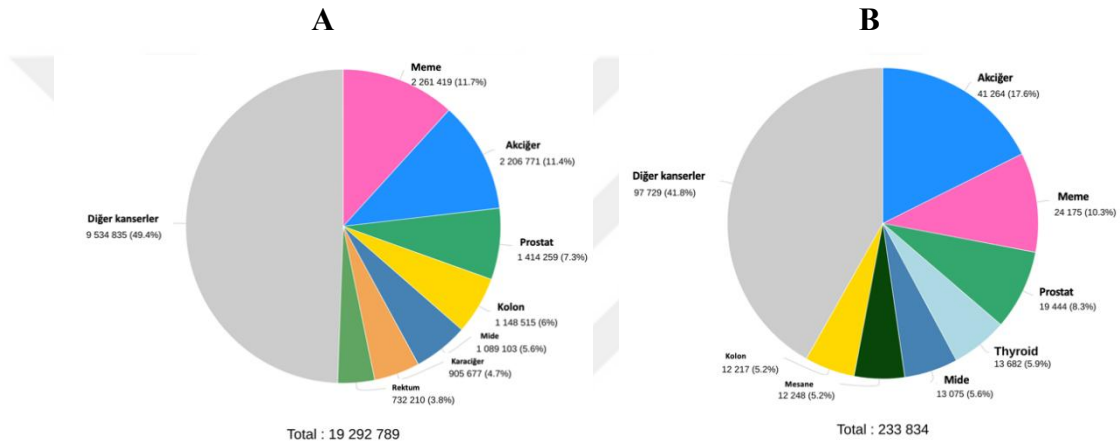
Şekil 2.2 Metastaz aşamaları (Saxena & Christofori, 2013)

CTC'lerin metastaz oluşturacakları dokuya girebilmeleri için ekstravazasyon sürecinden geçmeleri gerekmektedir. Bu aşamada kanser hücrelerinin iki farklı mekanizma kullandıkları gösterilmiştir. Birinci mekanizmada, hücrelerin damarın iç yüzeyine bağlanıp koloni oluşturduktan sonra, damar duvarını degrade edip parenkimaya ulaştıkları gösterilmiştir. Diğer mekanizmada ise, kanser hücreleri, damarı oluşturan endotelial hücreler ve perisitleri kenara iterek aralarından geçerek parenkimaya ulaştığı gösterilmiştir (Al-Mehdi vd., 2000). Hedefledikleri dokuya ulaşan kanser hücreleri mikrometastaz oluştururlar. Bu aşamada, kanser hücrelerinin

metastaz oluşturmak için dokular arası seçim yaptığı, 1889 yılında “tohum ve toprak” teorisi olarak ileri sürülmüştür (Akhtar vd., 2019). Bu kapsamda, prostat kanser hücrelerinin özellikle kemik dokuda metastaz oluşturdıkları gösterilmiştir (Archer Goode vd., 2023). Mikrometastaz sonrasında, kanser hücrelerinin yeni dokuda büyüyüp makrometastaz veya kolonizasyon yapacaklarının bir zorunluluğu yoktur. Fakat bu hücreler sıklıkla hastalığın nüks etmesine neden olmaktadır (Unal vd., 2018).

2.1.4. Kanser Epidemiyolojisi

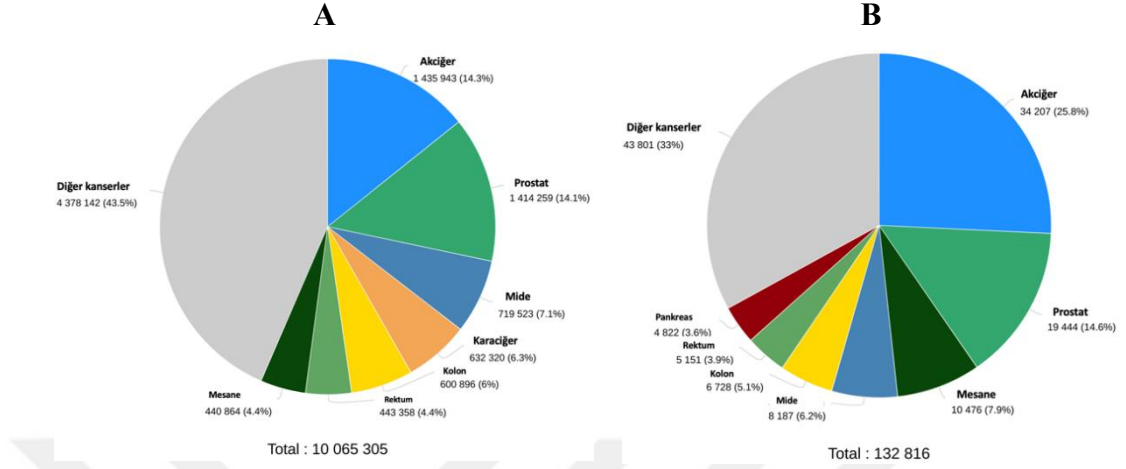
Dünyada ve Türkiye’de Kanser



Şekil 2.3 2020 yılında kanser vakaları. (A)Dünyada (B) Türkiye’de 2020 yılında Küresel Kanser Gözlem Verilerine (GLOBOCAN) göre kanser sayıları

Dünya Sağlık Örgütü’ne (WHO) bağlı olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’nın (IARC) 2020 yılı verilerine bakıldığında dünyada bütün kanserler dahil edildiğinde yeni vakaların 19.292.789 kişi olduğu ve ölüm sayısının ise 9.958.133 kişi olduğu görülmektedir. Bu sayılara Türkiye’de bakıldığında yeni vaka sayısının 233.834 olduğu ve ölüm sayısının da 126.335 olarak belirlendiği görülmektedir. Buna ek olarak, Türkiye’de 5 yıl içerisinde vaka sayısının 581.636 vakaya yükselmesi beklenmektedir. 75 yaşından önce kanser olma olasılığı %23,3 ve kanserden ölüm olasılığı ise %13 olarak belirlenmiştir. Dünyada ve Türkiye’de en sık görülen kanser tipleri meme, akciğer ve prostat kanserleri olarak belirlenmiştir (Cancer Today, 2022).

Dünyada ve Türkiye’de Prostat Kanseri



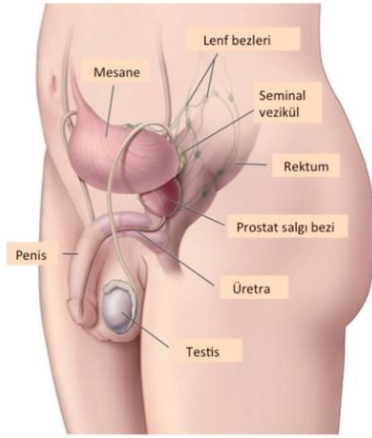
Şekil 2.4 2020 yılında erkeklerde görülen kanserler. (A)Dünyada (B) Türkiye’de 2020 yılında GLOBOCAN verilerine erkeklerde görülen kanser vakaları

WHO’nun verilerine göre 2020 yılında dünyada erkeklerde en sık gözlemlenen ikinci kanser tipi prostat kanseridir. Toplam kanser vakalarının %14,1’ini prostat kanser vakaları oluşturmaktadır. Buna ek olarak, prostat kanserinden ölen kişi sayısı 375.304 kişi ile 5. sıradadır. Türkiye’de bu sayılara bakıldığında ise, prostat kanser vaka sayısı 19.444 ile ikinci sırada yer almaktadır. Ölüm sayılarına bakıldığında Türkiye’de prostat kanserinden vefat eden kişi sayısı 5.464 kişidir. Gelecek 5 yıl için öngörülere göre her 100.000 kişiden 167’sinin prostat kanseri olacağı varsayılmaktadır (Cancer Today, 2022).

2.2. Prostat Kanseri

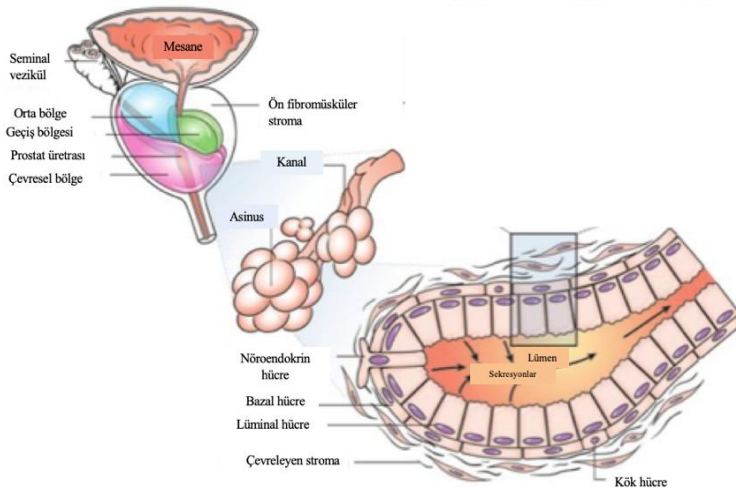
2.2.1. Prostat Anatomisi ve Biyolojisi

Yunancada "prostates" yani "koruyucu" veya "önde duran" anlamına gelen prostat, idrar ve üreme sistemlerinin kavşağında bulunmaktadır. Sağlıklı bir prostat, yetişkinlikte genellikle bir ceviz büyüklüğünde olup 15 ila 25 gram arasında bir ağırlığa sahiptir. Doğumda oldukça küçük olsa da ergenlik döneminde büyümekte ve 60 yaşından sonra ikinci bir büyüme evresine girmektedir.



Şekil 2.5 Erkek üreme ve idrar organları

Prostat, mesanenin altında, prostatik bölgede bulunan bir boşluğun içinde yer almaktadır. Erkek üreme sisteminde prostatın temel görevi, spermin bir bileşeni olan seminal sıvıyı üretmek ve depolamaktır. Bu seminal sıvı, Prostatik Asit Fosfataz (PAP) ve Prostat Spesifik Antijen (PSA) gibi çeşitli enzimleri içermektedir. PSA, spermin sıvılaştırılmasına katkıda bulunmaktadır. Seminal sıvının yaklaşık %10 ila %30'u prostat tarafından üretilirken, geri kalanı ise seminal vezikülden gelmektedir (Monge, 2008). Prostat, üç farklı anatomik bölgeden oluşmaktadır. Bunlar, üretra çevresinde bulunan geçiş bölgesi, ejakülasyon kanallarının etrafındaki merkezi bölge ve çevresel bölgedir. Her bir bölge için prostat kanseri görülme oranları ortaya konulmuştur. Bu kapsamda prostat kanserinin %75 ile en sık çevresel bölgede görüldüğü gösterilmiştir (Sathianathan vd., 2018).

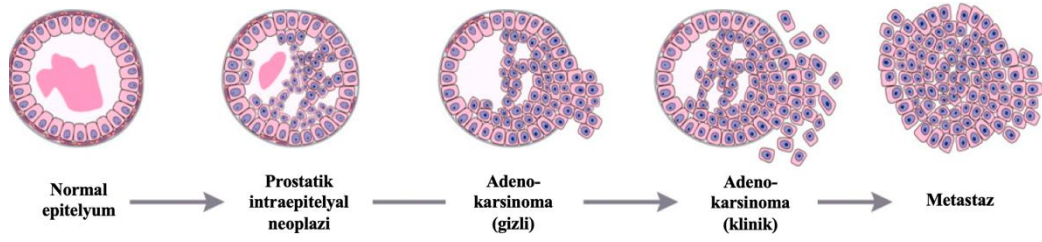


Şekil 2.6 Prostat bezinin anatomik ve hücresel yapısı (Lamb vd., 2011)

Rektumun önünde ve doğrudan mesanenin altında bulunan prostat, üretranın çevresini sarmaktadır. Erkek üretrasının iki temel işlevi vardır: miktasyon sırasında idrar atılımı ve ejakülasyon sırasında spermin taşınmasıdır. Ejakülasyon kanalları, prostatın içinde buluşmaktadırlar. Prostatın içerisinde, üretra, deferan kanalı (spermilerin testislerden çıkıp prostata ulaşmasını sağlayan) ve seminal vezikül (spermatozoitleri beslemek için sıvı üreten) ile bağlantı kurulmaktadır (Aaron vd., 2016; Lamb vd., 2011). Prostat bezi, asinus adı verilen bir dizi ögeden oluşmaktadır. Bu asinusların hücresel yapısına bakıldığında iki farklı yapıyla karşılaşılmaktadır: epitelyal doku ve stromal doku. Epitelyal doku, bazal ve lüminal olmak üzere iki farklı hücre katmanından oluşmaktadır. Bazal katman, kök hücreler ve farklılaşmamış bölünen hücrelerden oluşurken, lüminal katman ise farklılaşmış ve sekresyon yapan hücrelerden oluşmaktadır. Lüminal katman hücreleri, bazal katman hücrelerinin aksine Androjen Reseptörü (AR) eksprese etmektedirler (Liu & True, 2002). Stromal dokuda ise fibroblastlar, düz kas hücreleri, endotelyal hücreler, sinir hücreleri ve lenfatik hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler farklı büyüme faktörleri salgılayarak, epitelyal dokuda bulunan hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozunu kontrol etmektedir (Wong & Wang, 2000).

2.2.2. Prostat Kanseri Oluşumu

Prostat kanseri histolojik olarak 3 evreye ayrılmaktadır: Prostat Epitelyal İçi Neoplazma (PIN), adenokarsinoma ve metastaz. PIN aşamasında, prostat epitelyal hücrelerinde neoplazma dediğimiz anormal bir hücre proliferasyonu görülmektedir. Bu ise prostatta enflamasyona yol açmaktadır. Hücre proliferasyonunun artışı, DNA'da oluşan farklı mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak, telomerez enziminin aktivitesinin artışı bu aşamada görülmektedir. Adenokarsinoma aşamasında, hücreler bazal membranı geçip stromal dokuda da büyümektedir. Bu aşamada kanser hücrelerinde, embriyonik gelişimde aktif olan genler ifade edilmektedir. Son olarak, EMT gerçekleştiren kanser hücreleri, kan ve lenfatik dolaşıma geçerek metastaz yapmaktadır. Prostat kanser hücreleri en çok kemik dokuya metastaz yapmaktadır (Sekhoacha vd., 2022).



Şekil 2.7 Prostat kanserin oluşumu ve ilerleme evreleri (Sekhoacha vd., 2022)

Prostat, hormona bağlı bir organdır. Testosteron ve 5 α -dihidrotestosteron (DHT) hormonları, prostat epitelyal hücreleri üzerinde etkilidir. Bu hormonlar, prostat hücrelerinde AR'ye bağlanmaktadır. AR-hormon kompleksi hücre çekirdeğine girmekte ve ko-regülatörler eşliğinde, farklı gen ekspresyonlarını regüle etmektedir. Bu genler arasında en önemlisi ise PSA'dır (Feng & He, 2019). Fizyolojik olarak spermin sıvılaşmasını sağlayan bu enzim, prostat kanserinin ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda PSA artışının, proliferasyonu tetiklediği, apoptozu inhibe ettiği, metastazı ve anjiogenezi arttırdığı gösterilmiştir (Moradi vd., 2019). AR mutasyonu ve amplifikasyonu ise, metastatik prostat kanserlerinin %60'ında görülmektedir (Aurilio vd., 2020).

2.2.3. Prostat Kanserinin Risk Faktörleri

19. yüzyılda nadir bir hastalık olarak tanımlanan prostat kanseri, dünyada ve ülkemizde her geçen yıl artış göstermektedir. Tanı tekniklerinin gelişmesi ile kanserlerin tespiti kolaylaşmıştır. Buna ek olarak, ortalama yaşam süresinin artması ile prostat kanseri vakalarında artış gözlemlenmiştir. Prostat kanserinin prognoziğinin iyi olması, tanı ve tarama tekniklerinin geliştirilmesi ve tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Rakotondrahaso, 2019).

Prostat kanserinin başlıca risk faktörleri şunlardır:

- Yaş: Prostat kanseri 70 yaşındaki erkeklerde daha sık görülmektedir.
- Irk: Afrika kökenli kişilerin prostat kanserine daha yatkın oldukları gösterilmiştir.

- Aile: Kişinin ailesinde bir veya daha fazla prostat kanseri vakası varsa, kişinin prostat kanseri olma olasılığı artmaktadır. Buna ek olarak, akrabada prostat kanseri genç yaşta görüldüğü zaman, risk daha da artmaktadır.
- Kronik enflamasyon: Virüs, idrar reflüsü veya endokrin bozucular tarafından bağışıklık sisteminin gereksiz bir şekilde aktive edilmesi, reaktif moleküllerinin salınımına neden olmaktadır. Bu moleküller ise prostatın epitelyal hücrelerinin DNA'sını bozulmasına neden olmaktadır. DNA'sı bozulmuş hücreleri yenilemek için proliferasyonun artışı ve bu hücrelerinde mutajenik moleküllere maruz kalması prostat kanseri oluşumuna neden olmaktadır (Lamb vd., 2011).
- Yaşam tarzı ve yeme alışkanlıkları: Yapılan çalışmalar kırmızı ve yağlı et tüketiminin, prostat kanseri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Michaud vd., 2001). Diğer yandan, hormonlara benzeyen endokrin bozucu kimyasallar, prostat kanseri için önemli risk faktörleridir. Bu kimyasallar pet şişeler, makyaj malzemeleri, temizlik ürünleri, sentetik kıyafetler ve mutfak gereçleri gibi kaynaklardan vücudumuza girmektedirler. Bu endokrin bozucular, hormona bağlı bir doku olan prostatın epitelyal hücrelerine girerek AR'ye bağlanmakta ve gen ekspresyonunu deregüle etmektedir. Bu deregülasyon ise proliferasyon artışına ve kanser oluşumuna sebep olabilmektedir (Corti vd., 2022).
- Genetik bozukluklar: Farklı mutasyonların prostat kanseri için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Prostat kanserlerinin %80'inde görülen kromozom 8p bölgesinin kaybı, önemli bir risk faktörüdür. Bu bölge, NKX3-1 genini kodlamaktadır. Farede yapılan çalışmalarda, NKX3-1 mutant hayvanlarının bir sene içerisinde prostat kanseri geliştirdikleri gösterilmiştir. BRCA, PTEN, Akt, p53, telomeraz veya AR gibi genlerde oluşan mutasyonlar da prostat kanseri için önemli risk faktörlerdir (Lamb vd., 2011).

2.2.4. Prostat Kanseri Teşhisi ve Evreleri

Kanser teşhisi için PSA konsantrasyonu, rektal tuşe, Prostata Özgü Membran Antijeni Pozitron Emisyon Tomografi Taraması (PSMA PET-scan), Manyetik Rezonans Görüntüleme (EMAR), biyopsi gibi farklı metotlar birlikte kullanılmaktadır.

Prostatın epitelyal hücreleri tarafından salgılanan PSA, kanda eser miktarda bulunmaktadır. PSA konsantrasyonu, yaş ilerledikçe, prostat enfeksiyonunda (prostatit) ve prostat kanserinde artmaktadır. FDA tarafından onaylanan PSA ölçümü, prostat kanseri teşhisinde en önemli biyomarkördür. PSA konsantrasyonunun 4 ng/mL altında olması normal kabul edilmektedir. PSA konsantrasyonu 4 ile 10 ng/mL arasında olması prostat kanseri riskine işaret ederken, 10 ng/mL üzerindeki konsantrasyonlarda ise ileri seviye prostat kanserinden bahsedilmektedir (Bradford vd., 2006).

Prostat, fizyolojik olarak düz ve sıkı bir yapıya sahiptir. Rektal tuşe, invazif olmayan bir muayene tekniğidir. Prostatın rektumun önünde olması, doktorun prostata dokunmasına olanak sağlamaktadır. Rektal tuşe ile prostatta herhangi bir yapısal ve hacim değişikliği bu şekilde tespit edilebilmektedir (Sekhoacha vd., 2022).

Prostat kanserini evrelerini sınıflandırmak için farklı metotlar kullanılmaktadır. Tümör–Düğüm–Metastaz (TNM) sınıflandırılması tümörün boyutu (T), yakın bölgedeki lenfatik bezleri metastaz yapması (N) ve uzak dokulara metastaz yapması (M) üzerinden bir değerlendirme yapmaktadır (Hoedemaeker vd., 2000). Tablo 2.1’de her evre için alt sınıflandırmalar ve bunların tanımları gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Prostat kanserinde TNM sınıflandırması

Sınıf	Tanım
T1	Rektal tuşede fark edilmez ve klinik görüntülemeye görünmez
T1a	Tümör, rezeke edilen dokunun %5’ni oluşturur
T1b	Tümör, rezeke edilen dokunun %5’ten daha büyük bir oranını oluşturur
T1c	Yüksek PSA sonucu iğne biyopsisi ile yapılan teşhis edilen tümör
T2	Makroskopik olarak görülen ve rektal tuşede fark edilen
T2a	Bir lobun %50’sinden azını oluşturan tümör
T2b	Bir lobun %50’sinden çoğunu oluşturan tümör
T2c	Her iki lobda da görülen tümör
T3	Prostat kapsülünün dışına taşan tümör (Bu seviyede prostatın ekzisyonunun klinik bir anlamı kalmamaktadır)
T3a	Unilateral veya bilateral büyüyen tümör
T3b	Seminal veziküllere ulaşan tümör
T4	Tümör yakın bölgedeki dokulara (mesane, üretra, rektum) yayılması
N0	Lenf bezlerinde metastaz oluşmaması
N1	Lenf bezlerinde metastaz oluşumu
M0	Uzak bölgelerde metastaz oluşmaması
M1	Uzak bölgelerde metastaz oluşması (özellikle kemik dokusunda)

Prostat kanserini sınıflandırmak için kullanılan bir diğer metot ise 1966 yılında geliştirilen Gleason skorudur. Bu sınıflandırmada, biyopsi elde edilen dokularda hücrelerin farklılaşma seviyesine bakılmaktadır. İyi farklılaşmış kanser hücrelerine 1 verilirken, farklılaşmamış kanser hücrelerine 5 verilmektedir. Eğer biyopsi dokusunun tamamında aynı hücreler görülüyorsa, verilen sayı iki ile çarpılmaktadır. Eğer iki farklı hücre farklılaşma seviyesi görülüyorsa skor, görülen seviyelerin toplamıdır. Bu şekilde, Gleason skoru 2 ile 10 arasında değişebilmektedir. Gleason skoru 2 ile 4 arasındaysa düşük risk, 5 ile 6 arasındaysa ortalama düşük risk, 7 ise orta risk, 8 ile 10 arasındaysa yüksek risk olarak kabul edilmektedir (Lopez-Beltran vd., 2006).

Son olarak, D'Amico sınıflandırılması ise, TNM sınıflandırmasını, Gleason skorunu ve PSA seviyesini bir arada değerlendirmektedir (Preisser vd., 2020). Böylelikle 3 sınıf oluşmaktadır:

Tablo 2.2 Prostat kanserinde D'Amico sınıflandırılması

	TNM	Gleason skoru	PSA
Düşük risk	T1c veya T2	≤6	<10ng/mL
Orta risk	T2b	7	10-20ng/mL
Yüksek risk	T2c	>7	>20ng/mL

2.2.5. Prostat kanserinde kullanılan tedaviler

Tanı için kullanılan PSA ölçümü, Gleason skoru ve TNM sınıflandırması ile kişinin yaşı ve sağlık durumu, prostat kanseri hastasında kullanılacak tedavileri belirlemeye yardımcı olmaktadır. Düşük riskli hastalarda gözlemlene, prostatektomi ve radyoterapi kullanılmaktadır. Daha ileri seviyedeki hastalarda ise, cerrahi veya farmakolojik kastrasyon (kısırlaştırma) sonrasında Androjen Yoksunluğu Tedavisi (ADT) uygulanmaktadır ve olumlu sonuçlar vermektedir. Fakat, bu tedaviler Metastatik Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri (mCRPC) için olumlu yanıt oluşturmamaktadır. Bu nedenle, yeni tedavilerin geliştirilmesini gerektirmektedir (Sandhu vd., 2021).

Gözlemlene

Düşük riskli hastalarda veya ileri yaştaki hastalarda aktif gözlemlene yapılmaktadır. Bu kapsamda, kişinin aralıklarla kandaki PSA seviyesi ve tümörün

histolojik yapısı takip edilmektedir. Gözlemlene, hastanın erektil fonksiyonunu koruyarak, yaşam kalitesini etkilememekte ve gereksiz tedavilerden korumaktadır. Fakat takibin doğru yapılmaması veya hastalığın hızlanması, kanseri daha da agresifleştirebilmektedir (Sathianathen vd., 2018).

Prostatektomi

Prostatın cerrahi olarak tamamen alınmasına prostatektomi denilmektedir. Bu tedavi, metastaz oluşmamış ve lokal olarak gelişmiş tümörlü hastalara radyoterapi veya kriyoterapi tedavilerinden sonra uygulanmaktadır. Kanser yayılmasını engellemesine rağmen prostatektomi, yaşam süresinin azalmasına, erektil disfonksiyona ve idrar kaçırma gibi sorunlara neden olmaktadır (Costello, 2020).

Kriyoterapi

Kriyoterapide, prostatın içerisine probalar yerleştirilmekte ve -100 ile -200°C arasında 10 dakika boyunca prostat soğutulmaktadır. Bu şekilde kanser hücreleri öldürülmeye çalışılmaktadır. Buna rağmen sıklıkla, erektil disfonksiyon ve idrar kaçırma gibi sorunlar meydana gelmektedir (Mouraviev & Polascik, 2006).

Radyoterapi

Radyoterapi, prostat kanser tedavisinde en etkili metot olarak ortaya çıkmaktadır. Bu tedavide radyasyon verilerek, spesifik olarak kanser hücreleri hedeflenmektedir ve özellikle cerrahi işlem geçirmemiş hastalarda uygulanmaktadır. Bu amaçla farklı radyoterapi çeşitleri geliştirilmiştir:

- Brakiterapi yönteminde radyasyon kaynağı, direkt prostatın içerisine yerleştirilmektedir. Ardından düşük ve yüksek doz radyasyon verilerek, kanser hücreleri yok edilmeye çalışılmaktadır. Bir gün veya bir günden daha az süren bu tedavi, erektil fonksiyonu etkilemediği için düşük riskli hastalarda tercih edilen tedavilerin başında gelmektedir.
- Dış Işın Radyasyon Tedavisinde (EBRT), prostatı spesifik olarak hedefleyen X ışınları, hastaya dışarıdan verilmektedir. Bu metot özellikle orta ve yüksek riskli hastalarda, ADT ile kullanıldığında, metastatik hücreleri azaltmak için etkili olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, düşük riskli hastalarda, prostatektomiden daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Fakat bu tedavide,

kalp ve akciğer rahatsızlığı, kas ağrıları, erektil disfonksiyon ve idrar kaçırma gibi sorunlar da beraberinde gelmektedir.

- Radyum-233 terapisinin, ADT'ye direnç gösteren ve özellikle kemik metastazı oluşmuş hastaların, hayatta kalması ve iyileşmesi için önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kalsiyumu taklit eden bu molekül, kemik dokuda spesifik olarak prostat kanser hücrelerine girerek bu hücreleri öldürmektedir (Sekhoacha vd., 2022).

Hormonoterapi (ADT)

ADT, ilerlemiş ve metastatik prostat kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Terapötik mekanizması, testosteronun ve diğer androjen hormonlarının üretiminin bloke edilmesi üzerinedir. Androjenler, AR'lerine bağlanarak prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemektedirler (Liu & True, 2002) ADT'de, orşiektomi veya Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) agonistleri veya antagonistleri verilerek medikal kastrasyon yapılmaktadır. Bu tedavinin farklı tipleri düşük riskli hastalarda kullanıldığı gibi, ileri seviye metastatik hastalarda da kullanılmaktadır. Fakat bu tedavi kısa ve uzun vadede, kalp hastalıkları, insülin direnci ve cinsel bozukluklar gibi yan etkiler oluşturabilmektedir. Bu tedavinin kullanımından sonra, proliferasyonuna devam eden ve metastatik olan kanserlere mCRPC denilmektedir (Crawford vd., 2015; Molina & Belldgrun, 2011).

İmmunoterapi

İmmunoterapi veya biyolojik tedavi, kişinin kendi bağışıklık sistemini aktive ederek kanser hücrelerine karşı savaşmasını sağlamaktadır. Bu doğrultuda, özellikle mCRPC'lerde farklı immünoterapilere başvurulmaktadır. Bunlar başlıca, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, aşı bazlı immünoterapi ve adaptif immün hücre terapileridir. Terapi olarak etkili ve diğer tedavilere kıyasla daha az yan etkisi olması nedeniyle, bu tedavinin son yıllarda kullanımı ve araştırılması ön plana çıkmaktadır (Maselli vd., 2023).

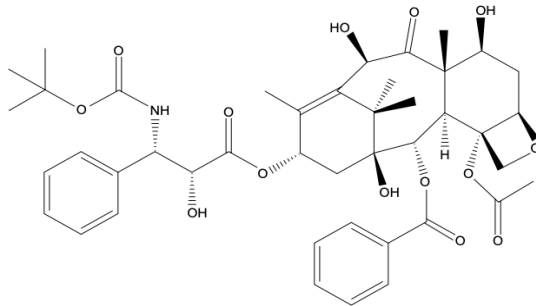
Kemoterapi

Kemoterapide, farklı ilaçlar kullanılarak spesifik olarak kanser hücreleri yok edilmeye çalışılmaktadır. Prostat kanseri tedavisinde özellikle kastrasyona direnç gösteren hastalarda, kemoterapi kullanılmaktadır. Prostat kanserinde en yaygın

kullanılan kemoterapötik ajan, (DCX) Docetaxel'dir. DCX, hücrede mikrotübüllerin depolimerizasyonunu engelleyerek, hücre bölünmesini inhibe etmekte ve hücreleri apoptoza götürmektedir. Fakat bazı durumlarda, prostat kanser hücreleri, Docetaxel'e karşı da direnç kazanmaktadır. Bu nedenle, Cabazitaxel veya Enzalutamide (EZA) gibi alternatif kemoterapötik ajanlar geliştirilmeye devam edilmektedir (Jain, 2005; Sandhu vd., 2021; Sekhoacha vd., 2022)

Yeni ve alternatif tedaviler

Yukarıda açıkladığımız tedavilere alternatif olarak son yıllarda, prostat kanser biyolojisinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması ve yeni tekniklerin geliştirilmesi ile farklı yöntemler araştırılmaktadır. Bu kapsamda, gen tedavisi ve Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri/Cas9 (CRISPR/Cas9) ile mutasyona uğramış hücrelerin DNA'sı onarılmaya çalışılmaktadır. Diğer yandan, nanoteknolojiyle ilaçların verimli bir şekilde kanser hücrelerine dağıtılarak prostat kanseri tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Sekhoacha vd., 2022). Bunlara ek olarak, WHO'nun desteği ve yönlendirmesi ile, geleneksel tıp tedavilerinin farklı hastalıklardaki etkileri aktif bir şekilde araştırılmakta ve kontrollü bir şekilde kullanımı teşvik edilmektedir (Okaiyeto ve Oguntibeju, 2021; "WHO traditional medicine strategy: 2014–2023"). Geleneksel tıpta özellikle şifalı bitkilerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Bu kapsamda, kanserin neden olduğu yan etkiler veya direkt kanser tedavi edilmektedir. Kemoterapide en yaygın olarak kullanılan DCX de, *Taxus baccata* bitkisinden elde edilmiştir (Şekil 2.8). Fakat, DCX'e dirençli kanserleri tedavi edebilmek için, yeni bitkilerin keşfi ve bu bitkilerde bulunan aktif moleküllerin araştırılması önem kazanmıştır. Bu doğrultuda, kenevirde bulunan kannabinoidlerin, prostat ve diğer kanserler üzerindeki etkisi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiş olup, ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (Dariš vd., 2019).

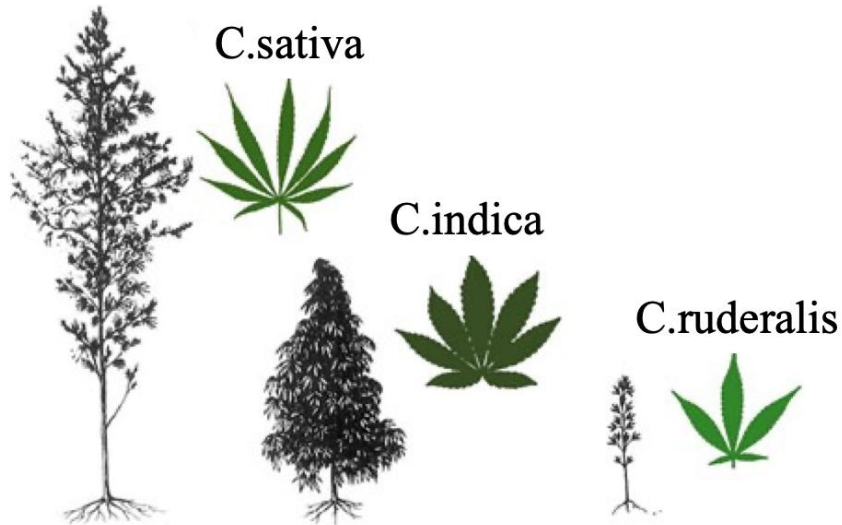


Şekil 2.8 DCX'in moleküler yapısı (Sohail vd., 2018)

2.3. Kenevir

2.3.1. Kenevir Bitkisi

Kendir veya esrarotu olarak da bilinen kenevir *Cannabaceae* ailesine ait bir bitkidir. *Cannabis* cinsine ait bu bitkinin türleri konusunda farklı sınıflandırmalar mevcuttur. İlk olarak, 1753 yılında Carlous Linnaeus tarafından bütün kenevirler *Cannabis sativa* L. olarak adlandırılmıştır. Fakat, 1785 yılında Jean-Baptiste Lamarck'ın yeni bir tür olarak *Cannabis indica*'yı öne sürmesi ile, kenevirin adlandırılmasında farklı görüşler ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde, 1924'te Janischevsky tarafından keşfedilen *Cannabis ruderalis*'de yeni bir *Cannabis* türü olarak tanıtılmıştır. *Indica* ve *ruderalis* türlerini, *Cannabis sativa*'nın alt türleri olarak tanımlayan botanikçiler olmasına rağmen kenevir, yaygın olarak 3 türe (*Cannabis sativa*, *Cannabis indica* ve *Cannabis ruderalis*) ayrılmaktadır. Her türün altında da alt türlerin olduğu ve keşfedilen 700 alt türün olduğu belirtilmektedir.



Şekil 2.9 Kenevir türleri (McPartland, 2018)

Cannabis sativa en yaygın olan kenevir türüdür. Yağ ve lif yönünden çok zengin olan bu türün uzunluğu 6 m'ye ulaşabilmektedir. Uzun, ince ve gevşek bir dallanma göstermektedir. *Cannabis indica* (Hint keneviri), yağ ve lif yönünden zengin olmasa da psikoaktif moleküller yönünden zengin olması ile öne çıkmaktadır. Piramidal ve yoğun bir dallanmaya sahip olan bu tür, uzunluk olarak 90 ile 250 cm'ye kadar büyümektedir. Son olarak, *Cannabis ruderalis*, yabani kenevir olarak bilinmekte

ve diğer türlere kıyasla, daha kısa ve seyrek bir dallanmaya sahiptir. Bu tür özellikle, Orta ve Doğu Avrupa bölgelerinde doğal olarak yetişir; lifleri kullanım için uygundur, ancak psikoaktif molekül bakımından zengin değildir (Çalışkan & Yildirim, 2020; Dochez-Arnault, 2022; Pattnaik vd., 2022). Kenevir bitkisi, erkek ve dişi olarak ikiye ayrılmaktadır. Erkek bitkiler daha çok polen üretirken aktif molekül yönünden zengin değildirler. Dişi yapraklar ve çiçeklerde trikom adı verilen salgı tüyleri ikincil metabolitler üretilmektedir. Bu nedenle, aktif moleküllerin izolasyonu için kullanılmaktadır.

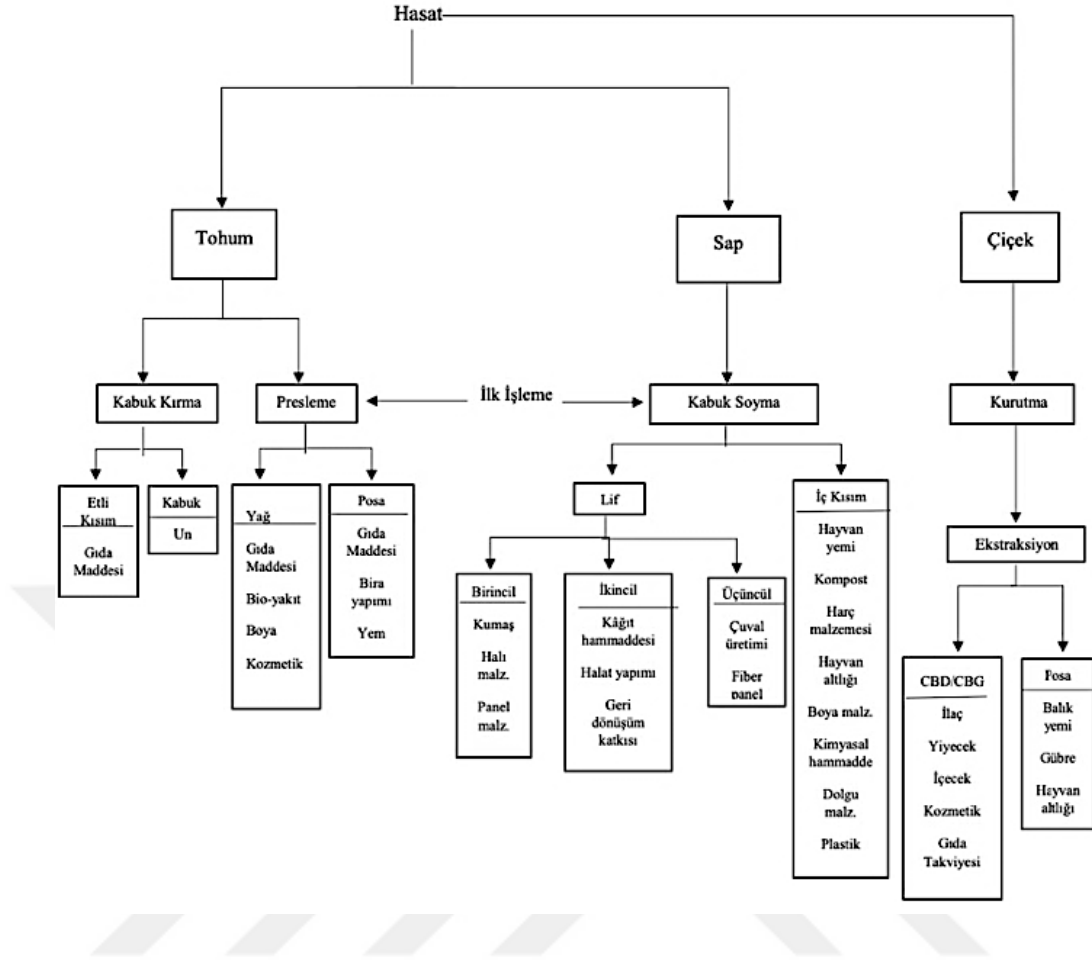
2.3.2. Tarihte Kenevirin Kullanım Alanları

Tarihte, kenevirden ilk olarak Milattan Önce (M.Ö) 3200 yılında bilinen en eski Çin farmakopesinde bahsedilmiştir. Eski Yunan ve Roma dönemlerinde de kullanıldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Tıp tarihinde önemli bir yere sahip olan İbn-Sina'nın El-Kanun Fi't-Tıb kitabında da kenevirden bahsedilmektedir. Avrupa ise keneviri, 13. yüzyılda Marko Polo ile keşfedip kullanmaya başlamıştır. Fransa ve İngiltere'de 18. yüzyılda yaygınlaşan kenevir, 1850 yılında Amerikan farmakopesine girmiştir. Fakat 1928 yılında, kenevirin uyuşturucu olarak kullanımının artması nedeniyle yasaklanmıştır. 1970 yılında ise Amerika'da kenevirin ekilmesi, satılması ve her türlü kullanımı yasaklanmıştır. Bu durum, kenevirin kötü kullanımını azaltmış olmasına rağmen bilimsel araştırmaları da negatif yönde etkilemiştir. 1964'te kenevirin içeriğinde, bilinç üzerinde etki eden molekülün THC olduğu keşfedilmiştir. Ardından, 1988 yılında Endokannabinoit sisteminin (ECS) ortaya konulması ile kenevir bitkisi, bilimsel yönden tekrar popüler olmuştur. Böylece, 1996 yılında Amerika'da medikal kenevir kullanımı, 29 eyalette tekrar serbest hale gelmiştir. Buna ek olarak, Kanada ve Avrupa ülkelerinde de bu yönde kararlar alınmaya başlanmıştır. Son yıllarda, kenevir üzerinde yapılan bilimsel araştırmaların artışı ve olumlu sonuçların elde edilmesi, tıbbi kenevirin kullanımının önemli olduğunu göstermiştir. Bu da kenevir bazlı yeni ilaçların gelişmesini sağlamıştır (Çalışkan & Yildirim, 2020).

Amerika'da getirilen yasaklamalar sonrasında, 1940 yılında Türkiye'de, kenevirin tıbbi kullanımı "*Herba Cannabis Indica*" ve "*Extra Cannabis Indica*" adı altında bulunan ilaçlar, ilaç kodeksinden çıkarılmıştır. Buna ek olarak, kenevirin diğer alanlarda kullanımı da azalmıştır. Tekstil sektöründe sentetik ürünlerin gelişmesi,

kâğıt üretiminde yurtdışından ihracatın daha ucuz olması ve kenevirin terörü finanse eden bir kaynak olarak görülmesi, bu düşüşün önemli sebeplerindendir. Fakat 2019’da ülkemizde, “Cumhurbaşkanlığı Hükümet Sisteminde Yerel Yönetimler Sempozyumu” sırasında cumhurbaşkanı tarafından kenevir üretiminin önemine değinilmiştir. Devamında, farklı bakanlıklar ve üniversiteler ile ortak “Türkiye’de Endüstriyel Kenevir Yetiştiriciliği Raporu ve Eylem Planı” hazırlanmıştır. Bu kapsamda, yerli kenevir popülasyonlarının artırılması, yerel tohumların tescillenmesi ve kenevire dayalı sanayinin gelişmesi için Samsun On Dokuz Mayıs ve Yozgat Bozok Üniversitelerinde Kenevir Enstitüleri kurulmuştur. Kenevir ekimi, 2016 yılında yayınlanan yönetmeliğe tabidir ve eylem planı açıklanması sonrasında kenevir üretiminde artış görülmüştür (Başer & Bozoğlu, 2020).

Kenevir, çevre dostu ve ekolojik bir bitki olarak bilinmektedir. Çok az suya ihtiyaç duyarak hızlı bir şekilde ve farklı coğrafyalarda kolaylıkla yetiştirilebilir. Ayrıca, hastalıklara karşı direnç göstermesi sayesinde tarımda sürdürülebilirliği artırır. Kenevirin bu özellikleri, onu hem çevreye duyarlı hem de ekonomik açıdan avantajlı bir hale getirmektedir. Kenevir bitkisinin sap, tohum ve çiçeklerinden faydalanılmaktadır. Bitkinin tohumu, sapı ve çiçek kısmı farklı alanlarda kullanılmaktadır. Kenevir tohumu un olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır. Saptan elde edilen lif kumaşa ve kâğıt hammaddesine dönüştürülmektedir. Bu kapsamda, Şile ve Rize bezlerinin üretiminde bu lifler kullanılmaktadır. Liflerden geri kalan iç kısım ise hayvan yemi ve inşaat sektöründe kullanılmaktadır. Kenevir çiçeğinden ekstraksiyon ile elde edilen moleküller ise, biyoaktif olarak adlandırılmakta ve gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmektedir (Kenevir-raporu; 2021).



Şekil 2.10 Kenevirin kullanım alanları

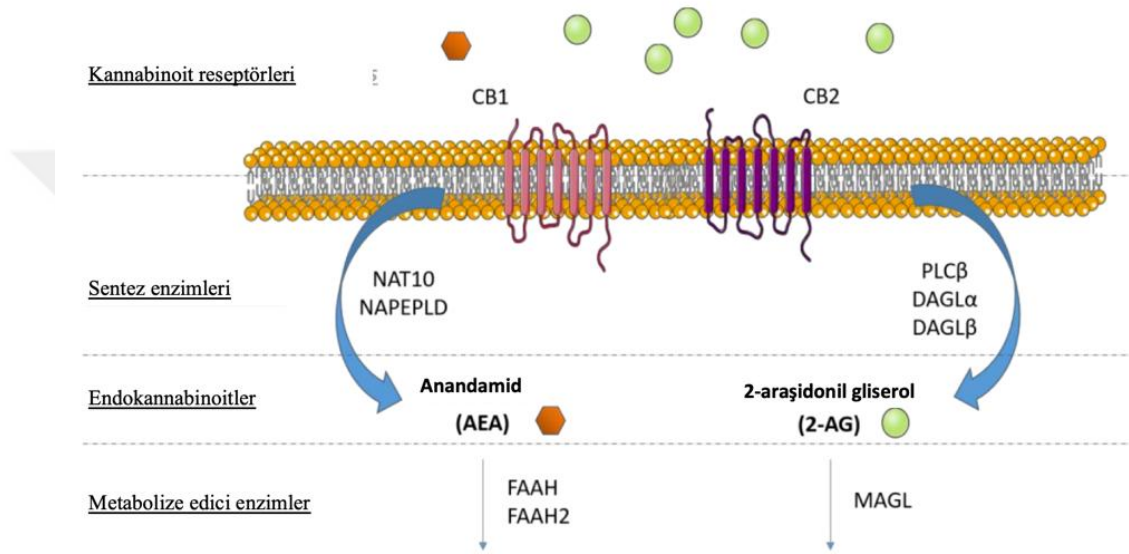
2.4. Kannabinoitler ve Endokannabinoit Sistem

Kenevir, kannabinoitler, terpenler, terpenoitler, polifenoller ve flavanoitler gibi 500’den fazla farklı biyoaktif molekül içermektedir (Radwan vd., 2021). Son yıllarda bu moleküller üzerinde yapılan araştırmalar, önemli oranda artmış bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda bu moleküllerin, Alzheimer, anksiyete, diyabet, epilepsi, şizofreni, Tourette sendromu, kemoterapiye bağlı kusma ve kanser gibi hastalıklara iyi geldiği gösterilmiştir (Çalışkan & Yildirim, 2020). Kenevirde bulunan biyoaktif moleküller arasında en çok öne çıkan sınıf ise, kannabinoitlerdir. Kenevir bitkisi tarafından üretilen kannabinoitler, fitokannabinoit olarak adlandırılırken, insan hücreleri tarafından endojen olarak üretilenlere ise endokannabinoit (endoCB) adı verilmektedir.

2.4.1. Endokannabinoit Sistem

EndoCB'ler, Kannabinoit Reseptörleri (CBR) ve bu ikisinin sentezinde, taşınmasında ve metabolizmasında rol oynayan moleküllerin tamamına ECS adı verilmektedir (Atakan, 2012).

ECS'nin tanımı



Şekil 2.11 Endokannabinoit sistem ve öğeleri (Dochez-Arnault, 2022)

Ligandlar

İnsan ve fare hücrelerinde bulunan endoCB'ler, parakrin ve otokrin moleküller olup hem komşu hücreler üzerinde hem de molekülü sentezleyen hücreler üzerinde etkilidirler. Bu etkiyi endoCB reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedirler. İnsanda iki büyük endoCB ailesi bulunmaktadır: N-asiletanolamin (NEA) ve Monoasilgliserol (MAG). NEA ailesine ait Anandamid (AEA) ve MAG ailesine ait 2-Araşidonil Gliserol (2-AG), en iyi tanımlanmış endoCB'lerdir. EndoCB'ler, hücre membranından farklı enzimlerin etkisi sonucu sentezlenmektedirler. Bu ligandların sentezi, farklı stimülasyonlar sonrası hücre içi kalsiyumun artması ile gerçekleşmektedir. Bu sentezde N-Asetiltransferaz 10 (NAT10), N-Asil Fosfatidiletanolamin-Spesifik Fosfolipaz D (NAPE-PLD), Fosfolipaz C-β (PLCβ), Diaçilgliserol Lipaz α (DAGLα) ve Diaçilgliserol Lipaz β (DAGLβ) gibi enzimler rol

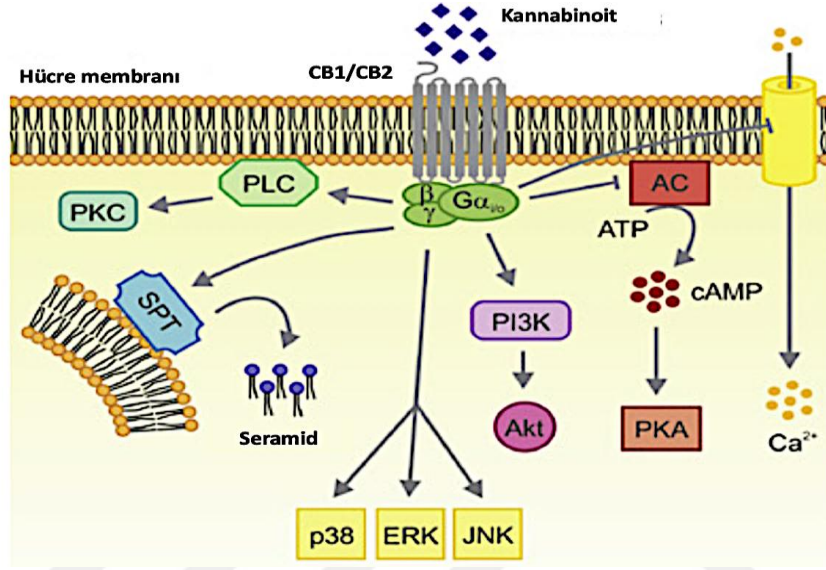
oynamaktadır (Dochez-Arnault, 2022; Gabrielli vd., 2015). EndoCB'ler reseptörlerine bağlanıp etki ettikten sonra metabolize edilmektedirler. EndoCB'lerin metabolizmasında farklı enzimler rol almaktadır. AEA için Yağ Asidi Amid Hidrolaz (FAAH) ve Yağ Asidi Amid Hidrolaz 2 (FAAH2) enzimleri en çok öne çıkanlardır. Bu enzimlerin ekspresyonu, dokulara göre farklılık göstermektedir. Prostat dokuda, FAAH ve FAAH2 enzimlerinin ikisi de görülürken, testis dokuda sadece FAAH eksprese olmaktadır (Wei vd., 2006). Bu enzimlere ek olarak, Siklooksijenaz-2 (COX-2), 5-Lipoksijenaz (5-LO) 12-Lipoksijenaz (ALOX12), 15-Lipoksijenaz-1 (ALOX15) ve sitokrom P450 ailesine ait enzimlerde, AEA'nın metabolize edilmesini sağlayabilmektedir (Ueda vd., 2013). 2-AG ise, %85 oranında Monoaçilgliserol Lipaz (MAGL) tarafından hidrolize edilmekle birlikte, Alkol Dehidrojenaz 12 (ADH12) ve COX-2 enzimleri tarafından da metabolize edilmektedir (Blankman vd., 2007). EndoCB'lerin sentezi ve metabolize edilmeleri hücre içinde, reseptörlerine bağlanmaları ise hücre dışında gerçekleşmektedir. Polar moleküller olan endoCB'ler, hücreye girip çıkmak için aktif bir taşıma sistemine ihtiyaç duymaktadırlar. Yapılan çalışmalarda, bu taşımanın Adenozin Trifosfat (ATP) veya Kalsiyum İyonu (Na^{2+}) transportörleri tarafından yapılmadığı, bunun aksine özelleşmiş endoCB membran transportörleri tarafından yapıldığı düşünülmektedir (Chicca vd., 2012; Nicolussi & Gertsch, 2015).

Reseptörler

CBR1 ve CBR2

ECS'de CBR olarak CBR1 (CB1) ve CBR2 (CB2) iki reseptör bulunmaktadır. Bu iki reseptör, amino asit dizisi olarak %44 homoloji göstermektedir. CB1'ler daha çok, merkezi sinir sistemi hücrelerinde bulunsalar da akciğer, kemik, kalp, pankreas ve prostat gibi hücrelerde de az miktarda görülmektedirler. CB2 ise daha çok bağışlık hücrelerinde önemli miktarda ekspres edilmektedir. Buna ek olarak, daha az miktarda merkezi sinir sistemi, akciğer ve testislerde ekspres olmaktadır (Dochez-Arnault, 2022; Pacher vd., 2006). CB1 ve CB2 reseptörleri G Proteinine Bağlı Reseptörlerdir (GPCR). Transmembraner olan GPCR'lerin peptit zinciri, membrandan yedi defa geçmektedir. Ekstrasellüler kısım ligandı bağlarken, intraselüler kısım G proteinine bağlıdır. G proteini, üç tane alt üiteden oluşmaktadır: α , β , γ . Reseptör herhangi bir liganda bağlı olmadığında, G proteini trimerik ($G\alpha\beta\gamma$) şekilde bağlıdır. Bu durumda $G\alpha$ alt üite Guanosin Difosfat'a (GDP) bağlıdır. Reseptöre ligandın bağlanması,

reseptörde konformasyonel değişime neden olmakta ve reseptörün G proteinine daha sıkı bağlanmasına ve Guanin Nükleotid Değişim Faktörü (GEF) rolünü üstlenmesine sebep olmaktadır. Bu ise $G\alpha$ alt ünitenin GDP'sini Guanosin Trifosfat (GTP) ile değiştirmesiyle aktif hale gelmesi ve $G\beta\gamma$ alt ünitelerinden ayrılıp farklı proteinleri ve ikincil mesajcıları aktive veya inhibe etmesini sağlamaktadır (Milligan & Kostenis, 2006).



Şekil 2.12 Kannabinoit reseptörleri ve sinyal yolları (Angelina vd., 2020)

Alternatif kırpma (splays) ile oluşan farklı $G\alpha$ alt ünite aileleri bulunmaktadır: G_i , G_s , G_q ve $G_{12/13}$. CBR'lere bağlı G proteinlerin çoğunluğun $G\alpha$ alt ünitesi $G_{i/o}$ ailesine aittir. Bu aile ise Adenilat Siklaz (AC) inhibisyonu ile ilişkilendirilmektedir. Fakat diğer yandan, $G\beta\gamma$ alt ünitesinin serbest kalması, AC'yi stimüle edebilmektedir. Buna ek olarak, CB1 reseptörü farklı reseptörlerle de heterodimer oluşturabilmektedir. CB1'in, Dopamin D2 reseptörü ile dimer oluşturduğu zaman AC'yi aktive ettiği gösterilmiştir. CB1 reseptörünün bazen bağlı olduğu G proteinin, $G\alpha$ alt ünitesinin G_s olabildiği ve bu şekilde AC'yi aktive edebildiği gösterilmiştir. CB2'inde G_s 'ye bağlanabilme hipotezini onaylamak için daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir. CB1'ler hücre membranında bulunan iyon kanalları üzerinde etkilidirler. EndoCB'lerin fiksasyonu, kalsiyum kanallarını inhibe ederken, potasyum kanallarını aktive etmektedir. Son olarak CB1 ve CB2'lerin, Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz (MAPK) yolağında bulunan Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazı (ERK), p38'i ve

Jun N-terminal Kinazı (JNK) aktive ettiği gösterilmiştir. Bu yolağın aktivasyonu ise, Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) aktivasyonuna, AC'nin inhibisyonuna ve seramid üretiminin artışına neden olmaktadır. Bütün bu yolakların regülasyonu ise, hücrenin yaşam ve ölümüne karar vermektedir (Deveaux, 2008; Dochez-Arnault, 2022; Howlett, 2002, 2005; Kearn vd., 2005; Muller, 2017).

TRP kanalları

CB1 ve CB2'lerine ek olarak alternatif endoCB reseptörleri bulunmaktadır. Bunlar “Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları (TRP)” olarak adlandırılmaktadır. TRP'lerin transmembraner bölgeleri ve iyon kanalı oluşturan bölgeleri bulunur. Nosisepsiyon, mekanosepsiyon ve ısı duyarlılığı gibi farklı hücre mekanizmalarında rol oynamaktadırlar. TRP ailesi 7 alt gruba ayrılmaktadır: TRP Kanonik (TRPC), TRP Vanilloid (TRPV), TRP Ankirin Alt Ailesinin Tek Üyesi (TRPA1), TRP Melastatin (TRPM), TRP Polistatin (TRPP), TRP Mekanoreseptör Olmayan Potansiyel C (TRPN) ve TRP Mukolipin (TRPML). Bu reseptörlerden kannabinoitler ile etkileşimde olanlar ise TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM8 ve TRPA1 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, bu reseptörler iyonotropik kannabinoit reseptörleri olarak adlandırılmaktadır (Di Marzo ve De Petrocellis, 2010; Díaz-Laviada, 2011).

PPAR çekirdek reseptörleri

Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler (PPAR), çekirdek reseptörü veya diğer adıyla transkripsiyon faktörleridirler. PPAR proteini, Retinoid X Reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturmakta ve DNA üzerinde bulunan PPAR Tepki Elemanlarının (PPRE) sekanslarına bağlanmaktadır. PPAR'ler fitokannabinoitler ve endoCB'ler tarafından aktive edilerek, ECS'ye dahil edilmektedir. PPAR'ler, farklı hücre mekanizmalarını regüle etmektedir. PPAR ailesinin, 3 üyesi bulunmaktadır: PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ . PPAR γ , adipogenezde ve glukoz/lipit metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Iannotti & Vitale, 2021; Sikka vd., 2012). Bu nedenle PPAR agonistleri, insüline dirençli diyabet tip II hastalarında kullanılmaktadır (Hartley & Ahmad, 2023). Yapılan bazı çalışmalarda PPAR γ 'nın, prostat kanserinin patofizyolojisine katkı sağladığı ortaya konulmuştur. Normal prostat hücrelerinde PPAR γ görülmezken, prostat kanseri hastalarından alınan örneklerde anlamlı seviyede PPAR γ tespit edilmiştir. Fakat yapılan çalışmada, PPAR γ pozitif olan hastaların PSA'larının ve Gleason skorlarının, PPAR γ negatif olan hastalara kıyasla daha düşük

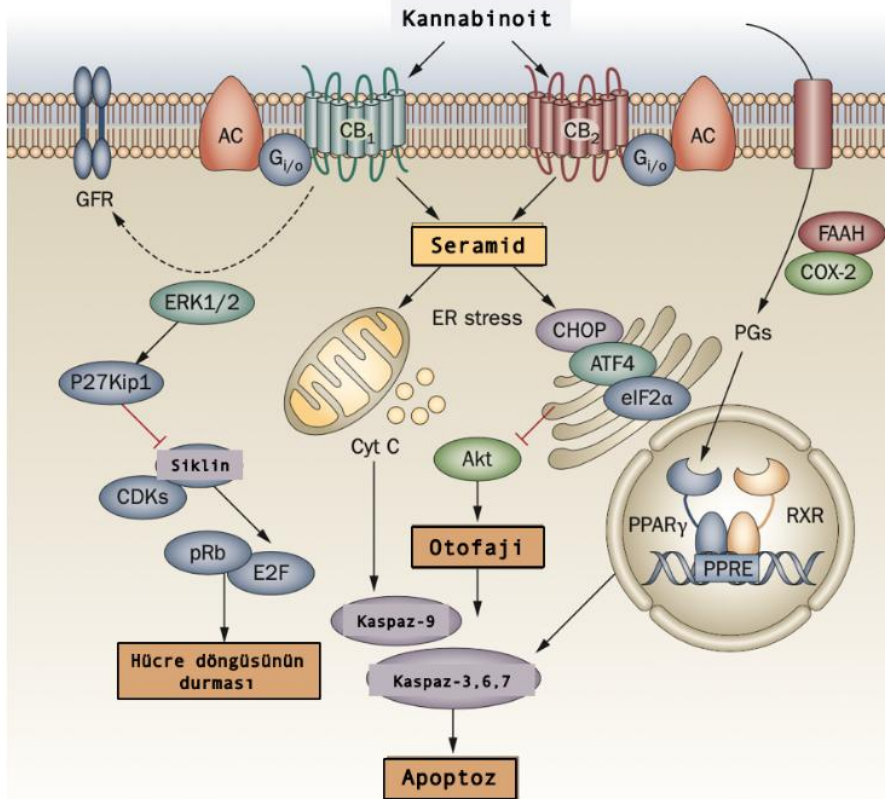
olduğu gösterilmiştir (Nakamura vd., 2009). Diğer yandan, PC3 ve DU145 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda da PPAR γ 'nın, normal hücrelere göre daha fazla miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir (Kubota vd., 1998). Buna ek olarak yapılan çalışmalarda PPAR γ agonistlerinin, prostat kanser hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. PPAR γ 'ın aktivasyonunda birbiri ile zıt görüşler bulunmasına rağmen, PPAR γ 'nın anti-enflamatuvar etkisinin olması (Iannotti & Vitale, 2021) ve PPAR γ 'nın aktivasyonun farklı kanser türlerinde kanserin inhibisyonunu (Ramot vd., 2015) sağlaması, PPAR γ 'ı hedef alan terapiler prostat kanseri tedavisi için potansiyel taşımaktadır.

ECS ve prostat kanser ilişkisi

Normal prostat dokusunda, ECS'nin farklı elemanları tespit edilmiştir. CB1'ler, parasempatik afferent sinirlerde ve asinus epitelyasında görülmektedir. CB1'in prostata gelen nöron hücreleri üzerinde bulunması, prostatın kasılmasını sağlamaktadır. CB1'in epitelyal dokuda bulunması ile de prostat sekresyonlarının kontrol edildiği düşünülmektedir. Diğer yandan normal prostat dokuda, FAAH ekspresyonu da görülmektedir. FAAH özellikle yetişkin prostatta ergenlikten sonra eksprese olmaktadır, bu ise androjenler tarafından regüle edildiğini göstermektedir. Bu doğrultuda ECS'nin, prostatın büyümesinde ve gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Normal prostat dokuda TRP bulunmaktadır. Örneğin TRPA1, CB1 ile nöronal ve epitelyal hücrelerde ko-lokalize olurken, TRPV1 bazal membranın altında, interstisyel, epitelyal ve nöronal hücrelerde görülmektedir. ECS'nin öğelerinden endoCB'ler, seminal sıvıda bulunmakta ve sperm fertilizasyonunu regüle etmektedir (Díaz-Laviada, 2011).

Sonuç olarak, ECS'nin, prostatın işleyişinde aktif bir rol oynadığını göstermektedir. Prostat kanserinde ise, bu sistemde bozulmalar görülmektedir. Örneğin, CB1'in kanser hücre hatlarında, normal hücre hatlarına kıyasla daha fazla ifade olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, 339 hasta örneğinde yapılan analizlerde CB1'in, kanser dokularında normal dokulara kıyasla daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde FAAH enziminin de, prostat tümör biyopsilerinde daha fazla ifade edildiği gösterilmiştir. CB1 ve FAAH ifadelerinin, hastalığın seviyesiyle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Chung vd., 2009; Czifra vd., 2009; Endsley vd., 2008; Thors vd., 2010). CB2'nin de ekspresyonunun, PC3, DU145 ve LNCaP prostat kanser hücre hatlarında arttığı gösterilmiştir. CB2'nin agonistlerle aktivasyonunun ise, hücre

döngüsünü ve büyümesini durdurduğu tespit edilmiştir. Bu tespit, klinik yönden ümit vericidir. Çünkü, CB2 agonistleri, psikoaktif etki oluşturmamaktadır (Singh vd., 2021). Ayrıca, yapılan çalışmalarda CB1 ve CB2 reseptörlerinin, prostat kanseri hücrelerinde aktivasyonunun apoptozu ve otofajiyi artırdığı, hücre döngüsünü ise durdurduğu tespit edilmiştir. Prostat kanserinde farklı TRP reseptörlerinin ekspresyonunda deregülasyon görülmektedir. Prostat kanserinde farklı TRP'lerin ekspresyonunda deregülasyon görülmektedir. Örneğin TRPV1'nin ekspresyonunun, normal prostat hücrelerine kıyasla, kanser hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, TRPV1'in agonist tarafından aktivasyonunun ise, kanser hücrelerinde pro-apoptotik bir stimülasyon olarak algılandığı ortaya konulmuştur. Kanser hücrelerinde artış gösteren TRP'lerden biri olan TRPV4'in aktivasyonunun ise, kanser hücrelerinin büyümesini bloke ettiği gösterilmiştir. Prostat kanserinde TRPM8'in de ekspresyonunda bir artış gözlemlenmektedir. TRPM8'in antagonistle bloke edilmesi ise, prostat kanser hücrelerinin büyümesini durdurmaktadır (Chinigò, 2022; Díaz-Laviada, 2011; Ochoa vd., 2023).



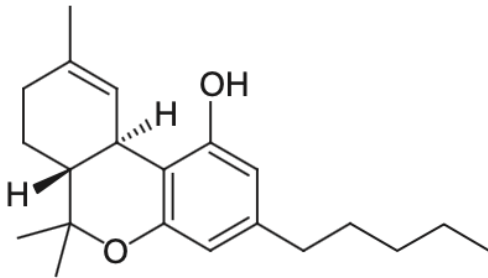
Şekil 2.13 Prostat kanseri hücrelerinde kannabinoit reseptörlerinin aktivasyonu (Díaz-Laviada, 2011)

2.4.2. Fitokannabinoitler

ECS'nin keşfinde, fitokannabinoitler yani kenevir bitkisinden izole edilen kannabinoitler, önemli rol oynamıştır.

Kenevirin psikoaktif etki oluşturmaya sebep olan Tetrahidrokannabinol (THC) molekülünün 1964 yılında keşfinden sonra araştırmacılar, THC'nin beyinde hangi reseptörlere bağlandığını keşfetmişlerdir. Devamında ise, CB1 olarak adlandırdıkları bu reseptöre bağlanan endojen ligandlar keşfedilmiştir. Bu tarihten itibaren hem ECS hem de fitokannabinoitler üzerine birçok çalışma yapılmış ve önemli mekanizmalar ortaya konulmuştur (Crocq, 2020). Kenevir bitkisinde, 100'den fazla fitokannabinoit tespit edilmiştir. Kenevirde, THC, Kannabidiol (CBD) ve CBG molekülleri en yüksek miktarda bulunurken, Kanabikromen (CBC), Kannabinol (CBN) veya Kannabinodiol (CBDV) gibi moleküller daha az miktarda bulunmaktadır (Jastrzab vd., 2022).

THC



Şekil 2.14 *THC'nin moleküler yapısı* (Russo & Marcu, 2017)

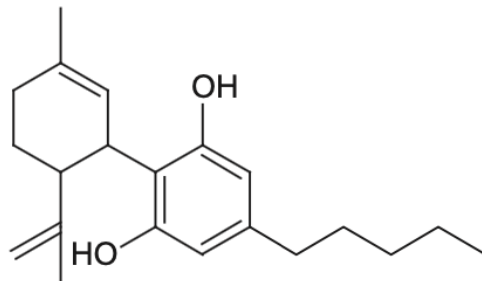
THC veya Δ^9 -THC olarak adlandırılan tetrahidrokannabinol, kenevirde en önemli miktarda bulunan ve psikoaktif etki oluşturan moleküldür. Bu nedenle “esrar”, “marijuana” veya “uyuşturucu” olarak kullanılmaktadır. Psikoaktif etki; bir molekülün merkezi sinir sistemi üzerine etki etmesi, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olması olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçte duygu, algı, ruh hali, bilinç ve diğer psikolojik durumlarda değişiklikler görülmektedir. Yağda çözülen bir yapıya sahip olan THC, kan/beyin bariyerini geçebilme kapasitesine sahiptir. Psikoaktif etkisini ise, özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerinde çoklukla bulunan CB1 reseptörlerine bağlanarak ve aktive ederek sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalarda THC'nin, anti-enflamatuvar ve ağrı kesici özelliği ortaya konulmuştur (Russo & Marcu, 2017). Diğer yandan düşük dozda THC verilen yaşlı farelerde, yeni nöronların oluştuğu gözlemlenmiştir (Suliman vd., 2018). Yapılan başka bir çalışmada, Alzheimer hastalığında, beyinde biriken β -amiloid proteini ile THC'nin etkileşime girdiği ve agregat oluşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Cao vd., 2014). Diğer yandan THC'nin CB2 agonisti olması, nöroinflamasyonu engellemektedir. Tüm bunlar da THC'nin, Alzheimer'da potansiyel terapi olarak öngörülmesini sağlamaktadır (Çalışkan & Yildirim, 2020).

THC'nin birçok kanser üzerindeki etkinliği, Prateeksha ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yayınlanan derlemede ortaya konulmuştur (Prateeksha vd., 2023). Örneğin, THC'nin CB1 ve CB2 reseptörlerini aktive ederek, glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Buna ek olarak, farelerde yapılan *in vivo* çalışmalarda ve pilot bir klinik denemede olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Guzmán vd., 2006; Koltai & Shalev, 2022).

THC'nin prostat kanseri üzerindeki etkisini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birinde THC'nin, PC3 prostat kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak, apoptozu tetiklediği ortaya konulmuştur (Ruiz vd., 1999). THC, kanserin gelişimini inhibe etmekle birlikte, kanser ve kemoterapiye bağlı bulantıları azaltmak için kullanılmaktadır. Bu kapsamda, Marinol™, Syndros™ ve Cesamet™ gibi THC veya sentetik THC içeren ilaçlar FDA onayı almıştır. THC içeren ve FDA onayı alan bir diğer ilaç ise Sativex'dir. Bu ilaç ise THC'ye ek olarak CBD içermektedir ve multipl skleroza bağlı spastisitede, nöropatik ağrılarda ve kansere bağlı ağrılarda kullanılmaktadır (Çalışkan & Yildirim, 2020).

CBD



Şekil 2.15 CBD'nin moleküler yapısı (Russo & Marcu, 2017)

CBD, yapısal olarak THC molekülüne benzemektedir. Fakat THC'nin aksine psikoaktif etki oluşturmamaktadır. CB1 ve CB2 reseptörlerine düşük afinite ile bağlanırken, dolaylı olarak veya doğrudan ECS'de olan diğer reseptörler üzerinden etki etmektedir (O'Brien, 2022). 1963 yılında CBD'nin ilk keşfedildiği zamanlarda, biyolojik bir aktivitesinin olmadığı düşünülmüştür. Bu nedenle de CBD üzerine çok fazla araştırma yapılmamıştır. Günümüzde ise, CBD ile alakalı birçok farklı hastalıklar üzerine araştırmalar yapılmaktadır.

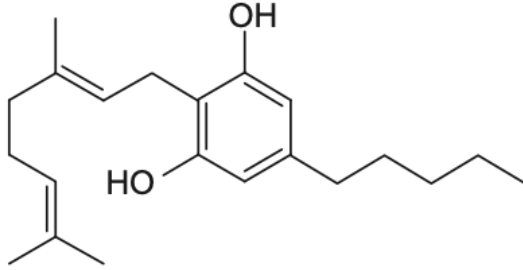
Bu doğrultuda, CBD'nin anti-enflamatuvar, anti-biyotik, anti-depresan ve ağrı kesici özellikleri olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, CBD Epidiolex™ adı altında epilepsinin ağır seyreden iki formu olan Lennox-Gastaut ve Dravet sendromlarında kullanımı için FDA'dan onay almıştır.

CBD, kannabinoit ailesine ait bir anti-kanser moleküldür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda CBD'nin glioblastoma, meme kanseri, akciğer kanseri, melanoma, kolon kanser ve prostat kanseri gibi kanserlerde etkili olduğu, hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Seltzer vd., 2020). Bu kanserler üzerindeki etkisini ise CB2, TRPV1, TRPM8 ve COX2 gibi reseptörler üzerinden gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur. CBD, kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmekte, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) seviyesini artırarak apoptozu tetiklemekte ve metastazı inhibe etmektedir.

CBD'nin prostat kanserinde kullanımı için, faz I klinik çalışmaları yürütülmektedir. Bu kapsamda Epidiolex™'in, bir yandan prostat kanseri üzerindeki etkisi ve güvenilirliği test edilirken, diğer yandan yaşlı prostat kanseri hastalarının PSA ve testosteron seviyelerindeki değişim takip edilmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, Epidiolex™'in prostat kanseri hastalarının yaşam kalitesini artırıp arttırmadığına araştırılmıştır (Koltai & Shalev, 2022; Pacher vd., 2020; Singh vd., 2021).

2.5. CBG

2.5.1. CBG'nin Özellikleri ve Biyosentezi

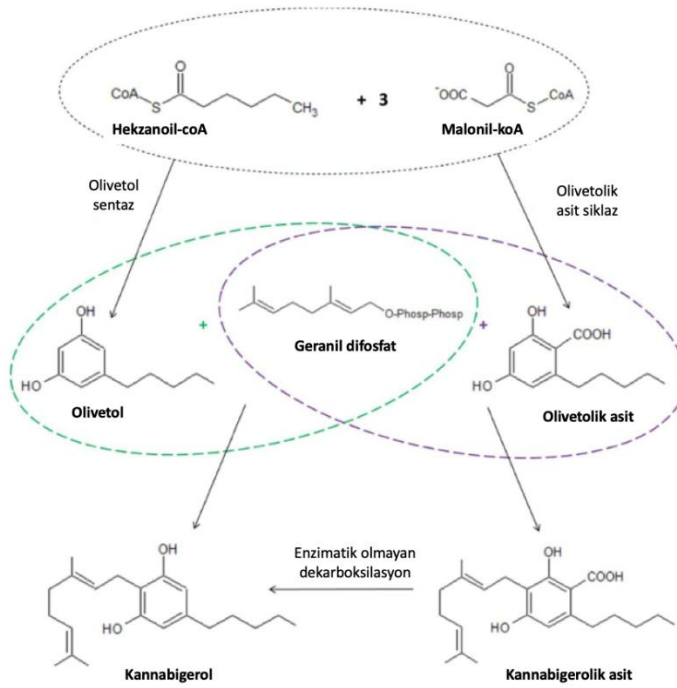


Şekil 2.16 CBG'nin moleküler yapısı (Russo & Marcu, 2017)

1964 yılında keşfedilen CBG, kenevir bitkisinde bulunan ender fitokannabinoidlerdendir. Fitokannabinoid ailesi, 21 karbonlu terpenfenolik moleküllerdir. Bu ailede, CBG ve türevleri 16 molekül ile alt grup oluşturmaktadır (Filipiuc vd., 2021; Prandi vd., 2018). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) terminolojisi göre CBG'nin adı 2-[(2E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]-5-pentyl-benzene-1,3-diol olarak geçmektedir ve kimyasal formülü $C_{21}H_{32}O_2$ 'dir. Moleküler ağırlığı $316.48 \text{ g.mol}^{-1}$ olan CBG'nin erime noktası 52°C 'dir ve lipofil bir yapıya sahiptir. Sıcaklığın artmasına bağlı olarak CBG'nin çözünürlüğü de artmaktadır. 150°C 'den sonra ise ısıya bağlı CBG degradasyonu meydana gelmektedir (Andriotis vd., 2021; ElSohly vd., 2017; Turner vd., 1980). Yüksek seviyede hidrofobik bir yapıya sahip olan CBG, CBD veya THC'den daha üstün bir terapötik bileşik olma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (Ghovanloo vd., 2022). Hidrofobik yapıya ve kolesterole benzerliği olduğu bilinen CBG'nin nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Calapai vd., 2022).

CBG molekülünün biyosentezi için 2 farklı mekanizma bilinmektedir. İlk mekanizmada CBG, Geranil Difosfat (GPP) ve Olivetol (OL) moleküllerinin direkt olarak reaksiyona girmesi sonucu meydana gelmektedir. Bu yolak, CBG'nin sentetik olarak sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Diğer mekanizmada ise CBG, CBGA'nın enzimatik olmayan dekarboksilasyon ile meydana gelmektedir. Kenevir bitkisinde bu reaksiyonun gerçekleşmesi için, ilk olarak glukoz fotosentez ile fosfoenolpirüvata dönüşmektedir. Devamında, pirüvat kinaz ve pirüvat dehidrojenaz enzimlerinin katkılarıyla asetil-koA oluşmaktadır. Asetil-koA da hem GPP'ye dönüşecek olan mevalonik asite dönüşmekte hem de hekzanoil-coA ile reaksiyona girip olivetolik asiti

oluşturan malonil-koA'ya dönüşmektedir. CBGA sentaz enzimi GPP ve Olivetolik Asit (OLA) reaksiyonunu katalize ederek, CBGA'yı oluşturmaktadır. Bu reaksiyonun sonucunda farklı enzimlerin devreye girmesi ile THC, CBD ve diğer fitokannabinoidler sentezlenmektedir. CBG'nin sentezi ise, enzim gerektirmeyen bir dekarboksilasyon reaksiyonudur (Jastrzab vd., 2022). CBG'nin sentezinin doğal olarak daha çok ikinci yolak üzerinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunun sebebi ise, kenevir bitkisinde OL molekülüne rastlanmazken, OL'in sentezini sağlayan OL sentaz enziminin tespit edilmesidir. Buna ek olarak, CBGA'nın CBG'ye dönüşmesinde, uzun süre saklama, radyasyona maruziyet (güneş ışığı) ve sıcaklığın etkili olması bu düşüncüyü desteklemektedir (Tahir vd., 2021; Taura vd., 2009).



Şekil 2.17 CBG'nin biyosentezi (Jastrzab vd., 2022)

CBG ve diğer fitokannabinoidler, *Cannabis indica* adı verilen kenevir türünde daha yoğun miktarda bulunmaktadır. CBG, kenevir bitkisinin diğer bölgelerine kıyasla çiçeklerde ve çiçeklerin altında bulunan yapraklarda, 10 kat daha fazla bulunmaktadır (Bernstein vd., 2019). 2017 yılında yapılan bir çalışmada ise CBG'nin, yüksek oranda *Helichrysum umbraculigerum* (Türkiye'de ölmez çiçek, sarı çiçek veya yayla çiçeği olarak bilinen) bitki ekstraktında bulunduğu gösterilmiştir (Pollastro vd., 2017). CBG'nin kenevir bitkisinde bulunma oranı, toplam fitokannabinoidlerin %10'nunu

temsil etmektedir. Fakat CBGA'nın diğer kannabinoidlere dönüşmesini sağlayan enzimlerin düşük aktivite ile çalıştığı genotipe sahip kenevir türlerinde, CBG oranı %90'ı bulabilmektedir. Üstelik, CBG'nin karboksil grubu (-COOH) içermesi başka fitokannabinoidlere dönüşmesini engellemektedir (Pattnaik vd., 2022; Pollastro vd., 2017).

2.5.2. CBG'nin Biyolojik Etkileri

CBG, tıpkı CBD gibi psikoaktif olmayan bir fitokannabinoidtir. Bu nedenle, insan kullanımı sonrasında herhangi bir bilişsel veya psikolojik bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Bu nedenle farklı alanlarda kullanımı için, son yıllarda önemli araştırmalar yapılmaktadır. Buna ek olarak, sentetik moleküllerin uzun süreli maruziyetlerde yan etki oluşturma potansiyelleri vardır. Bu da direkt kenevirden izole edilen moleküller üzerinde yapılan araştırmalara önem kazandırmaktadır.

CBG'nin farmokinetiği

CBG'nin vücutta nasıl metabolize edildiğini öğrenmek için, farmakokinetiğini takip etmek gerekmektedir. Bu amaçla, kenevir tüketen kişiler üzerinde farklı çalışmalar yapıldığı gibi fare, sıçan, kedi, kobay, hamster, tavşan ve domuz gibi birçok hayvan üzerinde de çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Hanuš vd., 2016). Yapılan araştırmalarda kenevir tüketen kişilerde CBG'nin, yaklaşık 10 dakika sonra ağızda tespit edildiği gösterilmiştir (Swortwood vd., 2017). Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmada ise, CBG ağızdan veya intraperitoneal olarak verildiğinde kanda ve beyinde hızlı bir şekilde absorbe edildiği gösterilmiştir (Deiana vd., 2012). Vücuda giren CBG, Sitokrom P450 Aile 2 Alt Aile J Üyesi 2 (CYP2J2) izoenzimi tarafından metabolize edilmektedir. Bunun sonucunda, farklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda, 12 farklı bileşenin oluşabildiği gösterilmiştir. Bunlardan en önemlisi ise alilik hidroksilasyon sonucundan oluşan monohidroksil bileşenleridir. Tıpkı diğer fitokannabinoidler gibi, CBG idrarda da tespit edilebilmektedir ve 4''hidroksi-CBG ve 5''hidroksi-CBG olarak görülmektedir (Calapai vd., 2022).

CBG'nin anti-enflamatuvar ve anti-oksidan etkileri

ECS'nin, bağışıklık yollarında etkili olduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkan araştırmacılar, bağışıklık sisteminin deregüle olduğu hastalıklarda CBG'nin

etkisini araştırmışlardır. Enflamatuvar bağırsak hastalıkları olarak bilinen Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, bağırsaklarda enflamasyon veya yara oluşmasına neden olmaktadır. CBG'nin bu hastalıklarda potansiyel olarak kullanımını araştırmak için, farelerde kimyasal madde ile kolit oluşturulduktan sonra, intraperitoneal olarak CBG verilmiştir. Takip edilen farklı parametrelerde, CBG verilen farelerde enflamasyonun azaldığı gösterilmiştir. CBG verilen farelerde, miyeloperoksidaz enziminin aktivitesinin ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) ekspresyonunun azaldığı gözlemlenirken, İnterlökin-1 β (IL-1 β), İnterlökin-10 (IL-10) ve İnterferon- γ (IFN- γ) seviyelerinin normale döndüğü gözlemlenmiştir. Buna ek olarak bu deneyde, serbest radikallerin oksitlenmesini sağlayan Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimindeki artış, CBG'nin anti-oksidan etkisini gösterilmiştir. CBG'nin hangi reseptörler üzerinden anti-enflamatuvar ve anti-oksidan etkisini gösterdiğini araştırmak için, CB1 ve CB2 reseptörleri farklı antagonistler ile inhibe edilmiştir. Bu durumda, CB1 inhibe edildiğinde CBG'ye bağlı nitrik oksit azalması etkilenmez iken, CB2 inhibe edildiğinde CBG tarafından tetiklenen nitrik oksit azalmasında artış meydana gelmiştir. Bu sonuçtan yola çıkıldığında, CBG'nin CB2 reseptörünü aktive ederek, makrofajlarda nitrik oksit azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bağırsak epitelyal hücrelerinde yapılan ölçümlerde CBG'nin ROS üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Borrelli vd., 2013). CBG'nin anti-oksidan etkisini araştıran bir diğer çalışmada ise, makrofaj hücrelerinde Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ile oksidatif stres oluşturulduktan sonra makrofajlara CBG verilmiştir. Ölçülen parametrelerde, CBG'nin oksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı deney CB2 reseptörü antagonisti eklenerek yapıldığında ise, CBG'nin oksidatif stresi inhibe edemediği gösterilmiştir (Giacoppo vd., 2017).

CBG'nin nöroprotektif etkisi

Nörodejeneratif hastalık, beyin hücrelerinin ölümü veya bu hücrelerin fonksiyon kaybına uğraması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıklar çoğu zaman enflamasyon ve oksidatif stresten kaynaklanmaktadır. CBG'nin anti-enflamatuvar ve anti-oksidan etkisinin ortaya konulması ile, nöroprotektif etkisi de araştırılmıştır (Calapai vd., 2022). Bu amaçla, NSC-34 motor nöronlara CBG verildiği zaman, toksik hale gelmiş makrofajların daha az toksik etki oluşturdukları gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, apoptoz yollarında rol oynayan kaspaz-3 ve BAX proteinlerinde azalma görülürken, anti-apoptotik BCL-2 proteininde artış gözlemlenmiştir. Enflamasyon

yolaklarına bakıldığında IL-1 β , IFN- γ , TNF- α ve PPAR protein seviyelerinde azalma görülmüştür. Oksidatif stres ölçümlerinde azalma görülmesi ile, CBG'nin enflamasyon ve oksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada, CBG'nin sıçan beynindeki oksidatif stresi engelleme durumu test edilmiştir. Bu doğrultuda, H₂O₂ ile oksidatif stres oluşturulmuş astrosit hücrelerine CBG uygulandıktan sonra oksidatif stresin azaldığı ve serotonin seviyesinin arttığı gösterilmiştir (di Giacomo vd., 2020). Alzheimer hastalığı gibi, Huntington hastalığında da genel nöron ölümü görülmektedir. CBG'nin Huntington hastalığı üzerindeki etkisini araştırmak için *in vivo* araştırma yapılmıştır. Farede 3-Nitropropiyonik Asit (3NP) ile hastalık oluşturulduktan sonra, intraperitoneal olarak CBG verilmiş ve hayvanlar takip edilmiştir. CBG verilen farelerin motor hareketliliğinde iyileşme, genel enflamasyon markörlerinde azalma ve Huntington hastalığı ile bağlantılı genlerin ekspresyonunda iyileşme gözlemlenmiştir (Valdeolivas vd., 2015).

CBG'nin anksiyete karşıtı etkisi

Kenevir ve ECS, duygu ve düşünce durumunu etkilemektedir. Bu amaçla CBG'nin, serotonin reseptörü olarak bilinen 5-Hidroksitriptamin 1A reseptörü (5-HT1A) reseptörü üzerindeki etkisine bakılmıştır. Gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* deneylerde CBG'nin, 5-HT1A reseptörünün antagonisti olduğu gösterilmiştir. 5-HT1A reseptörü anksiyete ile ilişkili bir reseptördür (Calapai vd., 2022). Bu kapsamda, CBG'nin anksiyete üzerindeki etkisi farklı çalışmalarda ele alınmıştır. Bu etki, farelerde LD (aydınlık/karanlık) ve TR (tat tepkisi) davranış testleri ile ortaya konulmuştur. LD testinde, fare bir tarafı karanlık bir tarafı ise aydınlatılmış bir kutuya konulmaktadır. Anksiyete seviyesi yüksek fareler aydınlık tarafa yönelirken, anksiyete seviyesi düşük farelerin karanlık tarafa geçip, bulunduğu ortamı keşfetmeye çalıştığı gözlemlenmiştir. TR testinde ise fareye şekerli bir solüsyon verilip, yüz mimiklerinde ve dil hareketlerinde oluşan değişiklikler takip edildiğinde hayvanın şekerli solüsyonu daha iştahlı yemesi ile anksiyete seviyesinin düştüğü gösterilmiştir. O'Brien ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada, 2,5 mg/kg CBG verilen farelerde karanlıkta geçirilen sürede bir artış görülmemiştir. Buna ek olarak TR testinde ise, CBG verilen farelerde sadece ilk gün bir iştah artışı gözlemlenirken diğer günlerde bir fark görülmemiştir (O'Brien vd., 2013). Bu testlerin sonucunda CBG'nin anti-anksiyete etkisi olmadığına karar verilmesine rağmen, 2020 yılında yapılan çalışmada 10 mg/kg

CBG verilen farelerde LD testinde karanlık tarafta geçirilen sürede anlamlı bir artış ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar, CBG'nin daha yüksek dozlarda anksiyolitik etkisinin olabileceğini göstermektedir (Zagzoog vd., 2020).

CBG'nin diğer etkileri

Glokom, halk arasında bilinen adıyla göz tansiyonu, göz içi basıncın artması ile göz sinirinin zarar görmesine neden olmaktadır. 1984 yılında, kediler üzerinde yapılan bir çalışmada CBG'nin, göz içi basıncı azalttığı ortaya konulmuştur. Buna ek olarak, CBD ve THC gibi diğer fitokannabinoidlerin aksine, CBG'nin konjonktivit veya hiperemi gibi herhangi yan etki oluşturmada göz basıncını azalttığı gösterilmiştir (Colasanti vd., 1984). Sentetik CBG analogları ile yapılan çalışmalar da, bu yönde sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, CBG'nin glokom tedavisinde kullanım potansiyelinin olduğu düşünülmektedir (Calapai vd., 2022).

Kenevirin anti-bakteriyel etkisi, uzun yıllardır bilinmektedir. CBG'nin bu kapsamda araştırılmasında, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak CBG'nin, bakterilerin membranını bozarak veya bakteri biyofilmi oluşmasını engelleyerek etkili olduğu ortaya konulmuştur (Appendino vd., 2008; Aqawi vd., 2020, 2021).

Kenevir ve farklı fitokannabinoidler, kozmetik ürün içeriklerinde de kullanılmaktadır. Oláh ve ark. tarafından, anti-enflamatuvar etkisi ile ön plana çıkan CBG'nin, akne karşıtı etkisi araştırılmıştır. Akne, sebum üretiminin artması ve yağ bezlerinin iltihaplanması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu nedenle araştırma için CBG'nin, sebosit hücrelerinin proliferasyonunu nasıl etkilediği ve sebosit hücrelerinde lipopolisakkaritler (LPS) ile enflamasyon oluşturulduktan sonra nasıl etki ettiğine bakılmıştır. CBG, 50 µM altında sebosit hücrelerinin proliferasyonunu 48 saatte herhangi bir etkiye sebep olmazken, sebositlerde bakteri membran bileşeni olan LPS ile oluşan enflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu doğrultuda CBG, akne ve sedef hastalığı için olası tedavi ajanı olarak görülmektedir (Oláh vd., 2016).

2.5.3. CBG'nin Kansere Üzerindeki Etkileri

CBG'nin kanser üzerinde etkisi farklı çalışmalarda ele alınmıştır. Fakat bu çalışmalar kısıtlı sayıdadır. 1996 yılında Baek ve ark. CBG'nin, fare melanoma

hücreleri üzerinde $IC_{50} = 31.30 \mu\text{g/mL}$ ($98,9 \mu\text{M}$) konsantrasyonunda anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir (S.-H. Baek vd., 1996).

Aynı ekip 1998’de CBG’nin, ağız epiteliyal karsinoma (KB) hücreleri üzerinde CBD’den daha etkili olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, CBG’nin normal NIH 3T3 hücreleri üzerinde CBD ve referans ilaç olan 5-fluorourasil’e karşılaştırıldığında daha az toksik olduğu kanıtlamıştır (S. H. Baek vd., 1998).

Han ve ekibi tarafından yapılan çalışmada ise CBG’nin KB hücreleri üzerindeki IC_{50} ’si $45,55 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Han vd., 2000).

Meme kanseri, glioma, prostat kanseri, kolorektal kanseri, tiroid kanseri, lösemi ve mide kanseri hücre hatları üzerinde yapılan araştırmada, CBG’nin kannabinoidler arasında en etkili ikinci molekül olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak gerçekleştirilen moleküler çalışmada CBG’nin, TRPV1’i aktive ve/veya AEA’nın inaktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. TRPV1’in aktivasyonu ile kanser hücrelerinde mitokondri yolağı üzerinden apoptoz tetiklenmekte ve hücre içi Ca^{2+} ’da artış gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmada, CBG’nin kanser hücrelerinin ölümünü bu şekilde gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Ligresti vd., 2006).

Petrocellis ve ark. tarafından yapılan çalışmada CBG’nin, DU145, PC3 ve LNCaP hücreleri üzerinde 72 saatte IC_{50} ’lerin $25 \mu\text{M}$ ’ın üzerinde olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, $10 \mu\text{M}$ CBG’nin, DU145 ve LNCaP hücrelerinde ELISA ile ölçülen kaspaz-3/7 seviyesinde değişikliğe neden olmadığı ortaya konulmuştur Serum yoksunluğuna maruz bırakılmış ve $20 \mu\text{M}$ CBG verilmiş PC3 ve LNCaP hücrelerinde ise kaspaz-3/7 seviyesinde, anlamlı bir artış görülmüştür (De Petrocellis vd., 2013).

Borrelli ve ekibi tarafından yapılan çalışmada ise CBG’nin, kolorektal kanser üzerinde etkili olduğu CaCo-2 ve HCT116 hücre hatlarında gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre, CBG’nin %1 serum içeren ortamda, CaCo-2 ve HCT116 kolorektal kanser hücreleri üzerinde $3 \mu\text{M}$ ’dan itibaren sitotoksik etki gösterirken, normal hücrelerde $30 \mu\text{M}$ ’da sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Serum içeren (%10) medyada CBG’nin, IC_{50} ’nin kolorektal kanser hücrelerinde $30 \mu\text{M}$ ’ın üzerinde olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, endoCB reseptörleri ve CBG ilişkisi de ortaya konulmuştur. TRPM8, inhibe edildiğinde CBG’nin sitotoksik etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Bu da kolorektal kanser hücrelerinde CBG’nin TRPM8 kanalı üzerinden sitotoksik etkisini gösterdiğini düşündürmektedir. Diğer yandan CB2, CBG’nin sitotoksik etkisine pozitif olarak katkıda bulunurken, TRPA1, TRPV1 ve

TRPV2 kanallarının bu etkide rol oynamadığı gösterilmiştir. CBG'nin kolorektal kanser hücrelerini apoptoz yolağı üzerinden öldürdüğünü, kaspaz-3/7 immuno fluoresan testi, DNA fragmentasyon testi, Diferansiyel İnterferans Kontrast Mikroskopisi (DIC) görüntüler üzerinden morfoloji analizi, pro-apoptotik mRNA'ların qRT-PCR ile tespiti ve ROS seviyesinin ölçümü ile gösterilmiştir. Tüm deneylerden elde edilen sonuçlara göre CBG'nin, kanser hücrelerini apoptoz yolağı üzerinden öldürdüğü gösterilmiştir. Çalışmada yapılan *in vivo* deneylerde ise, CBG'nin farelerde tümörü küçülttüğü ve yeni tümör oluşumunu önlediği gösterilmiştir (Borrelli vd., 2014).

2020 yılında Schoeman ve ark. farklı kannabinoidleri kombine bir şekilde kullanarak meme kanseri üzerinde test etmişlerdir. Bu çalışmada sadece CBG kullanımının da MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerinde 28 μ M ve 31 μ M IC₅₀'de etkili olduğu gösterilmiştir (Schoeman vd., 2020).

Lah ve ark. tarafından 2021'de yapılan çalışmada CBG'nin glioblastoma kök hücresi, glioblastoma primer hücreleri ve glioblastoma hücre hatları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada, CBG'nin diferansiye glioblastoma hücre hatlarında ortalama olarak IC₅₀'nin 28,1 μ M, glioblastoma kök hücrelerinde ise 59 μ M olduğu hesaplanmıştır. Diğer yandan, diferansiye glioblastoma hücrelerinin proliferasyonundaki azalmanın, hücrelerin S fazından çıkıp G1 fazına geçmesiyle ve bunun da senesensi tetiklemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. CBG'nin, Aneksin V/ Propidyum İyodür (Annexin V/PI) akış sitometrisi ve kaspaz-3 ile western blot deneylerinde, glioblastoma hücre hatlarında apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir. Buna ek olarak, CBG'nin diferansiye glioblastoma hücrelerine kıyasla glioblastoma kök hücrelerinde apoptozu daha çok tetiklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada CBG'nin, CBD ve referans ilaç TMZ'ye göre invazyonu engellemede daha etkili olduğu gösterilmiştir (Lah vd., 2021).

Colvin ve ark. tarafından 2022'de yapılan çalışmada CBG'nin, mezotelyoma üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sıçan ve insan mezotelyoma hücre hatları kullanılmış ve CBG'nin IC₅₀'sinin sıçan II45 hücrelerinde 16,6 μ M, insan MSTO hücrelerinde 16,45 μ M ve insan H2452 hücrelerinde ise 15,5 μ M olarak belirlenmiştir. CBG, IC₅₀ değerinin iki katı olarak kullanıldığında sıçan ve insan mezotelyoma hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurmakta ve S fazına geçişini geciktirmektedir. Buna ek olarak, CBG'nin transwell migrasyon ve invazyon deneylerinde, insan mezotelyoma hücrelerinde migrasyonu ve invazyonu önemli ölçüde inhibe ettiği

gösterilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen kapsamlı gen analizinde CBG'nin, CB1, GPR55, 5-HT-1A ve TRPV1 reseptörlerinin ekspresyonunu arttırırken TRPV2 ve PPARG reseptörlerinin ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Diğer yandan CBG'nin, mezotelyoma hücrelerinde hücre döngüsü, anti-apoptotik, pro-metastatik ve DNA tamir genlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. *In vivo* deneyinde kontrole kıyasla sıçanların yaşam süresinde bir iyileşme görülmemiştir. Bunun nedeni ise, *in vitro*'da elde edilen IC₅₀'ye kanda ulaşılabilmesi olarak düşünülmektedir (Colvin vd., 2022).

Lah ve ark. tarafından 2022'de yapılan bir diğer çalışmada ise diferansiye glioblastoma ve glioblastoma kök hücrelerinde CBG'nin etkisi araştırılmıştır. Bir önceki araştırmanın aksine CBG, etanol yerine baz emülsiyon olarak hazırlanmıştır. Bu nedenle, IC₅₀'ler de diğer çalışma ile farklılık göstermektedir. CBG'nin IC₅₀'si bir önceki çalışmaya göre, diferansiye glioblastoma hücrelerinde 100 µM'a yükselirken, glioblastoma kök hücrelerinde 84 µM'a yükselmiştir (Lah vd., 2022) .

Viereckl ve ark. tarafından yapılan çalışmada CBG'nin kolanjiyokarsinoma (safra yolu kanseri) üzerindeki anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Çalışmada bir tane intrahepatik (HuCC-T1), iki tane de ekstrahepatik (CCA, Mz-ChA-1) kolanjiyokarsinoma hücre hatları kullanılmakla birlikte ölümsüzleştirilmiş normal kolanjiyosit (H69) hücreler de kullanılmıştır. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) sitotoksikite deneyinde, CBG'nin HuCC-T1 hücreleri üzerinde 100 µM'dan sonra, CCA hücrelerinde ise 50 µM'dan sonra anlamlı düzeyde sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, H69 normal hücrelerde CBG'nin, hücre proliferasyonunu 6,25 µM ve 12,5 µM'da artırdığı ve 25 µM'dan sonra ise sitotoksik etki meydana getirdiği gösterilmiştir. Diğer yandan, 100 µM CBG ile muameleden sonra, S fazında olan kolanjiyokarsinoma hücrelerinde azalma görülmüştür. Buna ek olarak, hücre çekirdeğinde küçülme meydana gelmesi, hücrelerin apoptoz veya senesense girdiğini işaret etmektedir. Akış sitometrisi ile Annexin V/PI'ye bakıldığında, CBG ile muamele edilmiş kolanjiyokarsinoma hücrelerinin, geç apoptoz evresinde olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, CBG'ye maruz kalmış kanser hücrelerinde immün boyama ile BAX proteinine bakıldığında anlamlı bir artış görülmektedir. Fakat bu artış, Western blot deneyinde kontrole kıyasla anlamlı bir seviyede çıkmamıştır. Buna rağmen, BAX (pro-apoptotik) için bir artış eğilimi, BCL-2 (anti-apoptotik) için ise bir düşüş eğilimi görülmüştür. Aynı koşullarda Western blot ile kaspaz-3 (pro-apoptotik) ve LC3b (otofaji) protein sentezlerine bakıldığında kaspaz-3'te anlamlı bir artış görülürken, LC3b'de bir düşüş

görülmektedir. Bu çalışmalarda, CBG'nin kolanjiyokarsinoma hücrelerinde spesifik olarak apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Bu çalışmada CBG'nin, kolanjiyokarsinoma hücrelerinde migrasyonu ve koloni oluşturma kapasitesini inhibe ettiğini göstermek için, yara iyileşme testi, transwell migrasyon testi ve koloni oluşturma testi gerçekleştirmiştir. Elde edilen sonuçlar CBG'nin kolanjiyokarsinoma hücrelerinde migrasyon kapasitesini yavaşlattığını ve oluşan kolonilerin sayılarının ve boyutlarının daha küçük olduğunu göstermektedir (Viereckl vd., 2022).

Mahmoud ve ark. tarafından 2023'te yapılan çalışmada, fare prostat kanser hücrelerinde CBG'nin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada hormon dirençli olmayan (non-HRPC TRAMP2) ve hormon dirençli (HRPC TRAMP-C2) iki farklı prostat kanser hücresi kullanılmıştır. Non-HRPC hücreleri, ADT'ye dirençli kanserlerde kullanılan EZA'ya maruz bırakılarak elde edilmiştir ve bu sayede EZA dirençli hücreler oluşmuştur. MTT deneylerinde non-HRPC hücrelerinde IC₅₀ 13 µM olarak hesaplanırken, HRPC hücrelerinde 14 µM olarak bulunmuştur. Bu iki IC₅₀'nin yakın olması fare prostat kanser hücrelerinde CBG'nin etkisinin, hormon ve androjen bağımsız olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, aynı hücrelerde test edilen referans ilaçlardan sadece DCX'in, non-HRPC hücrelerinde 32 µM IC₅₀ ile sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. ECS'de yer alan farklı reseptörler antagonistler ile inhibe edildiğinde, CBG'nin sitotoksik etkisinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu da CBG'nin bu reseptörlerden bağımsız bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. CBG'nin fare prostat kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği kaspaz-3/7 artışı ile gösterilmiştir. Bununla birlikte, HRPC hücrelerinin non-HRPC hücrelerine kıyasla CBG'ye karşı daha hassas oldukları ortaya konulmuştur. *In vivo* deneylerde ilk olarak, CBG'nin tümör boyutunu küçülttüğü kanıtlanmıştır. Tümör dokularında, yeniden damarlanmada rol oynayan CD31'de ve proliferasyonda rol oynayan Ki-67'de azalma bu bulguyu desteklemektedir. Buna ek olarak, CBG'nin fare tarafından tolere edilebilirliği C57BL/6 farelerde gösterilmiştir. CBG verilen farelerin hematolojik ve biyokimyasal kan değerlerinde, herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Mahmoud vd., 2023).

Sooda ve ark. tarafından 2023 yılında gerçekleştirilen araştırmada CBG'nin yumurtalık kanseri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda kemoterapiye hassas A2780 ve kemoterapiye dirençli A2780/CP70 over karsinoma hücreleri ile, PNT2 normal prostat hücreleri ve ARPE19 normal retina hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde yapılan MTT deneyi 24,48,72 ve 96 saatlerinde gerçekleştirilmiştir ve her

hücre için IC50 hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, CBG'nin normal hücrelere kıyasla over karsinoma hücreleri üzerinde yaklaşık 2 kat daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Paralel olarak yapılan MTT deneyinde ise referans ilaç karboplatinin, 24 saatte anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmadığı not edilmiştir. CBG ile over karsinoma hücrelerinde gözlemlenen sitotoksik etkinin apoptoz kaynaklı olup olmadığını göstermek için, ilk olarak mitokondri membran potansiyel deneyi yapılmıştır. Bu çalışmada, CBG'nin 30 ve 50 µM konsantrasyonlarında kullanıldığında, apoptotik hücre sayısında artış gözlenmemiştir. Bununla birlikte, Annexin V/PI akış sitometrisinde incelendiğinde CBG'nin 10 µM üzerinde kullanıldığında, erken ve geç apoptozda olan hücre sayısını arttırdığı gösterilmiştir. Kaspaz-3/7 bakıldığında ise, CBG'nin bu proteinlerde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsüne bakıldığında CBG, G0/G1 fazında olan hücrelerin artışına ve S fazında olan hücrelerin düşüşüne sebep olmaktadır. Bununla birlikte, DNA fragmentasyonunun bir işareti olan subG1 fazında olan hücrelerde de artış görülmektedir. CBG ile EndoCB reseptörlerinin antagonistleri birlikte kullanıldığında, sadece CB1 reseptörü antagonisti ile muameleden sonra CBG'ye bağlı sitotoksitenin etkilendiği gösterilmiştir (Sooda vd., 2023).

Wyrobnik ve ark. tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada, fare ve insan melanomasının CBG ile muamelesinden sonra, tümör mikro-çevresinde (TME) rol oynayan faktörlerde meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir. İlk olarak, A375 (insan) ve B16F10 (fare) hücrelerine CBG verildiğinde, bu hücreler tarafından, tümörle ilişkili sitokin olarak bilinen Koloni Uyarıcı Faktör 1'in (CSF-1) daha az salgılandığı gösterilmiştir. Diğer yandan, melanoma hücreleri CBG ile kültür edildikten sonra toplanan koşullanmış medyanın, makrofajlarda kanserin ilerlemesinde rol oynayan Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücrelere (MDSC) dönüşmelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak bu inhibisyonun, MDSC hücrelerinde iNOS seviyesinin düşmesine ve dolaylı olarak lenfosit CD8+ hücrelerinin aktivasyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın *in vivo* kısmında ise, tümör oluşturulmuş farelere 2,5 mg/kg CBG verildiğinde tümör hacminin ve ağırlığının azaldığı gösterilmiştir. CBG'nin tümör bölgesine ulaştığını kontrol etmek için ise, tümörden alınan örneklerle kromatografi yapılmıştır ve sonucunda ise, tümörde CBG'nin bulunduğu tespit edilmiştir. CBG verilen kanserli farelerde tümörle ilişkili makrofajların (TAM) azaldığı ve pro-enflamatuvar makrofajlar olan Tümörle İlişkili Makrofaj-1'lerin (M1) arttığı gösterilmiştir.

TAM/M1 oranındaki düşüş TME'nin daha az immünoşüpresif olmasına ve bağışıklık sisteminin devreye girerek, kanser hücrelerini öldürme potansiyelinin arttığını göstermektedir. Son olarak, bu çalışmada immunoterapide kullanılan anti- α PD-L1, CBG ile kombine olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kombine kullanımının, CBG'nin veya anti- α PD-L1'nin tek olarak kullanımından daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu kapsamda, farelerde tümör ilerlemesi yavaşlamış, hayatta kalma süresi artmış ve immün hücrelerden sitotoksik T hücrelerinin tümör içerisine infiltrasyonunda artış görülmüştür (Wyrobnik vd., 2023).

Yüksel ve ark. tarafından 2023'te yapılan çalışmada CBG'nin anti-kanser etkisi 2 farklı insan kolorektal kanser hücreleri üzerinde test edilmiştir. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum (MTS) sitotoksikite testinde HT-29 hücrelerinde IC_{50} 'nin 284,37 μ M olarak hesaplanırken HCT-116 hücrelerinde ise 94,79 μ M olarak hesaplanmıştır. Sitotoksikite testinde elde edilen sonucun, apoptoz veya hücre döngüsündeki değişiklikten kaynaklı olup olmadığını göstermek için, ilk olarak Annexin V/PI testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre CBG, HCT-116 hücrelerinde apoptozu indüklemeyen, HT-29 hücrelerinde nekroza sebep olmaktadır. Moleküler seviyede bakıldığında ise CBG'nin, HCT-116 hücrelerinde apoptoz yolağında rol oynayan herhangi bir gen ekspresyon seviyesinde değişikliğe sebep olmamaktadır. Bunun aksine CBG'nin, HT-29 hücrelerinde BAX'ın ekspresyonunun artışına neden olduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsüne bakıldığında ise, CBG verilen HCT-116 hücrelerinde G0/G1 fazında olan hücrelerde artış görülürken, HT-29 hücrelerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Hücre döngüsünde rol alan genlerin ekspresyonuna bakıldığında her iki hücrede de Mutasyona Uğramış Ataksi Telenjiyektazi (ATM) ve Ataksi Telenjiyektazi ve Rad3 ile İlgili (ATR) genlerinin ekspresyonlarında artış görülmüştür. Bu genler, DNA hasarı ve hücre döngüsü kontrolünde yer almaktadır. Diğer yandan CBG kullanılan koşullarda, HCT-116 hücrelerinde ABL proto-onkogen 1 (ABL-1) gen ekspresyonunda, HT-29 hücrelerinde ise Survivin (BIRC-5) ve Kinetokor İlişkili 1 (KNTC-1) gen ekspresyonunda azalma görülmüştür. Son olarak EdU proliferasyon testinde CBG'nin, HCT-116 hücrelerini etkilemezken, HT-29 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Moleküler seviyede yapılan diğer deneyde ise CBG ile muamele edildikten sonra, birçok kanserde deregüle olan Hippo yolağında rol oynayan genlerin ekspresyonundaki değişikliklere bakılmıştır. İlaç direnci ve metastatik kanserlerde

Hippo yolağının inaktive olduğu, Merlin ve Evet-ilişkili protein 1 (YAP) ekspresyonlarının ise arttığı gösterilmiştir (Yüksel vd., 2023).

CBG'nin kanser üzerindeki etkisini araştıran en son çalışmada Zeppa ve ark., insan pankreas duktal adenokarsinomu hücrelerinde CBG'nin etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, PANC-1 ve MIAPaCa-2 pankreatik kanser hücreleri, NCM460D normal kolon epitelyal hücreleri ve NHFA12 normal fibroblast hücreleri kullanılmıştır. MTT sitotoksosite testinde, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde daha düşük IC₅₀'lerde sitotoksosite görülmüştür. Deneylerin devamında, kanser hücrelerinde elde edilen IC₅₀ değerinin altında dozlar kullanılmıştır. CBG'nin kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermek için Western Blot ile, Annexin V ve pro-kaspaz-3/kaspaz-3 protein seviyesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, CBG'nin apoptozu tetiklediği ve kaspaz-3/pro-kaspaz-3 oranının arttığını göstermiştir. Buna ek olarak, CBG'nin otofaji mekanizmasını da tetiklediği, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesiyle ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve Memeli Hedefi Rapamisin (mTOR) yolaklarının inhibe olması ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, CBG ile kemoterapötik bir ajan olan Paclitaxel ve Gemcitabine kombine olarak kullanılıp sitotoksiteleri test edilmiştir. Elde edilen veriler, Paclitaxel veya Gemcitabine'nin CBG ile kombine kullanıldığında, tek kullanıma göre daha sitotoksik olduğunu göstermiştir (Zeppa vd., 2024).

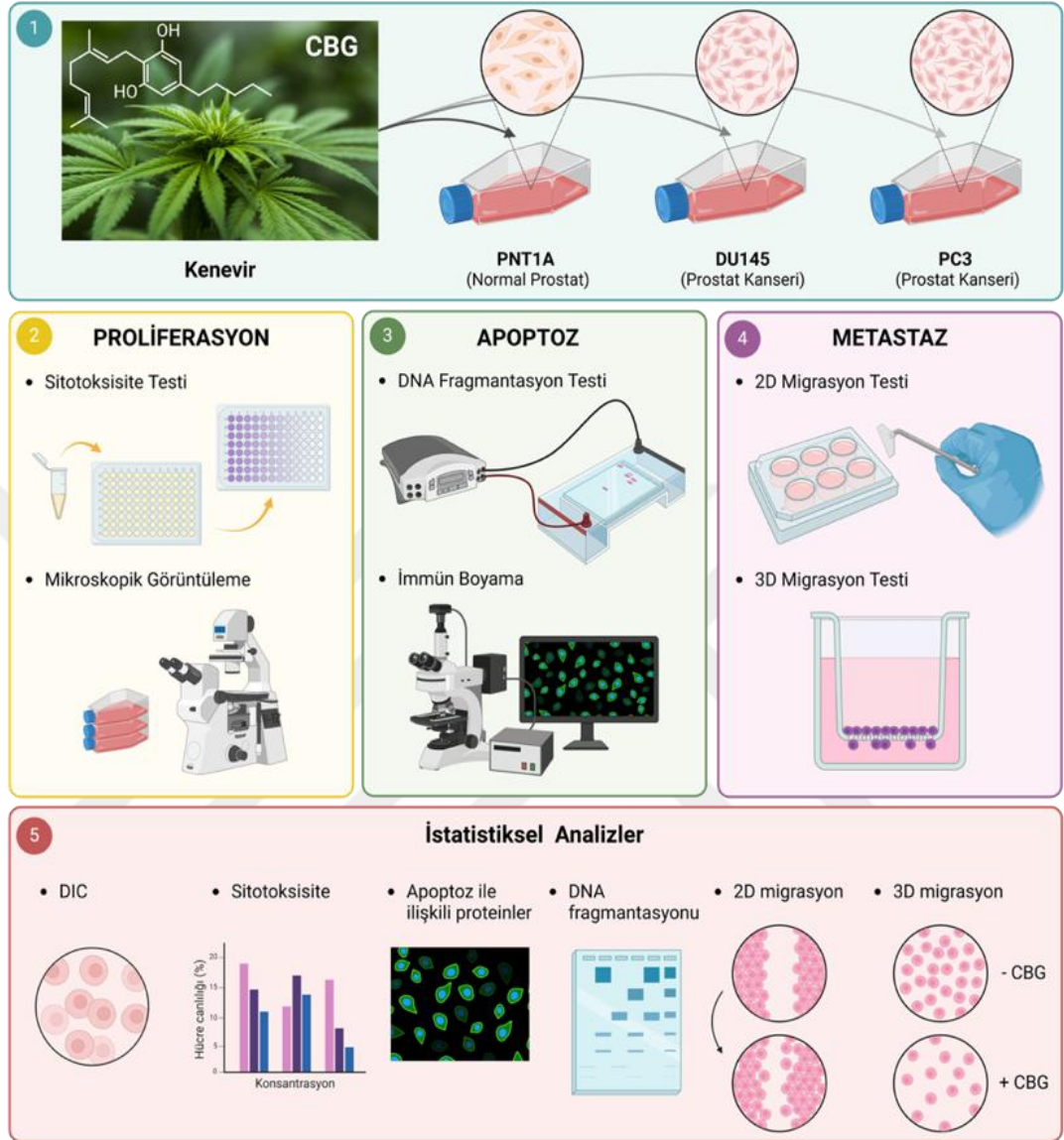
Tablo 2.3 *Literatürde CBG'nin kanser hücrelerinde kullanım konsantrasyonları*

Hücre	IC ₅₀	Zaman	Referans
Melanoma (fare)	98,9µM (=31,31µg/mL)	24 saat	(S.-H. Baek vd., 1996)
KB epitelyal karsinoma	31,30µM	48 saat	(S. H. Baek vd., 1998)
KB epitelyal karsinoma	45,55µM	72 saat	(Han vd., 2000)
MCF-7 meme kanseri	9,8µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
MDA-MB-231 meme kanseri	16,2µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
C6 sıçan glioma	13µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
DU145 prostat kanseri	21,3µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
CaCo-2 kolorektal kanseri	9µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
KiMol sıçan tiroid kanseri	8,2µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
RBL-2H3 sıçan lösemi	9µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
AGS mide adenokarsinoma	8,2µM	96 saat	(Ligresti vd., 2006)
DU145 prostat kanseri	>25µM	72 saat	(De Petrocellis vd., 2013)
PC3 prostat kanseri	>25µM	72 saat	(De Petrocellis vd., 2013)
LNCaP prostat kanseri	>25µM	72 saat	(De Petrocellis vd., 2013)

Tablo 2.3 Devamı

CaCo-2 kolorektal kanseri	30 μ M*	24,48,72 saat	(Borrelli vd., 2014)
HCT116 kolorektal kanseri	30 μ M*	24,48,72 saat	(Borrelli vd., 2014)
MDA-MB-231 meme kanseri	28,40 μ M	48 saat	(Schoeman vd., 2020)
MCF-7 meme kanseri	31,45 μ M	48 saat	(Schoeman vd., 2020)
Diferansiye glioblastoma	28,1 μ M	48 saat	(Lah vd., 2021)
Glioblastoma kök hücre	59 μ M	48 saat	(Lah vd., 2021)
II45 mezotelyoma (sıçan)	16,6 μ M	72 saat	(Colvin vd., 2022).
MSTO mezotelyoma	16,45 μ M	72 saat	(Colvin vd., 2022).
H2452 mezotelyoma	15,5 μ M	72 saat	(Colvin vd., 2022).
Diferansiye glioblastoma	100 μ M	48 saat	(Lah vd., 2022)
Glioblastoma kök hücre	84 μ M	48 saat	(Lah vd., 2022)
HuCC-T1 safra yolu kanseri	100 μ M*	48 saat	(Viereckl vd., 2022)
CCA safra yolu kanseri	50 μ M*	48 saat	(Viereckl vd., 2022)
TRAMP2 non-HRPC prostat kanseri (fare)	13 μ M	24 saat	(Mahmoud vd., 2023)
TRAMP2 HRPC prostat kanseri (fare)	14 μ M	24 saat	(Mahmoud vd., 2023)
A2780 over karsinoma	15,3 μ M	24 saat	(Sooda vd., 2023)
A2780/CP70 over karsinoma	17,7 μ M	24 saat	(Sooda vd., 2023)
PNT2 normal prostat	32,1 μ M	24 saat	(Sooda vd., 2023)
ARPE19 normal retina	37,2 μ M	24 saat	(Sooda vd., 2023)
HCT-116 kolorektal kanseri	94,79 μ M	72 saat	(Yüksel vd., 2023)
HT-29 kolorektal kanseri	284,37 μ M	72 saat	(Yüksel vd., 2023)
PANC-1 pankreas adenokarsinoma	49 μ M (=15,64 μ g/mL)	72 saat	(Zeppa vd., 2024)
MIAPaCa-2 pankreas adenokarsinoma	43,5 μ M (13,77 μ g/mL)	72 saat	(Zeppa vd., 2024)
NCM460D normal kolon epitelyal	93,1 μ M (=29,45 μ g/mL)	72 saat	(Zeppa vd., 2024)
NHFA12 normal fibroblast	70,2 μ M (=22,20 μ g/mL)	72 saat	(Zeppa vd., 2024)
*: Bu çalışmalarda IC ₅₀ hesaplanmamıştır. Belirtilen konsantrasyon anlamlı düzeyde sitotoksosite görülen ilk konsantrasyondur.			

3. MATERYAL VE YÖNTEM



Şekil 3.1 Tez çalışmasında takip edilen iş akış şeması

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal-Sarf Malzemeler ve Özellikleri

Tablo 3.1 *Tez çalışmasında kullanılan kimyasal listesi*

Malzeme	Marka	Katalog numarası
PNT1A	EACC	95012614
DU145	ATCC	HTB-81
PC3	ATCC	CRL-1435
Etanol	Isolab	64-17-5
Aquaguard 1	Biological Industries	01-867-1B
Aquaguard 2	Biological Industries	01-916-1E
Fetal Bovine Serum	Gibco	A5256701
L-glutamine	Serex	SRL-810-100
Penicilin-streptomycin	Gibco	15140122
RPMI 1640	Serex	SLR-563-500
DMEM high glucose	Serex	SLD-524-500
Trypsin-EDTA	Sartorius	03-052-1B
DPBS with Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Capricorn Scientific	PBS-2A
DMSO	Sigma	1.167.431.000
Trypan blue	Sigma	T8154-100ML
Cannabigerol	Cayman	15293.5MG
Docetaxel	Adooq	A10326
Etanol moleküler seviye	Sigma	1.08543
WST-8	Elabsciences	E-CK-A362
Crystal violet	Sigma	C0775-25G
Metanol	Sigma	1.060.092.011
PBS without Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Gibco	14-190-144
DNA izolasyon kiti	Favorgen	FATGK001
Agaroz	Sigma	A9539-100G
TAE	Clearband	TAE500
Redsafe	iNtRON Biotech	21141
Yükleme boyası	Thermo Scientific	R0611
DNA Ladder	New England Biolabs	B7025
Poly-L-lysine	Sigma	P8920-100
PFA	Sigma	158127-5G
Primer antikor anti-Caspase-3	Abcam	ab13847
Primer antikor anti-Caspase-8	Elabscience	E-AB-63511
Primer antikor anti-Caspase-9	Abcam	ab202068
Primer antikor anti-BAX	Abcam	ab32503
Sekonder antikor FITC	Invitrogen	656111
7-AAD	Molecular Probes	A01310
Kapatma medyası	Abcam	ab104139

Tablo 3.2 *Tez çalışmasında kullanılan kimyasal listesi*

Malzeme	Marka	Katalog numarası
50 mL falkon tüp	Sarstedt	62.547.254
15 mL falkon tüp	Sarstedt	62.554.502
Parafilm	Merck	P7543
Kriyovial	Greiner	10563821
T75 flask	Sarstedt	83.3911.002
1000µL pipet ucu	Kirgen	KG5333
100µL pipet ucu	Kirgen	KG5431
10µL pipet ucu	Kirgen	KG5131
10 mL serolojik	SPL	SPL-910-10
Dondurma kutusu	Corning CoolCell®	432138
1.5mL Eppendorf tüp	Eppendorf	0030123611
6 kuyucuklu plaka	SPL	30006
12 kuyucuklu plaka	SPL	30012
24 kuyucuklu plaka	SPL	30024
96 kuyucuklu plaka	SPL	30096
8µm pore insert	Nest Scientific	725301
Eküvyon Çubuğu	LP Italiana Spa	L112498
Pens	Dumont Tweezers	72854-D
Hücre kazıyıcı	Thermo Scientific	12-565-58
12 mm yuvarlak coverslip	Lasec	R166.05
Cam petri	Pyrex	12043333
Alüminyum folyo	Koroplast	
Lamel	Corning	CLS294875X25
Oje	Flormar	
Silinmez keçeli kalem	Edding	Small

3.1.2. Kullanılan Alet-Cihaz ve Özellikleri**Tablo 3.3** *Tez çalışmasında kullanılan cihaz listesi*

Cihaz	Marka
Laminer kabin	Holten
İnkübatör	Panasonic
Su banyosu	Labline Aquabath
Otomatik pipet	Gilson
Otoklav	Nüve
Distile su cihazı	ELGA
Santrifüj	Beckman Coulter
Invert optik mikroskop	Leica
-80	Panasonic
-20	Sanyo
+4	Sanyo
Azot tankı	Statebourne
Buz makinesi	Scotsman
Nanodrop	Nanodrop

Tablo 3.3 Devamı

Jel görüntüleme sistemi	SYNGENE
Spektrofotometre	Tecan
Tartım cihazı	Shimadzu
Vorteks	IKA
Soğutmalı santifüj	Hettich
Jel yürütme tankı	Scie-Plas
Güç kaynağı	Labnet
Eppendorf ısıtıcısı	Major Science
Mikrodalga	Arçelik
Fluoresan mikroskop	Zeiss

3.1.3. Kullanılan hücre hatları ve özellikleri

Deneylerde kullanılan PNT1A hücreleri, Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ (Erzurum Teknik Üniversitesi) tarafından hediye edilmiştir. Hücreler EACC kaynaklıdır (PNT1A Human Normal Prostate Epithelium Imortalized with SV40., 95012614 | Sigma-Aldrich). PNT1A hücreleri SV40 plasmidi ile ölümsüzleştirilmiş normal prostat hücreleridir. Epitelial yapıya sahip olan bu hücreler, 35 yaşında bir erkekten *post mortem* olarak alınmıştır (Avancès vd., 2001).

DU145 hücreleri, Doç. Dr. Fatih KOCABAŞ (Yeditepe Üniversitesi) tarafından hediye edilmiştir. Hücreler ATCC kaynaklıdır (DU 145 - HTB-81 | ATCC). DU145 hücreleri, II. seviye prostat adenokarsinomasının beyinde oluşturduğu metastazdan alınmıştır. Hücreler beyaz ve 69 yaşında bir erkek hastadan alınmıştır (DU 145 - HTB-81 | ATCC, t.y.; Stone vd., 1978).

PC3 hücreleri Öğr. Gör. Dr. Merve SEZER KÜRKÇÜ (Muğla Üniversitesi) tarafından hediye edilmiştir. Hücreler ATCC kaynaklıdır (PC-3 - CRL-1435 | ATCC). PC3 hücreleri IV. seviye prostat adenokarsinomasının kemikte oluşturdu metastazdan alınmıştır. Hücreler beyaz ve 62 yaşında bir erkek hastadan alınmıştır (Kaighn vd., 1979; PC-3 - CRL-1435 | ATCC)

DU145 ve PC3 hücrelerinin metastatik seviyesi kıyaslandığında PC3 hücrelerinin DU145 hücrelerine göre daha yüksek metastatik potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Lopez-Cavestany vd., 2023).

3.2. Yöntem

3.2.1. Sterilite İçin Laboratuvarda Alınan Önlemler

Hücre kültüründe kontaminasyonu engellemek için, hücre kültür laboratuvarının haftalık temizliği yapıldı. Laminer kabinin bütün yüzeyleri (alt hazneler dahil) %70 etanol ile silindi. İnkübatörün rafları %70 etanol ile silindi. İnkübatör içerisinde bulunan su haznesinin suyu distile ve otoklavlanmış su ile değiştirildi ve içerisine Aquaguard 1 eklendi. Su banyosunun suyu döküldükten sonra %70 etanol ile iç yüzeyler silindi. İçerisindeki su distile ve otoklavlanmış su ile değiştirildi ve içerisine Aquaguard 2 eklendi. Laboratuvarda kullanılan bütün yüzeyler %70 etanol ile yerler ise çamaşırlar suyu ile silindi. Her kullanım öncesinde ise laminer kabinin ultraviyole (UV) ışığı 15 dakika (dk) açık tutuldu. Çalışmaya başlanmadan önce kabinin havalandırması 15 dk. boyunca çalıştırıldı. Kabinin üst yüzeyleri %70 etanol ile silindi ve kullanılan her malzeme %70 etanol ile alkollenerek kabin içerisine alındı. Kullanım sonrasında, yüzeyler %70 etanol ile alkollendi ve laminer kabinin UV ışığı 15 dk. açıldı. Hücre kültür odasında kontaminasyonun gelişmesini engellemek için oda ısısı 20 °C'nin altında tutuldu.

3.2.2. Hücre Kültür Medyası Hazırlanması

PNT1A normal prostat hücreleri için %10 FBS, %1 L-glutamine ve %1 penicilin-streptomycin ile tamamlanmış RPMI 1640 medyası hazırlandı. DU145 ve PC3 kanser hücreleri için ise %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 L-glutamine ve %1 penicilin-streptomycin ile tamamlanmış DMEM high glucose medyası hazırlandı. Tekrarlanan ısıtımlarda medya kalitesinin düşmemesi için tamamlanan kültür medyası 50 mL'lik falkonlara geçirildi ve kapakları parafilm ile kapatıldı. +4°C'de saklanan medyalar kullanım öncesi çıkarıldı ve 37 °C'de olan su banyosunda ısıtıldı. (Alamoudi vd., 2018)

3.2.3. Hücre Çözülmesi ve Büyütülmesi

Azot tankından alınan hücre içeren kriyovial, 37 °C olan su banyosunda içerisinde küçük buz parçası kalana kadar eritildi. Laminer kabin altında, kriyovial içeriği 15 mL'lik falkon tüpe geçirildi ve üzerine önceden hazırlanmış kültür medyasından 9 mL damla damla ve yavaş bir şekilde eklendi. 200xg ve 7 dakika

boyunca santrifüj edildikten sonra tüpte bulunan süpernatant atıldı. Hücre pelleti 8 ile 12 mL kültür medyası ile çözüldü ve hücrelerin birbirinden ayrılıp tek hücre haline gelmesi için serolojik pipet ile pipetaj yapıldı. Devamında, T75 flaska ekildi ve 37 °C ve %5 CO₂'de olan inkübatörde inkübe edildi. Her gün, medyanın rengi ve optik invert mikroskop altında hücre yoğunluğu kontrol edildi. Hücrelerin iki güne bir medya değişimi gerçekleştirildi.

3.2.4. Hücre Pasajlanması

Konfluensiye ulaşan hücrelerin pasajlanması gerçekleştirildi. Trypsini inhibe eden FBS fazlalığından kurtulmak için, kültür medyası çekildikten sonra hücreler önceden ısıtılmış 5mL kalsiyum ve magnezyum içeren Fosfat-Tamponlu Salin Çözeltisi (DPBS) ile yıkandı. Hücrelerin basınç ile kalkmasını engellemek için DPBS T75 flaskın duvarına doğru konuldu. DBPS çekilip %0,25-%0,05 tripsin-EDTA'dan 2 mL eklendi. 4 dk. boyunca T75 flask 37°C ve %5 CO₂'de olan inkübatörde inkübe edildi. Aynı anda birkaç tane flask tripsine edildiği zaman, ısı dağılımının eşit bir şekilde sağlanması için flasklar üst üste yerine yana yana dizildi. İnkübasyon sonunda, hücrelerin kalktığı mikroskop altında kontrol edildi. Kalkmayan hücreleri mekanik olarak kaldırmak için, T75 flask sert bir zemine yavaşça vuruldu. Trypsinin etkisini durdurmak için T75 flaskın içerisine FBS içeren kültür medyasından tripsin miktarının en az 2 veya 3 katı olacak şekilde (4-6mL) eklendi. T75 flaskının içeriği çekilip 15 mL'lik falkona geçirildi ve 200xg ve 7 dk. boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, hücre pelleti üzerine kültür medyasından eklendi. Pasajlama esnasında yoğunluğa göre 2 veya 3 adet T75 flaska ekim yapıldı. İki adet T75 flaska ekim yapıldığı zaman, pellet 4 mL medyada çözüldükten sonra T75 flaska geçirildi ve üzerine 4 mL medya eklendi. Flaskın üzerine hücre adı, pasaj numarası, tarih ve işlemi gerçekleştiren kişinin adı yazıldı.

3.2.5. Hücre Dondurulması

Hücreleri uzun süre saklamak için, hücreler dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak 2X dondurma medyası hazırlandı. Dondurulacak kriyovial sayısına göre %20 FBS, %20 Dimetil Sülfoksit (DMSO), %80 medya ile hazırlandı ve +4°C soğuması için bekletildi. Hücre pasajlama aşamasındaki

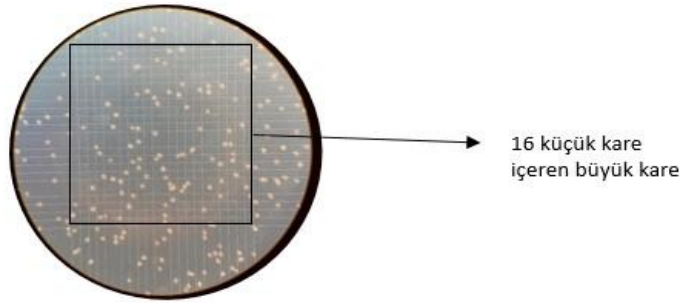
gibi hücreler kaldırılıp santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellet dondurulacak kriyovial sayısına göre, medyada çözöldü. Bir kriyovial için 750 µL költür medyası eklendi. Kriyovial üzerine hücre adı, pasaj numarası, tarih ve dondurma işlemini yapan kişinin adı yazıldı. Kriyovial buz üzerine ve laminar kabin altına alındı. Hücreler kriyovial içersinde alındı ve üzerine yavaş yavaş 750 µL dondurma medyası eklendi. Kriyovial 1 dakikada 1°C soğuma sağılayan CoolCell® kutusu ile 24 saat -80°C saklandı. Daha uzun bir saklama sağılamak için kriyovial -196°C olan sıvı azot tankına alındı.

3.2.6. Hücre Sayımı

Hücrelerin belirli sayıda ekilmesi gereken deneylerde, hücre sayımı gerçekleştirildi. Bunun için, hücre pasajlama aşamasındaki gibi hücreler tripsin ile kaldırıldı ve santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Hücre pelleti, hücre yoğunluğuna göre medyada çözöldü. Sayım esnasında yoğunluğu azaltmak için, konfluent T75 flasktan elde edilen hücre pelleti 4 mL medyada çözöldü ve hücrelerin birbirinden ayrılıp tek hücre haline gelmesi için serolojik pipet ile pipetaj yapıldı. Sayım için eppendorf içersine 100 µL trypan blue eklendi. Hücre süspansiyonu tekrardan iyice karıştırıldıktan sonra falkonun ortasından 100 µL hücre çekildi ve eppendorfa geçirildi. Karıştırıldıktan sonra ve eppendorfun ortasından 10 µL çekildi ve Thoma lamı üzerinde kuyucuğā konuldu. Thoma lamında, 16 küçük kareyi içeren büyük kareye düşen hücreler sayıldı. Kenarlara düşen hücreler için, 4 kenardan sadece 2 kenar üzerine düşen hücreler sayıldı. Sayım işlemleri aşağı ve yukarıdaki kuyucukta tekrarlandı. Toplam hücre sayısını hesaplamak için ilk olarak elde edilen hücre sayısının ortalaması alındı. Devamında 1:1 oranında trypan blue ve hücre eklendiği için hücre sayısı 2 ile çarpıldı. Son olarak, Thoma lamının katsayısı olan 10.000 ile çarpıldı. Elde edilen sonuç 1 mL medyada hücre sayısını verirken hücreleri 4 mL medyada çözödüğümüz için toplam hücre sayısını belirlemek için 4 ile çarpıldı.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10.000 \times \text{Hücre Hacmi}$$

Şekil 3.2’de gösterilen fotoğrafta 95 hücre sayıldı. Hücreler 4 mL çözöldüğü için 4 mL’de toplam 7.600.000 hücre bulunmaktadır.



Şekil 3.2 Optik invert mikroskop altında Thoma lamında sayım yapılan alan (X10)

3.2.7. CBG ve DCX'in Hazırlanışı

CBG molekülünün etanolde çözünürlüğü 30 mg/mL (=30g/L) olarak, moleküler ağırlığı ise 316,5 g/mol olarak satıcı tarafından belirtilmiştir. CBG etanolde daha yüksek oranda çözündüğü ve DMSO'ya göre daha az toksik olduğu için seçildi (Nguyen vd., 2020). 30 mg CBG 1.000 µL etanolde çözülmemektedir. Bu şekilde çözülmediğinde elde edilen CBG konsantrasyonunu hesaplamak için şu formül kullanılmıştır: *molar konsantrasyon (mol/L) = kütle konsantrasyonu (g/L) /moleküler ağırlık (g/mol)*. CBG için $30/316,5 = 0,0947 \text{ mol/L} = 94,7 \text{ mM} = 94.700 \text{ µM}$ olarak hesaplandı. Deneylerimizde, 5mg CBG kullanacağımız için toplam etanolde 167 µL çözülmedi ((5x1) / 30). Kullanacağımız deneylerde, pipetajı kolaylaştırmak için CBG konsantrasyonu, 94,7mM'dan 30mM'a etanol eklenerek getirildi. Konsantrasyon düşürülürken deneylerde kullanacağımız etanol hacminin toplam hacmin %0,15 altında olmasına dikkat edildi. Literatüre bakıldığında, etanolün hücreler üzerinde %0,15-1,25 arasında herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir (Nguyen vd., 2020).

DCX molekülünün DMSO'da çözünürlüğü 92 mg/mL, moleküler ağırlığı ise 807,9 g/mol olarak satıcı tarafından belirtilmiştir. DCX'in çözünürlüğü etanolde düşük olduğu için, çözücü olarak DMSO seçildi. DCX, 543µL DMSO'da çözülmedi ve 11,38 mM konsantrasyonunda bir ana stok elde hazırlandı. Deneylerde kullanılmak için ise, 11,38 µM'lık ara stok hazırlandı. DCX içinde, DMSO hacminin toplam hacmin %0.15 altında olmasına dikkat edildi. Bu kapsamda literatüre bakıldığında DMSO'nun hücreler üzerinde %0,15-0,6 arasında herhangi bir sitotoksik etkisi bırakmadığı gösterilmiştir (Nguyen vd., 2020).

3.2.8. Sitotoksisite Testi

Normal ve prostat hücreleri T75 flaskta büyütüldü ve sitotoksisite deneyi için yeterli hücre sayısına ulaşıncaya, hücreler kaldırılıp sayıldı. Laboratuvarında yapılan diğer deneylerde sitotoksisite deneylerinde kullanılacak prostat hücre sayısı optimize edilmişti. PNT1A hücrelerinden, 4.000 hücre/kuyucuk, DU145 ve PC3 hücrelerinden ise 3.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekim yapılması optimize edilmiştir. Hücreler sayıldıktan sonra, hücrelerden alınacak hücre sayısını belirlemek için, aşağıdaki formül kullanıldı.

Kuyucuk Başına Ekilecek Hücre Sayısı x (Ekilecek Kuyucuk Sayısı + Fazladan 10 Kuyucuk)

Kenar etkisini engellemek için, 96 kuyucuklu plakanın kenarlarına steril ddH₂O konuldu. Literatürde belirtildiği üzere, kenar ve köşedeki kuyucuklarda kültür esnasında daha fazla buharlaşma olduğu için, bu kuyucuklar deneye dahil edilmedi (Mansoury vd., 2021). Kalan 60 kuyucuğa ekim yapılacağı ve örneğin PNT1A hücreleri kullanıldığında gerekli hücre sayısı $4.000 \times (60+10) = 280.000$ olarak hesaplandı. Sitotoksisite deneylerinde, zamana bağlı olarak sitotoksisiteye bakıldığından dolayı, 24, 48, 72 saat için 3 adet 96 kuyucuklu plaka için hesaplamalar yapıldı ($210.000 \times 3 = 840.000$ hücre). Hücre sayımı (3.2.6) bölümünde verilen örnek ile devam edildiğinde, 4 mL medyada çözölmüş ve 7.600.000 hücre içeren medyadan ne kadar alınmasını belirlemek için şu formül kullanıldı:

(İstenilen Hücre Sayısı x Hücrelerin Çözölmüş Olduğu Toplam Hacim) / Toplam Hücre Sayısı
Örneğin, eğer 840.000 hücre istiyorsak 4 mL (4.000 µL) medyada çözölmüş ve 7.600.000 hücre içeren medyadan $(840.000 \times 4.000) / 7.600.000 = 442\mu\text{L}$ alınması gerekli olduğu hesaplandı. Hücreleri ekmek için, gerekli olan hacmi belirlemek için ise şu formül kullanıldı:

(Ekilecek Kuyucuk Sayısı + Fazladan 10 Kuyucuk) x Kuyucuk Hacmi (100 µL)

Bu formüle göre, gerekli olan toplam hacim $(60+10) \times 100 = 7.000 \mu\text{L}$ olarak hesaplandı. 24, 48, 72 saat için, 3 adet 96 kuyucuklu plakaya toplam $7000 \times 3 = 21.000\mu\text{L}$ (21mL) medya gerekli olduğu hesaplandı. Aynı örnek üzerinden hesaplandığında, 4 mL'lik hücre solüsyonundan 442 µL alında ve üzerine 20.558 µL kültür medyası eklendi. Hazırlanan hücreler, her kuyucukta 100 µL olacak şekilde çok kanallı pipet aracılığı ile 60 kuyucuğa ve 3 adet 96 kuyucuklu plakaya dağıtıldı. Plaka üzerine hücre adı, pasajı, tarih, yapılan deney ve işlemi yapan kişinin adı yazıldı. Hücrelerin plakaya tutunması için, 37 °C ve %5 CO₂ olan inkübatörde 24 saat inkübe

varlığında belirli mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından turuncu bir formazan bileşiğine dönüştürülebilen MTT'ye benzeyen bir maddedir. Üretilen formazan miktarı spektrofotometrik ölçüm sonrasında doğrudan canlı hücrelerin miktarıyla bağlantılıdır (Chen vd., 2020). Bu nedenle inkübasyon sonunda 450 nm boyutunda okuma yapıldı. Elde edilen Optik Dansite (OD) değerleri Excel dosyası olarak kaydedildi. GraphPad Prism 9 programı ile yapılan istatistiksel analiz sonrasında, konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı grafiği çizildi. IC₅₀ değerini hesaplamak için, AAT BIOQUEST IC50 Calculator çevrimiçi platform kullanıldı.

3.2.9. İki Boyutlu Migrasyon Testi/ Scratch Testi/ Yara İyileşme Testi

İki boyutlu migrasyon testi için prostat kanser hücreleri T75 flaskta büyütüldü. İçin yeterli hücre sayısına ulaşıncaya, hücreler kaldırıldı ve sayıldı. Her flakta 100.000 hücre olması için hücreler falkonda hazırlandı. Bu test için, 24 luklu plaka kullanıldı. Hücreler ekilmeden, her kuyucuğun altına silinmez keçeli ile enine çizgi çizildi. Ardından medyada süspansiyon edilmiş hücrelerden, her

kuyucukta 1 mL olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler, inkübatörde tamamen (%90-100) konfluensiye ulaştıktan sonra “yara” oluşturuldu. Bunun için ilk olarak, CBG ve etanol içeren medyalar hazırlandı. Farklı konsantrasyonlar için, farklı falkonlarda medyalar hazırlandı. 24 kuyucuklu plakadaki medyalar çekildi ve önceden ısıtılmış kalsiyum ve magnezyum içeren DPBS’den 1 mL/kuyucuk eklendi. 100 µL pipet ucu aracılığı ile kuyucuğun ortasından ve alta çizdiğimiz çizgiye dik bir çizgi çizildi. Çizik atılan kısımdan kalkan hücrelerden kurtulmak için, plaka biraz sallandıktan sonra DPBS çekildi ve hazırlanan medyalardan 1 mL/kuyucuk konuldu. “Yara” oluşturulduktan hemen sonra, optik invert mikroskop altında 0 saat olarak her kuyucuğun fotoğrafı çekildi. Bu deneyde, oluşturduğumuz yaranın kapanma yüzdesini hesapladığımız için, aynı yerden fotoğraf çekmemiz önemliydi. Bu nedenle fotoğrafı çekerken, kuyucuğun altına çizdiğimiz çizgi ile oluşturduğumuz çizginin birleştiği yerden fotoğraf çekildi. Kuyucuğun altındaki çizgi mikroskop merceğinden görünmeyecek ama merceğin tam yukarısında olacak şekilde ve yara ile kesiştiği yerden fotoğraf çekildi. Hücreler, inkübatörde inkübe edildi ve aynı şekilde 24 saat sonra fotoğraf çekildi. Her koşul için, 3 tekrar yapıldı ve deney 3 kere tekrarlandı. Elde edilen fotoğraflar, Tscratch programı ile analiz edildi. Elde edilen kapanma yüzdeleri, GraphPad Prism 9 ile istatistiksel olarak analiz edildi. Analiz sonrası kullanılan CBG konsantrasyonuna göre yara kapanma oranını gösteren grafik çizildi (Capik vd., 2021).



Şekil 3.4 2D boyutlu migrasyon testinin iş akışı (Grada vd., 2017)

3.2.10. Üç Boyutlu Migrasyon Testi/ Transwell Migrasyon Testi

Prostat kanser hücreleri T75 flaskta büyütüldü ve deney için yeterli hücre sayısına ulaşınca hücreler kaldırılıp sayıldı. Bu deneyde, 24 kuyucuklara yerleştirilmiş 8 µm çapında deliklere sahip insertler kullanıldı. İnsertlerin, üst kısmının her birine 50.000 hücre ekildi. Ekim için, FBS içermeyen 250 µL/kuyucuk medya kullanıldı. Üst kısma eklenen medyaya, CBG veya etanol eklendi. Alt kısmına ise, 500 µL/kuyucuk

%10 FBS içeren medya eklendi. 24 saat boyunca inkübatörde kültür edildi. Fiksasyon öncesi %0,5 crystal violet (mor kristal) hazırlandı. Bunun için %100 crystal violet, %2 etanol ile sulandırıldı. %2 etanol elde etmek için ddH₂O kullanıldı. 24 kuyucuklu plakanın yeni kuyucuklarına 1 mL %100 metanol eklendi. Migrasyon gerçekleştirmemiş hücrelerden kurtulmak için, eküvyon çubuğu ile insertin üst kısmındaki hücreler temizlendi. İnsertler metanol olan kuyucuklara alındı. Hücrelerin olduğu, insertlerin alt kısmının bir yerlere değmemesine dikkat edildi. 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sırada, 24 kuyucuklu plakanın yeni kuyucuklarına yıkama için 1 mL PBS eklendi. İnsertler, inkübasyon sonunda yeni kuyucuklara alındı. Yeni kuyucuklara, başta hazırladığımız %0,5 crystal violet solüsyonundan 1 mL eklendi ve insertleri boyamak için, bu kuyucuklar alındı. Oda sıcaklığında 15 dk. inkübasyon sonunda, 1 mL PBS eklediğimiz yeni kuyucuklarda insertler yıkandı ve bu işlem 2 kere tekrarlandı. İnsertler yeni ve boş kuyucuklara alındı ve kurumaya bırakıldı (2-3 saat). İnvirt optik mikroskop ile 4X büyütmede fotoğraf çekildi. Her koşul 3 tekrarlı olacak şekilde tasarlandı. Çekilen fotoğraflarda, rastgele 4 farklı ve eşit alandaki hücreler sayıldı (Capik vd., 2021). Elde edilen sayılar, GraphPad Prism 9 programı ile istatistiksel olarak analiz edildi. Analiz sonrası kontrol ve CBG verilen koşullarda geçen hücre sayısını gösteren grafik çizildi (Capik vd., 2021).

3.2.11. DNA Fragmentasyon Testi

DNA fragmentasyon testi için normal ve kanser prostat kanser hücreleri T75 flaskta büyütüldü ve deney için yeterli hücre sayısına ulaşıncaya hücreler kaldırılıp sayıldı. 6 kuyucuklu plakanın her kuyucuğunda 300.000 hücre olacak şekilde 3 mL medya ile ekim yapıldı. 24 saat boyunca inkübatörde kültür edildikten sonra, önceden hazırladığımız CBG ve kontrol medyaları ile hücrelerin medyası değiştirildi ve inkübatöre alındı. 72 saat sonra hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldı ve 15 mL'lik falkona geçirildi. 200xg'de 7 dk. santrifüj edildikten sonra, süpernatant atıldı. Pellet ise, 200 µL DPBS ile çözüldükten sonra 1,5 mL eppendorfa alındı. Kullanılan DNA izolasyon kitinde belirtilen etaplara uygun olarak, 200 µL FATG1 eklendi ve mikropipet ile karıştırıldı. 20 µL proteinaz K eklendikten sonra ise vortekslendi ve 2 saat 15 dk. 60 °C'de inkübe edildi. Devamında, 200 µL FATG2 eklendi ve vortekslendi ve 10 dk. 70 °C'de inkübe edildi. Daha sonra, analiz seviyesinde etanolden 200µL eklendi ve vortekslendi. Sonrasında, FATG mini kolon üzerine alındı ve 15.000xg'de

2 dk. santrifüj edildi. Kolon, yeni bir toplama tüpü üzerine geçirildi ve 400 µL W1 buffer eklendikten sonra 15.000xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Kolondan geçen kısım atıldıktan sonra, kolon üzerine 750 µL Wash buffer eklendi ve 15.000xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Akan kısım atıldıktan sonra, kolonu kurutmak için 3 dk. 15.000xg'de santrifüj edildi. Elüsyon tüpü üzerine alınan tüpe, 50 µL elüsyon buffer eklendi ve 3 dk. inkübe edildikten sonra 2 dk. 15.000xg'de santrifüj edildi. Elde edilen DNA, -20 °C'de saklandı. Elde edilen DNA miktarını belirlemek için, Nanodrop cihazı ile ölçüm yapıldı. -20°C olan örnekler çıkarıldı ve presipite olan DNA'yı çözmek için eppendorf hafifçe vorteksledi. Nanodrop cihazında nükleik asit ölçümü seçildi ve nükleaz içermeyen 1 µL H₂O ile blank (beyaz) yapıldı. Sonrasında, 1µL DNA yüklenerek tek tek ölçüm yapıldı. Nanodrop ölçümleri ng/µL biriminde ölçüm vermektedir. Her ölçüm arasında, peçete ile DNA silindi. Ölçümde DNA miktarına ek olarak 260/280 nm oranı kaydedildi. DNA için bu oranın 1,8'e yakın olması, DNA saflığının bir belirtisi olarak bilinmektedir (Lucena-Aguilar vd., 2016). Örneklerin DNA miktarları belirlendikten sonra, örnekleri jel üzerine aynı miktarda yüklemek için hesaplamalar yapıldı. Yüklenecek kuyucuk hacmi 20µL olduğu ve her kuyucuğa en az 2 µL yükleme boyaması koyulması gerektiği için hesaplamalar bu doğrultuda yapıldı. En düşük DNA konsantrasyonu üzerinden, yüklenebilecek maksimum DNA miktarı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

(Kuyucuk Hacmi – Minimum Boya Miktarı) x En Düşük DNA Konsantrasyonu

Örneğin, en düşük DNA konsantrasyonunun 26,95 ng/µL olduğu deneyde, yüklenebilecek DNA miktarı $(20-2) \times 26,95 = 485$ ng olarak hesaplandı. Bu örnek için 18µL DNA ve 2µL yükleme boyası karıştırılması gerektiği hesaplandı. Aynı deneyde, örneğin, 128,4 ng/µL elde ettiğimiz bir örneğin her µL'sinde 128,4 ng DNA olduğu bilindiğinden, yüklenecek miktar aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Yüklenebilecek Maksimum DNA Miktarı / Örneğin µL Başı Olan DNA Miktarı

Bu formül doğrultusunda, yüklenecek DNA hacmi $485/128,4 = 3,77$ µL olarak hesaplandı. Bu örnek için, 16,23 µL DNA ve 3,77 µL yükleme boyası karıştırılması gerektiği hesaplandı. Örnekleri yürütmek için, %2 oranında agaroz jel hazırlandı. Bunun için, ilk olarak örnek sayısına göre tarak eklediğimiz jelin döküleceği tank hazırlandı. Devamında 2 g agaroz, hassas tartıda tartıldıktan sonra Erlenmeyere alındı ve üzerine 100 mL Tris-Asetat-EDTA (TAE) eklendi. Mikrodalgada içerisinde, parçacık kalmayana kadar ısıtıldı. Biraz soğuması için, Erlenmeyer suya tutuldu ve devamında DNA örneklerini görüntüleyebilmek için 5 µL RedSafe eklendi. Solüsyon

jel tankına döküldü ve katılaşması için en az 1 saat bekletildi. Yürütme için, jel elektroforez tankına alındı ve yürütme tamponu TAE eklendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Hesaplanan örnek ve yükleme boya hacimleri parafilm üzerinden karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. DNA bant boyutlarını görebilmek için, DNA Ladder yüklendi. Tank güç kaynağına bağlandı ve jel kuyucukları eksi elektrot kısmında olacak şekilde yerleştirildi. Yürütmeye 100 V ve 45 dk. boyunca yapıldı. DNA'ları görüntülemek için jel, görüntüleme cihazına alındı ve fotoğraf çekildi.

3.2.12. Apoptoz Proteinlerinin İmmün Boyaması

İmmün boyama deneylerinde kullanılacak 24 kuyucuklu plakalar içerisine 12 mm boyutunda yuvarlak cam coverslipler konuldu. Coversliplerin üzerine 250 µL/kuyucuk poly-L-lysine eklendi ve 45 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda poly-L-lysine çekildi ve kuyucuklar 1 mL steril PBS ile yıkandı. PBS çekildikten sonra plakanın ağzı açık bir şekilde laminar kabin altında kurumaya bırakıldı. Deney için, normal ve kanser prostat kanser hücreleri T75 flaksta büyütüldü ve yeterli hücre sayısına ulaşıncaya hücreler kaldırılıp sayıldı. 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuğunda 30.000 hücre olacak şekilde plakaya 1 mL medya ile ekildi. 24 saat sonra CBG ve etanol içeren medyalar hazırlandı. Hücrelerin medyası 4 CBG ve etanol içeren medyalar ile değiştirildi. 72 saat kültür edildikten sonra, medya çekildi ve 1 mL PBS ile yıkandı. Kuyucuk başı 200 µL 3.5X paraformaldehit (PFA) eklendi ve 25 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu etaptan itibaren hücreler fikse olduğu için, laminar kabinin dışında çalışıldı. İnkübasyon sonrasında, PFA çekildi ve 2 kere 1 mL PBS ile her kuyucuk yıkandı. Örnekler hemen görüntülenmediği için, her kuyucuğa 1,5 mL PBS azid eklendi ve plakanın etrafı parafilm ile sarıldıktan sonra +4°C'de saklandı. Kullanılacak primer antikolar optimize edilmiş konsantrasyonlarda sulandırıldı. Kaspaz-3 antikoru 1/100, kaspaz-8 antikoru 1/200, kaspaz-9 antikoru 1/300 ve BAX antikoru 1/250 oranlarında sulandırıldı. Coverslipler, pens aracılığı ile çıkarıldı. Hücreler yukarıda olacak şekilde alındı. Cam bir petrinin içerisine yerleştirilmiş parafilm üzerine, fazladan PBS bir peçeteye dokundurularak alındıktan sonra konuldu. Petrinin içerisine, coversliplerin inkübasyon aşamasında kurummasını engellemek için ddH₂O ile ıslatılmış bir peçete konuldu. Coverslip üzerine, primer antikordan 15 µL eklendi ve plakanın etrafı parafilm ile kapatıldıktan sonra 4°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında coverslip beher içerisinde olan PBS

batırılarak yıkandı. Bu işlem iki kere tekrarlandı ve coverslip petri üzerine tekrar alındı. Bu aşamadan sonra, minimum ışıktaki çalışıldı. Coversliplerin üzerine, 15 µL Floresein İzotiyosiyanat (FITC) sekonder antikor eklendi. Plakanın etrafı parafilm ve alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra 37 °C’de 1 saat 30 dk. inkübe edildi. Ardından, coverslip PBS’e batırılarak yıkandı. Bu işlem iki kere tekrarlandı ve coverslip petri üzerine tekrar alındı. Devamında, çekirdekleri boyamak için 7-aminoaktinomisin D’den (7-AAD) (1/100 sulandırılmış) 15 µL eklendi. Plakanın etrafı parafilm ve alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra 37 °C’de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, coverslip PBS batırılarak yıkandı. Lamel üzerine, 4 µL kapatma medyası konuldu ve coverslipte hücrelerin olduğu kısım medyaya gelecek şekilde kapatıldı. Etrafı şeffaf oje ile kapatıldıktan sonra lamelin kenarına hücre adı, kullanılan ilaç, kullanılan antikor ve tarih yazıldı. Oje kuruduktan sonra, görüntüleme yapılana kadar örnekler hiç ışık almayacak şekilde etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve -20 °C’de saklandı. Görüntüleme için örnekler önceden çıkarıldı ve ısındıktan sonra floresan mikroskop ile (40X) ile görüntülendi. Elde edilen görüntüler ImageJ programı ile analiz edildi.

3.2.13. İstatistiksel Analizler ve Verilerin Değerlendirilmesi

Sitotoksosite testi 8 grup ve 6 tekrar olacak şekilde dizayn edilmiştir. Deneyimizde gruplardaki örnek sayısını belirlemek için klasik istatistik örnek sayısı belirleme yöntemlerinin yanı sıra testin gücünü de dikkate alarak her gruptaki tekrarın sayısı 6 olarak belirlenmiştir. Deneyler completely randomized design (CRD)’e göre tasarlanmıştır. Sitotoksosite deneylerinden elde edilen kantitatif verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım testi için Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testleri kullanılmıştır. Normal dağılımı gösteren veriler one-way ANOVA analizi ile parametrik yöntemler kullanarak analiz edilmiştir. 0,05’in altında olan p değerleri ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

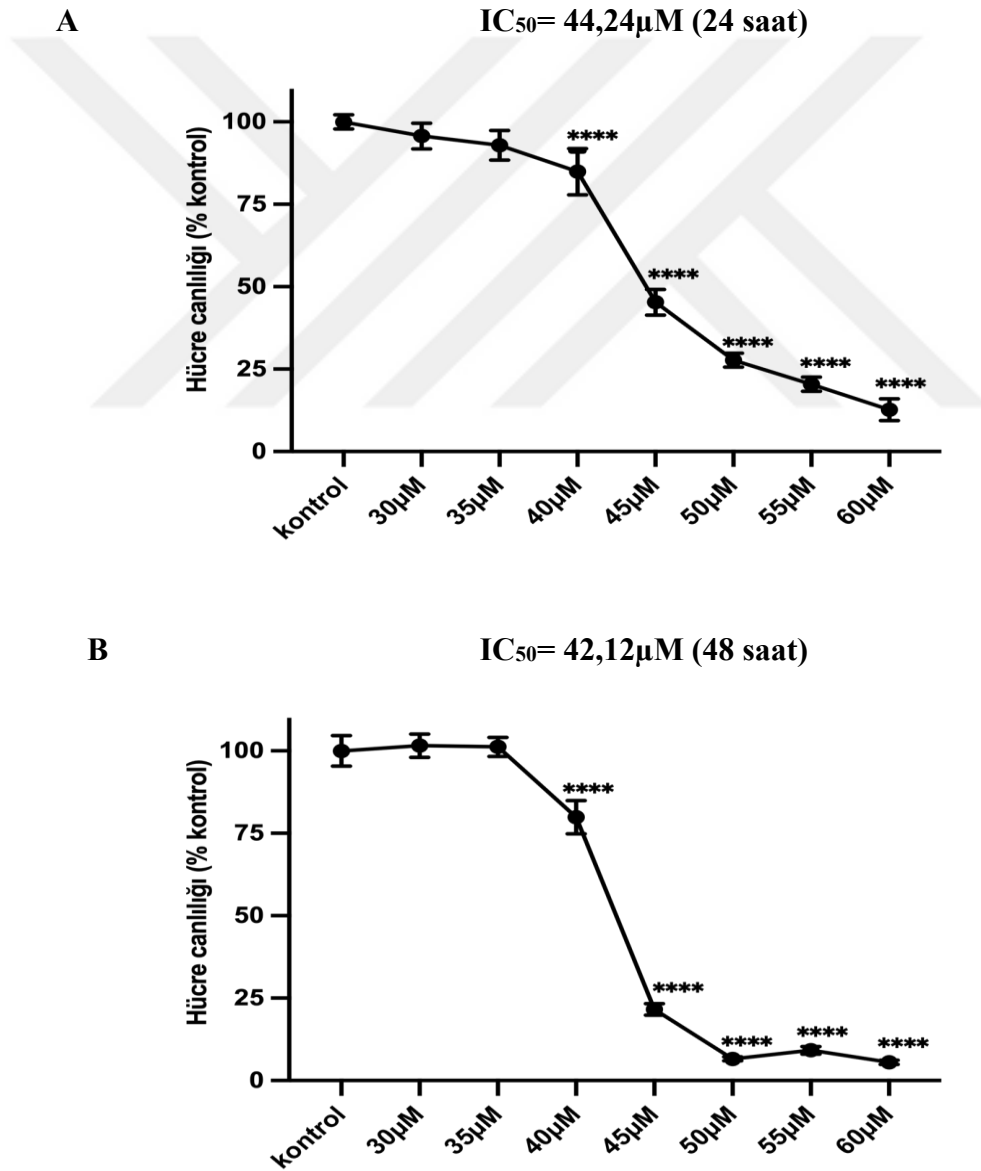
İki ve üç boyutlu testlerinde kantitatif verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım testi için Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testleri kullanılmıştır. Normal dağılımı gösteren veriler t-test analizi parametrik yöntemler kullanarak analiz edilmiştir ve 0,05’in altında olan p değerleri ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

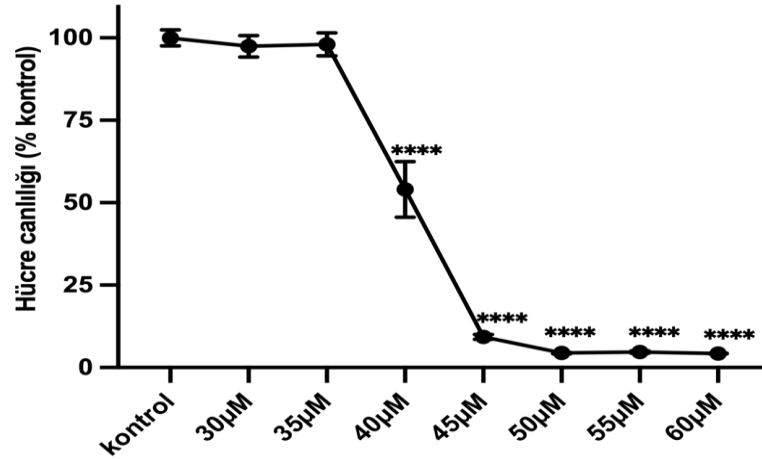
4.1. CBG'nin, Normal ve Prostat Kanser Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

4.1.1. CBG'nin, PNT1A Normal Prostat Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi ve DCX İle Karşılaştırılması

CBG'nin, PNT1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 testi ile belirlenmesi



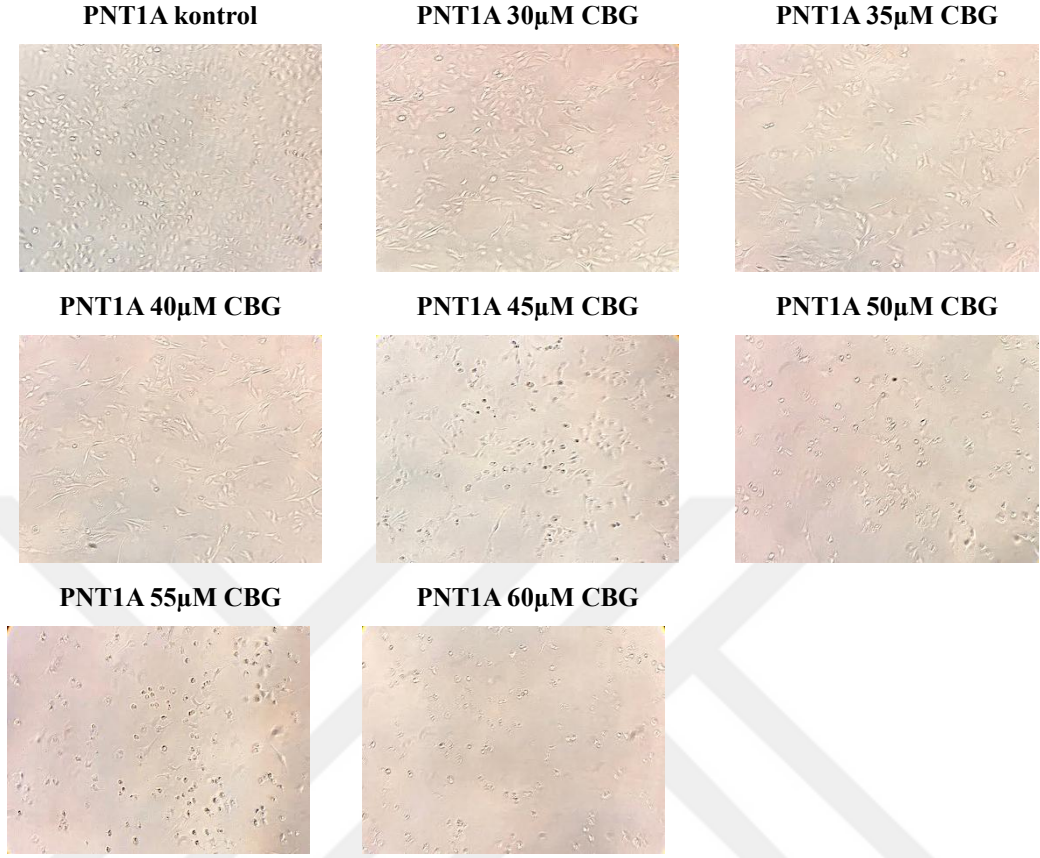
C

IC₅₀= 40,15µM (72 saat)

Şekil 4.1 CBG'nin PNT1A normal prostat hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 metodu ile belirlenmesi. A)24 saat, B)48 saat C)72 saatlerde 30 ile 60 µM arasında CBG uygulanan PNT1A hücrelerinin canlılığı tespit edilmiştir. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. IC₅₀ hücre canlılığı üzerinden hesaplanmıştır. Anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

PNT1A normal prostat hücreleri 30 ile 60 µM arasında CBG ile, 24, 48 ve 72 saat boyunca kültür edilmiştir. Kontrol olarak, CBG'yi çözmek için kullanılan etanol kullanılmıştır. Hücre canlılığını tespit etmek için WST-8 testi gerçekleştirilmiştir. 24 saat boyunca CBG'ye maruz kalan PNT1A hücrelerinde, canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 40 µM sonrasında gerçekleşmekte olup 30 ve 35 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir sitotoksosite görülmemektedir. PNT1A için, 24 saatte IC₅₀ değeri 44,24 µM olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, 48 saat CBG ile muamele edilen PNT1A hücrelerinde, canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 40 µM sonrasında gerçekleşmekte olup 30 ve 35 µM konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksosite görülmemektedir. PNT1A için, 48 saatte IC₅₀ değeri 42,12 µM olarak hesaplanmıştır. Son olarak, 72 saat boyunca CBG'ye maruz kalan PNT1A hücrelerinde, hücre canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 40µM sonrasında gerçekleşmekte olup 30 ve 35µM konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksosite görülmemektedir. PNT1A için 72 saatte IC₅₀ değeri 40,15 µM olarak hesaplanmıştır.

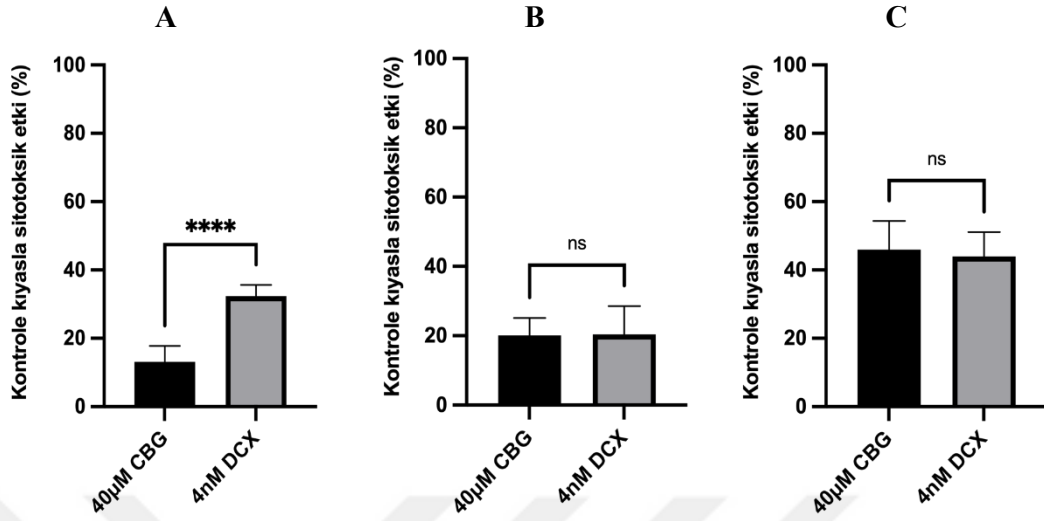
CBG'nin, PNT1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin DIC mikroskop ile tespiti



Şekil 4.2. *PNT1A normal prostat hücrelerinin 30 ile 60µM arasında CBG ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra DIC mikroskop görüntüleri.*

PNT1A normal prostat hücreleri 30 ile 60 µM arasında CBG ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra DIC mikroskopu ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde, CBG konsantrasyonu artıkça hücre canlılığın azaldığı görülmektedir. Özellikle, 45µM CBG'ye maruz kalan hücrelerin morfolojisinin daha yuvarlak hale geldiği görülmekte ve yuvarlak hücrelerin sayısı konsantrasyon ile birlikte artmaktadır.

CBG ile DCX'in PNT1A hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



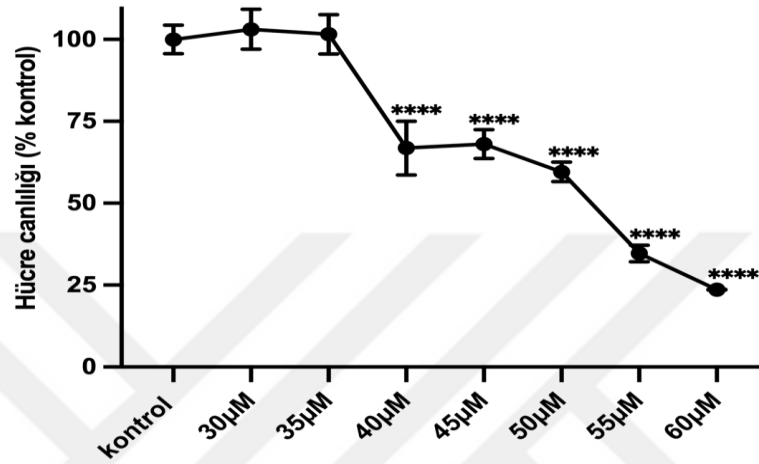
Şekil 4.3 40 µM CBG veya 4 nM DCX'e maruz kalan PNT1A normal prostat hücrelerinde, sitotoksik etkinin karşılaştırılması. A)24 saat, B)48 saat ve C)72 saat CBG ve DCX maruziyeti sonrasında hücre canlılığı WST-8 testi ile ölçülmüştür. CBG için, kontrol olarak etanol kullanılırken DCX için DMSO kullanılmıştır. Hücre canlılığı verileri ters orantılı şekilde sitotoksik etki olarak gösterilmiştir. Anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

PNT1A normal prostat hücreleri 40 µM CBG'ye veya 4 nM DCX maruz bırakılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı ölçülmüştür. PNT1A hücrelerinde ve 24 saatte, 4 nM DCX'e kıyasla 40 µM CBG'nin anlamlı düzeyde daha az sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, 48 ve 72 saatlerde, 4nM DCX'in kıyasla 40µM CBG'nin anlamlı olarak aynı düzeyde sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir.

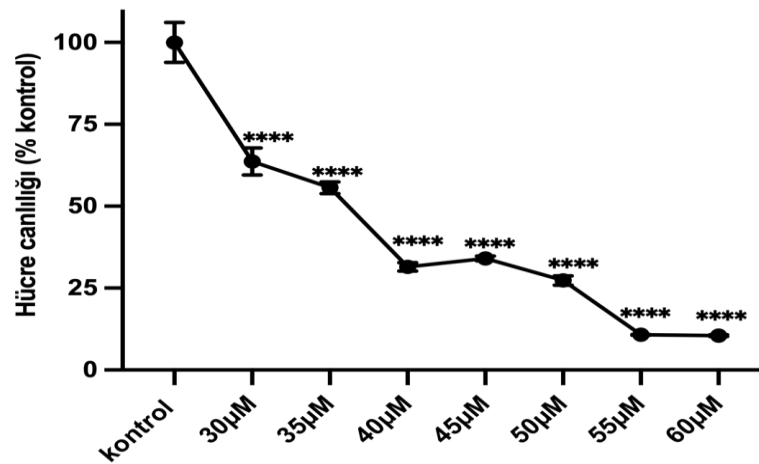
4.1.2. CBG'nin, DU145 Prostat Kanser Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

CBG'nin, DU145 prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 testi ile belirlenmesi

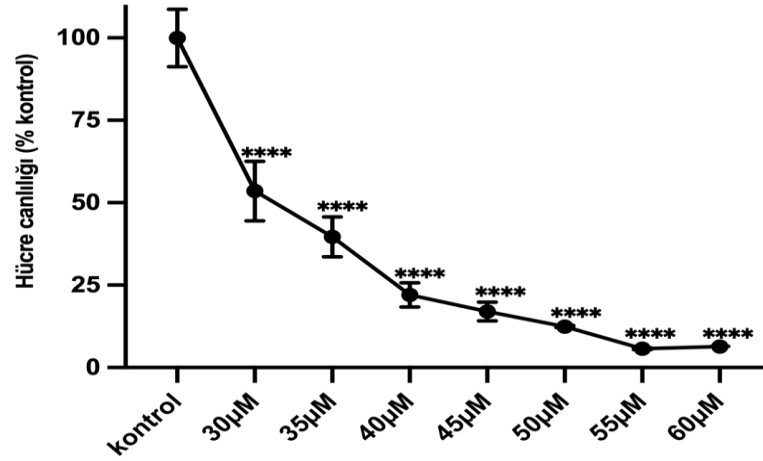
A $IC_{50} = 45,48\mu M$ (24 saat)



B $IC_{50} = 33,33\mu M$ (48 saat)



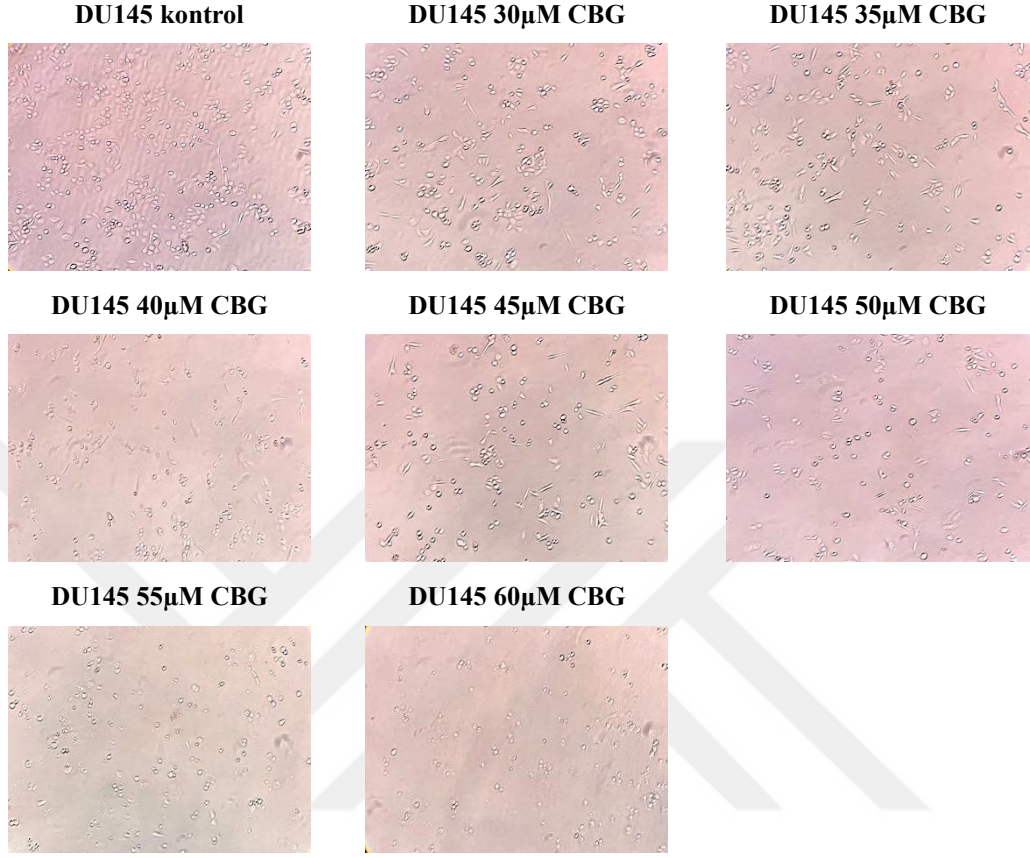
C

IC₅₀= 30,57µM (72 saat)

Şekil 4.4 CBG'nin DU145 prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 metodu belirlenmesi. A)24 saat, B)48 saat C)72 saatlerde 30 ile 60 µM arasında CBG uygulanan DU145 hücre canlılığı tespit edilmiştir. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. IC₅₀ hücre canlılığı üzerinden hesaplanmıştır. Anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

DU145 prostat kanser hücreleri 30 ile 60 µM arasında CBG ile 24, 48 ve 72 saat boyunca kültür edilmiştir. Kontrol olarak, CBG çözmek için kullanılan etanol kullanılmıştır. Hücre canlılığını tespit etmek için WST-8 testi kullanılmıştır. 24 saat boyunca CBG'ye maruz kalan DU145 hücrelerinde, canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 40µM sonrasında gerçekleşmekte olup 30 ve 35µM konsantrasyonlarında anlamlı bir sitotoksiste görülmemektedir. DU145 için, 24 saatte IC₅₀ değeri 45,48 µM olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, 48 saat CBG ile muamele edilen DU145 hücrelerinde, canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 30µM'ın sonrasında gerçekleşmekte olup hücre canlılığı diğer konsantrasyonlarda çok düşük seviyelere inmektedir. DU145 için, 48 saatte IC₅₀ değeri 33,33 µM olarak hesaplanmıştır. Son olarak, 72 saat boyunca CBG'ye maruz kalan DU145 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 30 µM'dan itibaren gerçekleşmekte olup diğer konsantrasyonlarda ise hücre canlılığı önemli miktarda azalmaktadır. DU145 hücreleri için, 72 saatte IC₅₀ değeri 30,57 µM olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığı, CBG konsantrasyonları ile orantısal olarak azalmaktadır.

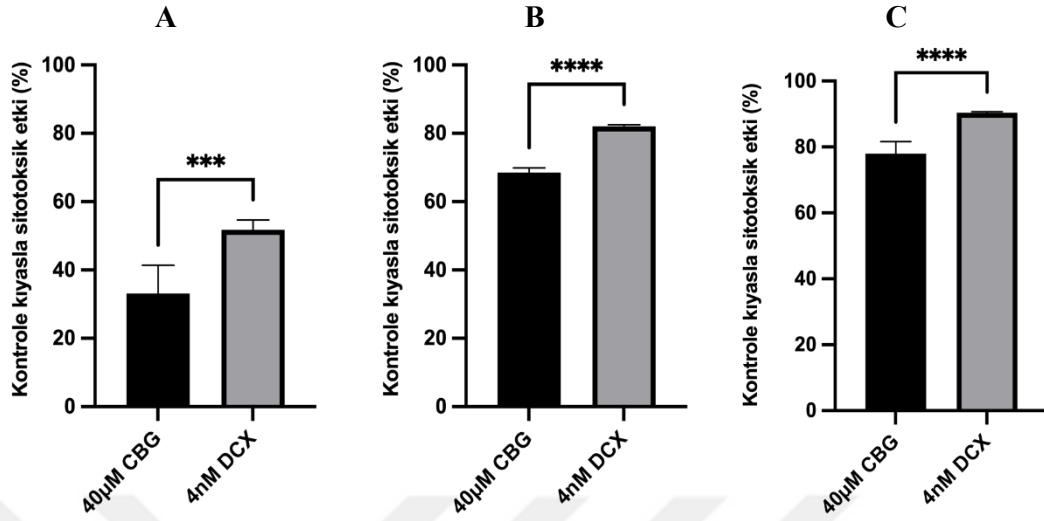
CBG'nin, DU145 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin DIC mikroskop ile tespiti



Şekil 4.5 *DU145 prostat kanser hücreleri, 30 ile 60µM arasında CBG ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra DIC mikroskop görüntüleri.*

DU145 prostat kanser hücreleri, 30 ile 60 µM arasında CBG ile 24 saat muamele edildikten sonra DIC mikroskop ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde, CBG konsantrasyonu artıkça hücre canlılığın azaldığını görülmektedir.

CBG ile DCX'in, DU145 hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.6, 40 μ M CBG veya 4nM DCX'e maruz kalan DU145 prostat kanser hücrelerinde, sitotoksik etkinin karşılaştırılması. A)24 saat, B)48 saat ve C)72 saat CBG ve DCX maruziyeti sonrasında hücre canlılığı WST-8 testi ile ölçülmüştür. CBG için, kontrol olarak etanol kullanılırken DCX için DMSO kullanılmıştır. Hücre canlılığı verileri ters orantılı şekilde sitotoksik etki olarak gösterilmiştir. Anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

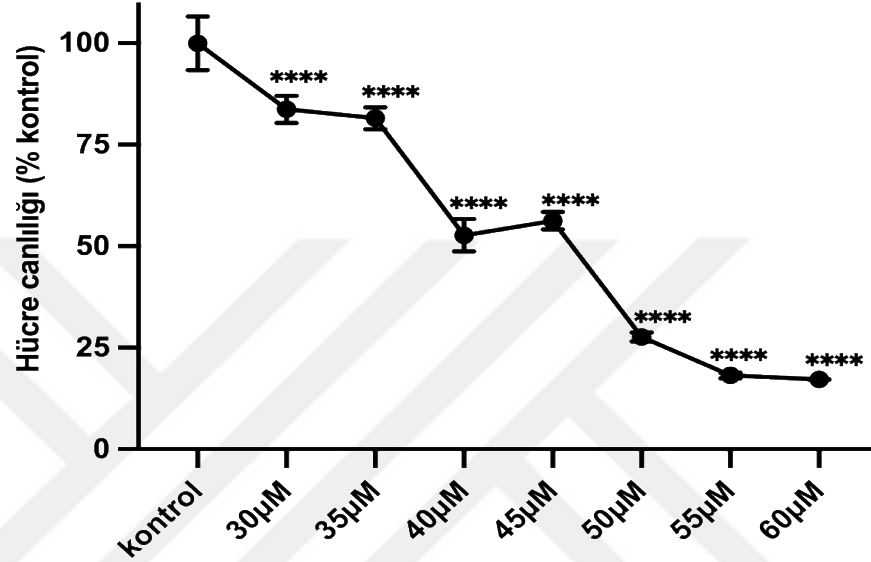
DU145 prostat kanser hücreleri, 40 μ M CBG'ye veya 4 nM DCX'e maruz bırakılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı ölçülmüştür. DU145 hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saatlerde, 40 μ M CBG'ye kıyasla 4 nM DCX'nin DU145 hücrelerinde anlamlı düzeyde daha fazla sitotoksik olduğu gösterilmiştir.

4.1.3.CBG'nin, PC3 Prostat Kanser Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

CBG'nin, PC3 prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 testi ile belirlenmesi

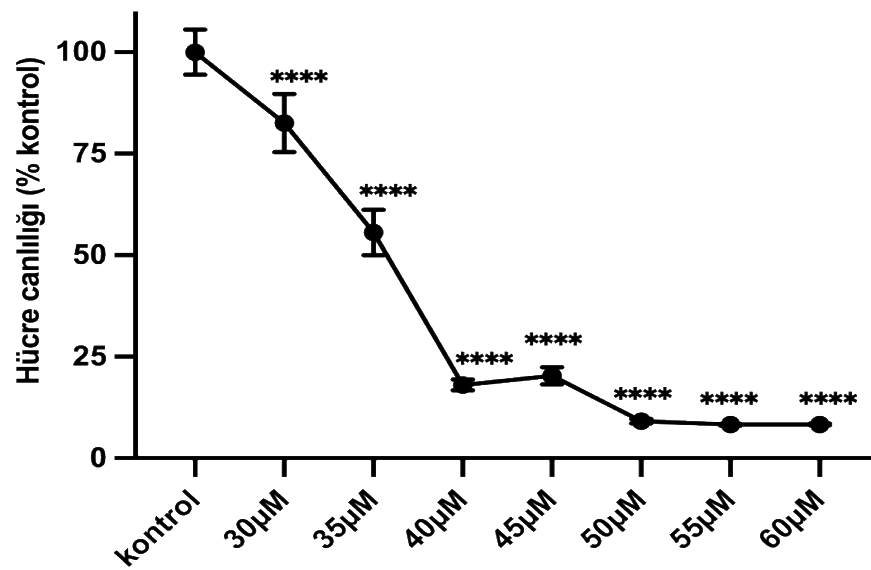
A

$IC_{50}= 40,91\mu M$ (24 saat)

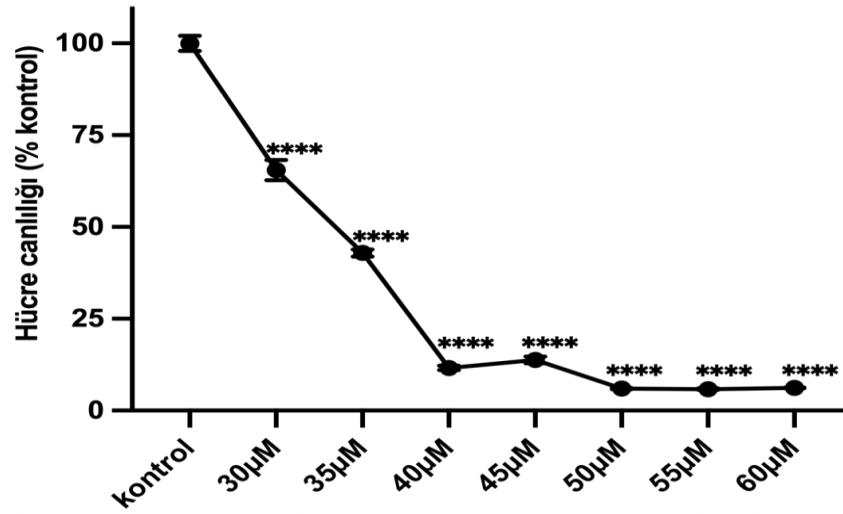


B

$IC_{50}= 34,82\mu M$ (48 saat)



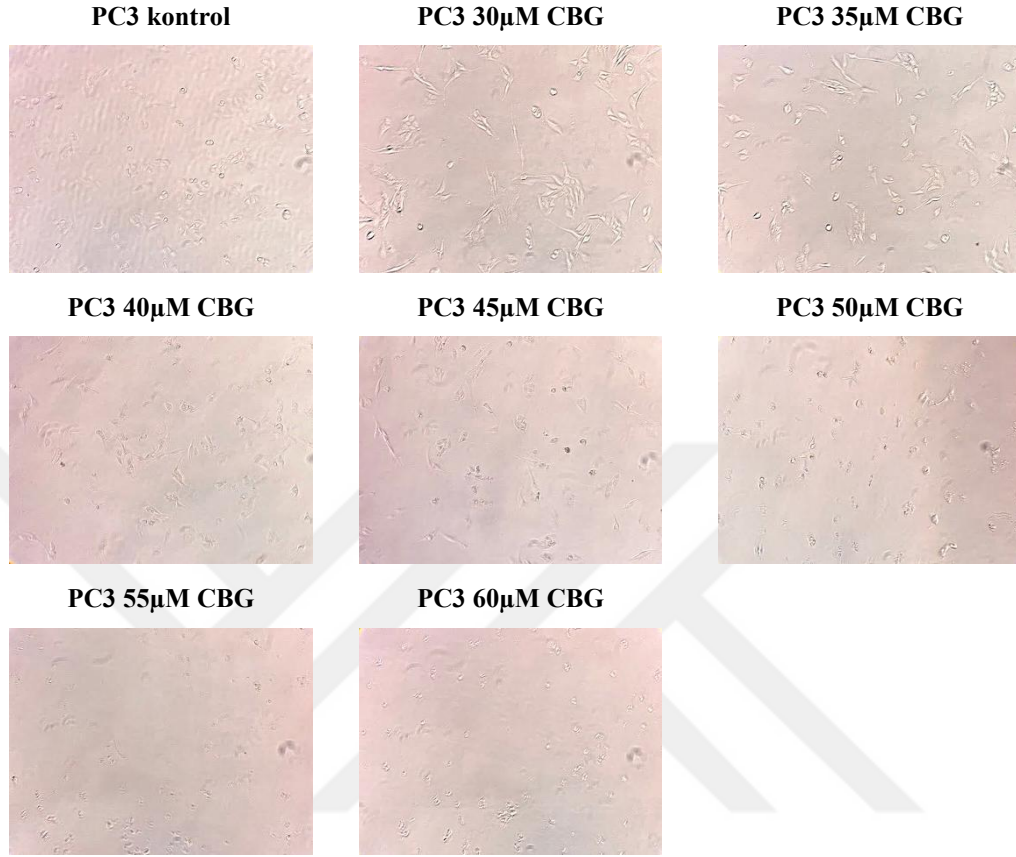
C

IC₅₀= 32,48µM (72 saat)

Şekil 4.7 CBG'nin PC3 prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin WST-8 metodu belirlenmesi. A)24 saat, B)48 saat C)72 saatlerinde 30 ile 60 µM arasında CBG uygulanan PC3 hücrelerinde canlılık oranı tespit edilmiştir. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. IC₅₀ hücre canlılığı üzerinden hesaplanmıştır. Anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

PC3 prostat kanser hücreleri 30 ile 60 µM arasında CBG ile 24, 48 ve 72 saat boyunca kültür edilmiştir. Kontrol olarak CBG'yi çözmek için kullanılan etanol kullanılmıştır. Hücre canlılığını tespit etmek için WST-8 testi yapılmıştır. PC3 hücreleri için, 24 saat CBG maruziyeti sonrasında hücre canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması, 30 µM sonrasında gerçekleşmektedir. PC3 için 24 saatte IC₅₀ değeri 40,91 µM olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, 48 saat CBG ile muamele edilen PC3 hücrelerinde hücre canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması 30µM sonrasında gerçekleşmekte olup hücre canlılığı diğer konsantrasyonlar çok düşük seviyelere inmektedir. PC3 için, 48 saatte IC₅₀ değeri 34,82 µM olarak hesaplanmıştır. Son olarak, 72 saat boyunca CBG'ye maruz kalan PC3 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalması, 30µM'dan itibaren gerçekleşmektedir. Diğer konsantrasyonlarda ise hücre canlılığı önemli oranda düşmektedir. PC3 hücreleri için, 72 saatte IC₅₀ değeri 32,48 µM olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığı, CBG konsantrasyonları ile orantısal olarak azalmaktadır.

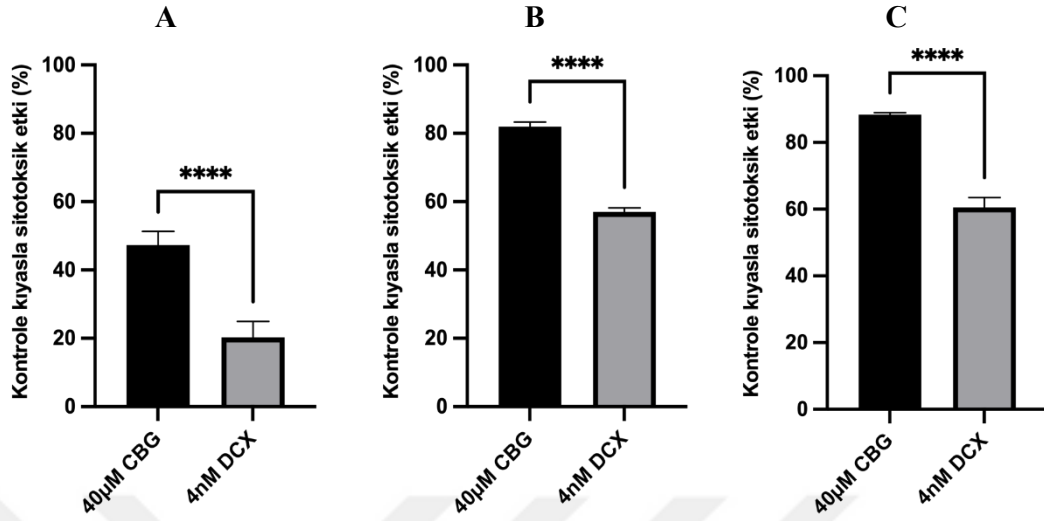
CBG'nin, PC3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin DIC mikroskop ile tespiti



Şekil 4.8 *PC3 prostat kanser hücreleri, 30 ile 60µM arasında CBG ile 24 saat muamele edildikten sonra DIC mikroskop görüntüleri.*

PC3 prostat kanser hücreleri 30 ile 60 µM arasında CBG ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra DIC mikroskop ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde, CBG konsantrasyonu artıkça hücre canlılığın azaldığını görülmektedir. Buna ek olarak, 30µM CBG'den itibaren kontrol hücelere kıyasla PC3 prostat kanser hücrelerinin morfolojisinin değiştiği ve daha uzun bir yapıya sahip olmaya başladıkları görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (40µM ve üzeri) ise hücre miktarı azalması ile kalan hücrelerinin daha yuvarlak oldukları görülmektedir.

CBG ile DCX'in, PC3 hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.9 40 µM CBG veya 4 nM DCX'e maruz kalan PC3 prostat kanser hücrelerinde, sitotoksik etkinin karşılaştırılması. A)24 saat, B)48 saat ve C)72 saat CBG ve DCX maruziyeti sonrasında hücre canlılığı WST-8 testi ile ölçülmüştür. CBG için, kontrol olarak etanol kullanılırken DCX için DMSO kullanılmıştır. Hücre canlılığı verileri ters orantılı şekilde sitotoksik etki olarak gösterilmiştir. Anlamlılık: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

PC3 prostat kanser hücreleri 40 µM CBG'ye veya 4nM Docetaxel maruz bırakılmıştır. Ardından, 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı ölçülmüştür. PC3 hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saatlerde, 4 nM DCX'e kıyasla 40 µM CBG'nin hücre canlılığını anlamlı düzeyde daha çok inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.9).

Tablo 4.1 Sitotoksikite deneylerinde elde edilen IC_{50} değerleri

	24 saat IC_{50}	48 saat IC_{50}	72 saat IC_{50}
PNT1A	44,24 µM	42,12 µM	40,15 µM
DU145	45,48 µM	33,33 µM	30,57 µM
PC3	40,19 µM	34,82 µM	32,48 µM

Sitotoksisite deneylerinden elde edilen sonuçlara ve IC₅₀'lere bakıldığında, PNT1A normal prostat hücrelerine kıyasla CBG'nin, DU145 ve PC3 prostat kanser hücreleri üzerinde daha sitotoksik olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, optimum konsantrasyon olarak belirlediğimiz 40 µM'da ise, DCX'e kıyasla CBG'nin PNT1A normal hücrelerde daha az sitotoksik etki bıraktığı görülmektedir. Diğer yandan, özellikle ileri seviye metastatik PC3 prostat kanser hücrelerinde CBG'nin daha sitotoksik olduğu görülmektedir.

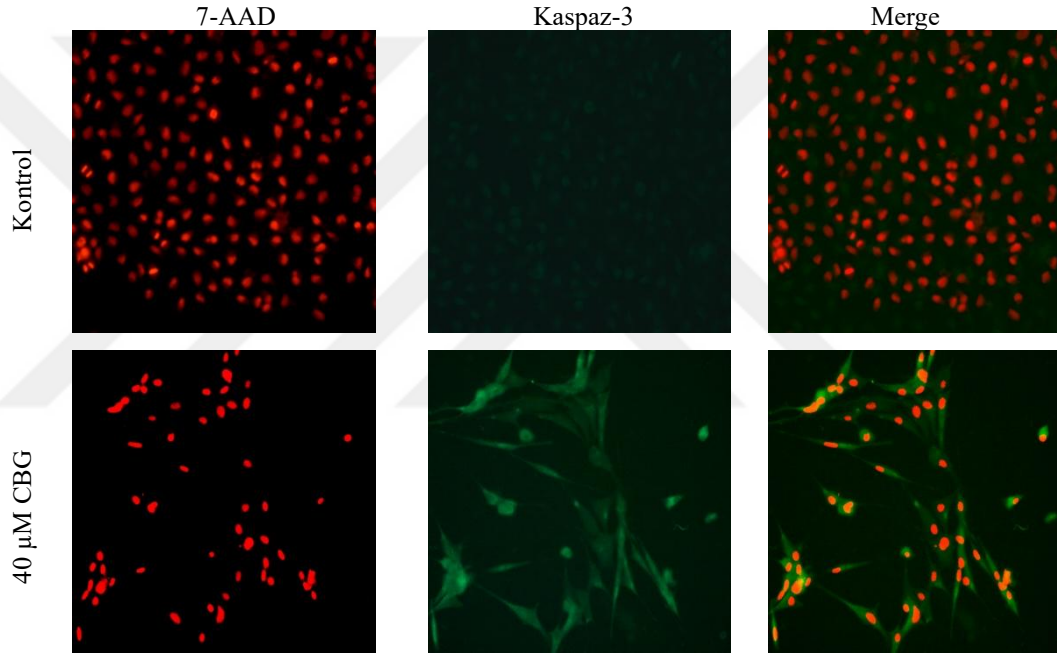


4.2. Normal ve Prostat Kanseri Hücresinde CBG'nin Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

4.2.1. CBG İle Muamele Edilen Normal ve Prostat Kanseri Hücresinde İmmün Boyama İle Apoptoz Yolağına Ait Proteinlerin Sentezinin Görüntülenmesi

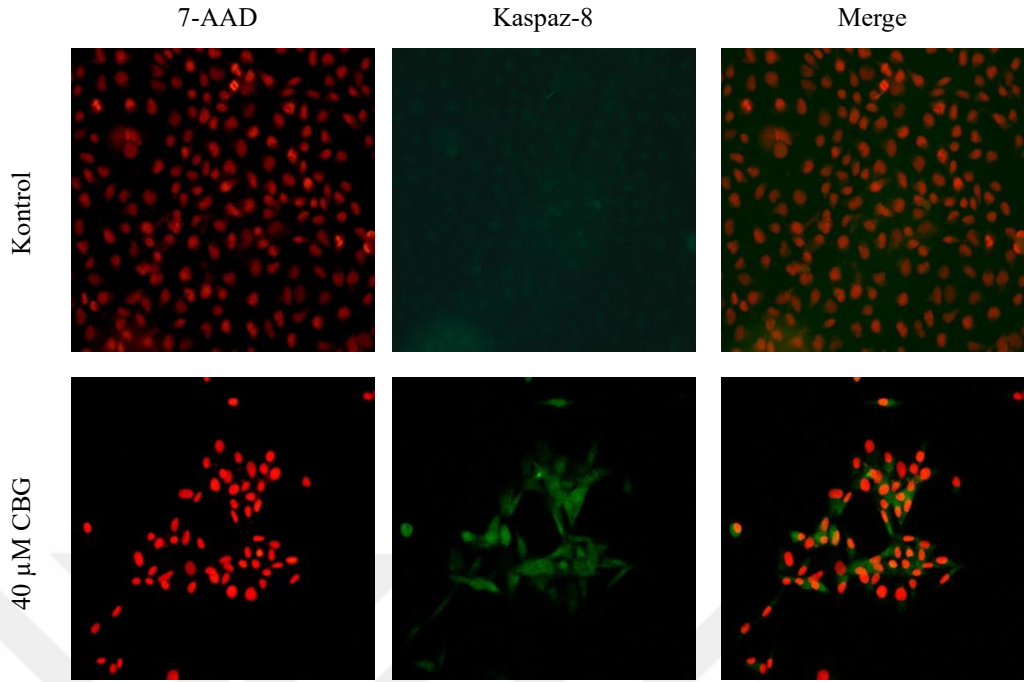
CBG'ye maruz kalmış PNT1A hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerinin immün boyama görüntüleri

Kaspaz-3



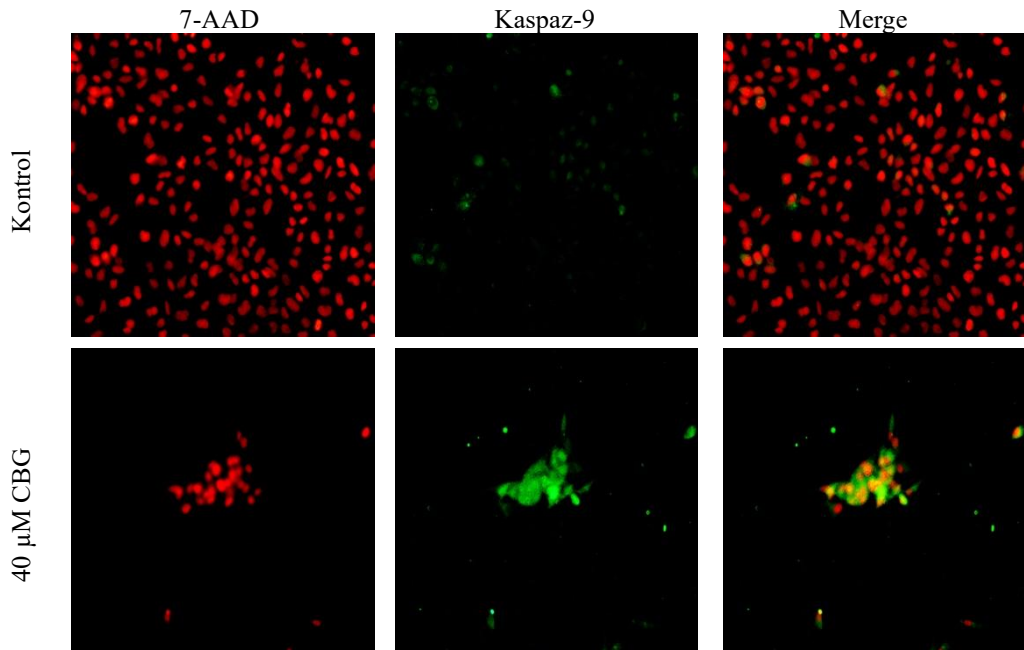
Şekil 4.10 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40μM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 proteininin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-3 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

Kaspaz-8

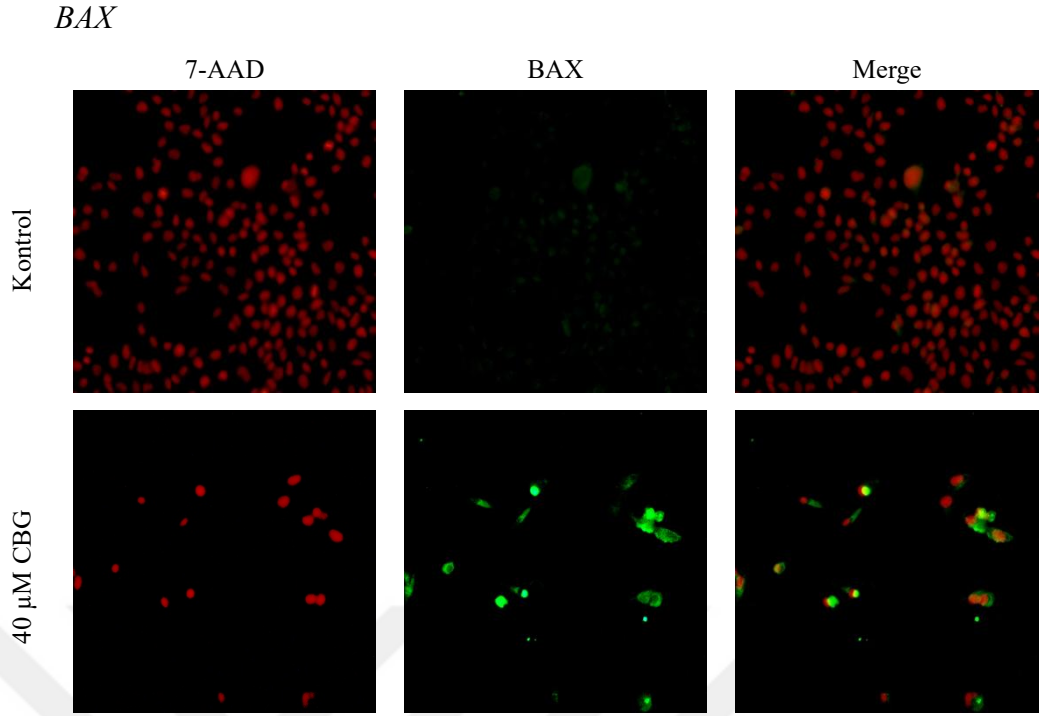


Şekil 4.11 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-8 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-8 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

Kaspaz-9



Şekil 4.12 PNT1A normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-9 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-9 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

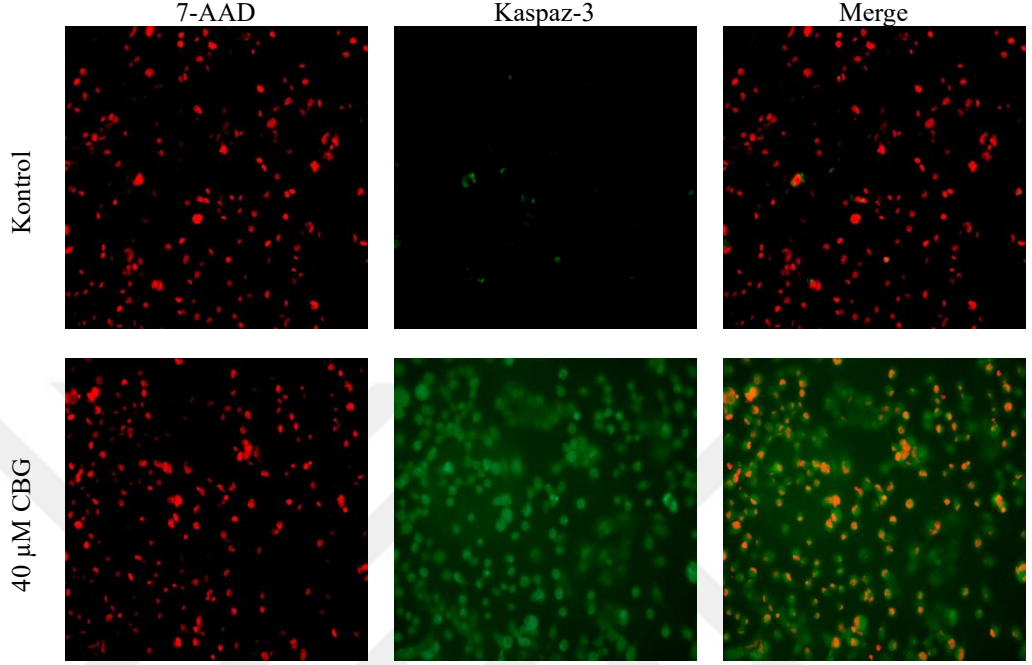


Şekil 4.13 *PNT1A* normal prostat hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra BAX proteininin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. BAX proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

PNT1A normal prostat hücreleri 72 saat boyunca 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra immün boyama metodu ile kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinleri görüntülenmiştir. Bu kapsamda, çekirdekler 7-AAD ile, proteinler ise FITC işaretli sekonder aracılığı ile işaretlenmiştir. Elde edilen fluoresan görüntülerde, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerin sentezini gösteren immünopozitiflikte, CBG muamelesi sonrasında, prostat kanser hücrelerinde elde edilen immünopozitifliğe göre daha düşük bir artış görülmektedir.

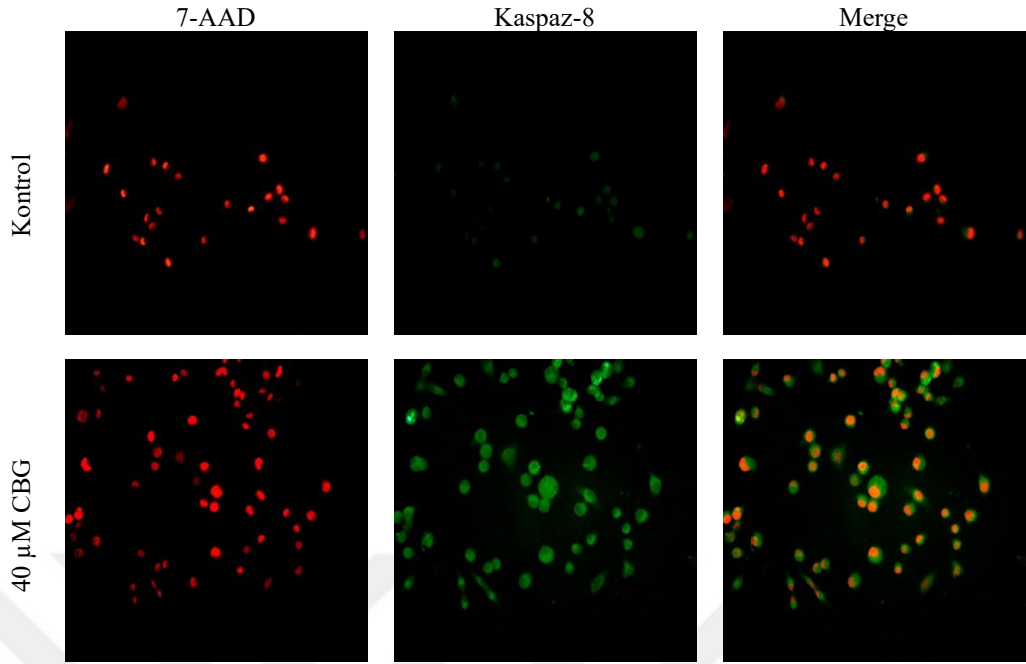
CBG'ye maruz kalmış DU145 prostat kanser hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerinin immün boyama görüntüleri

Kaspaz-3



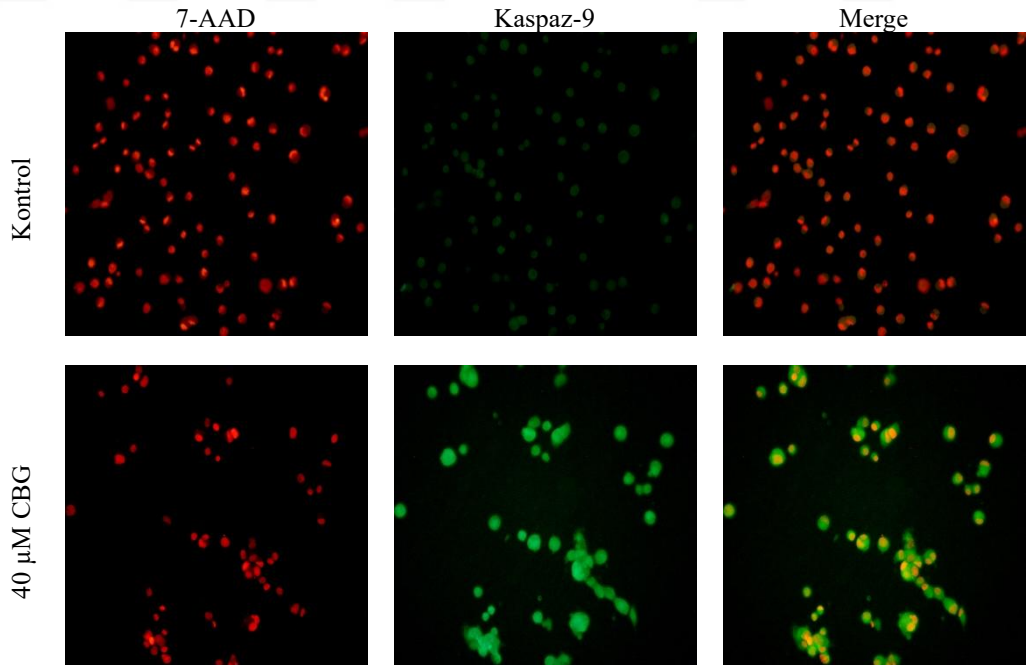
Şekil 4.14 *DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40µM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 proteininin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-3 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.*

Kaspaz-8

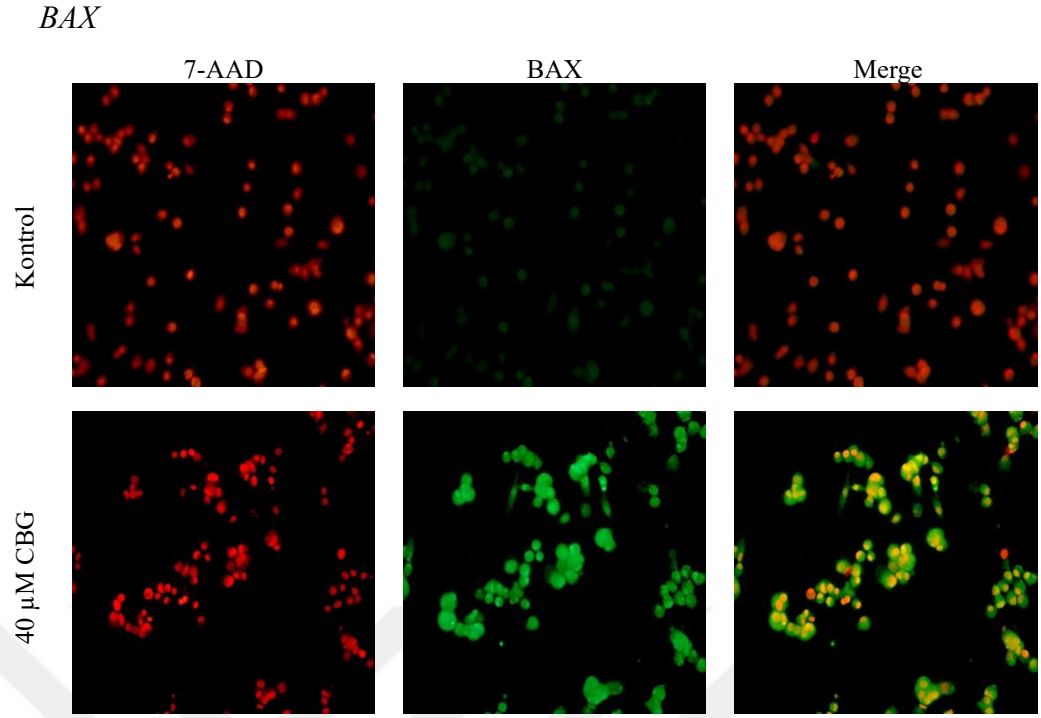


Şekil 4.15 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40µM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-8 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-8 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

Kaspaz-9



Şekil 4.16 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40µM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-9 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-9 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

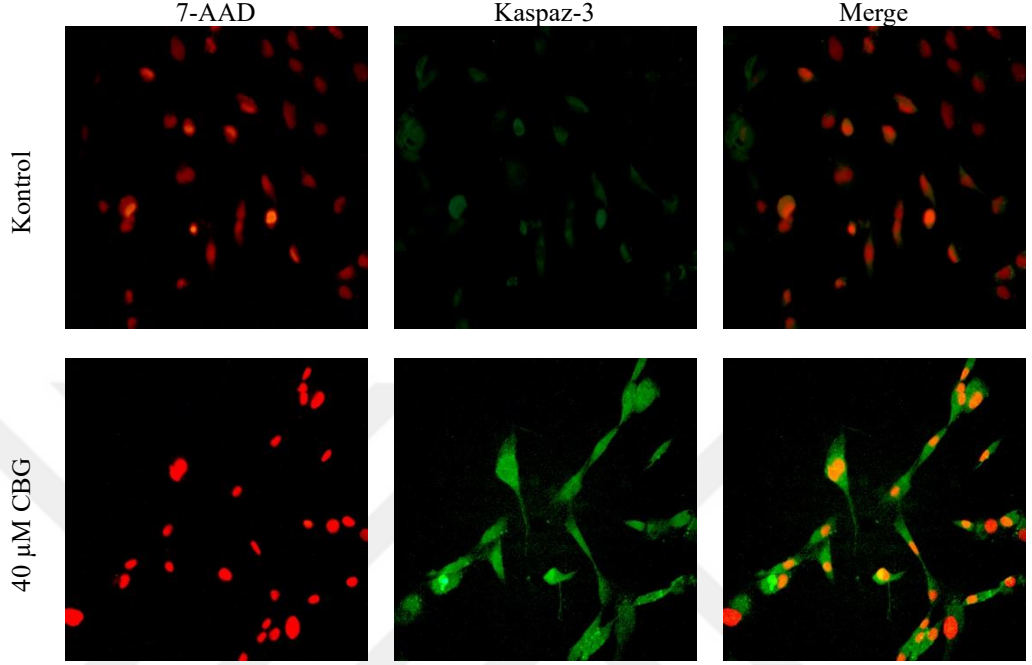


Şekil 4.17 DU145 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra BAX proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. BAX proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

DU145 prostat kanser hücreleri 72 saat boyunca 40 μ M CBG ile muamele edildikten sonra immün boyama metodu ile kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinleri görüntülenmiştir. Bu kapsamda, hücre çekirdekleri 7-AAD ile, proteinler ise FITC işaretli sekonder aracılığı ile işaretlenmiştir. Elde edilen floresan görüntülerde, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerin sentezini gösteren immünopozitiflikte, CBG muamelesi sonrasında anlamlı bir artış görülmektedir.

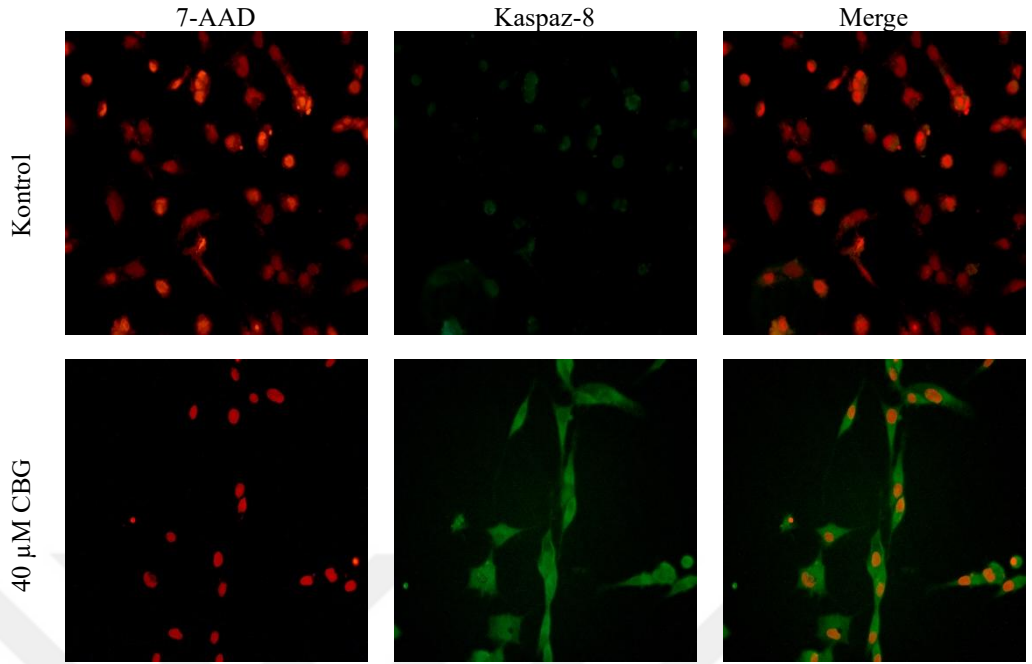
CBG'ye maruz kalmış PC3 prostat kanser hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerinin immün boyama görüntüleri

Kaspaz-3



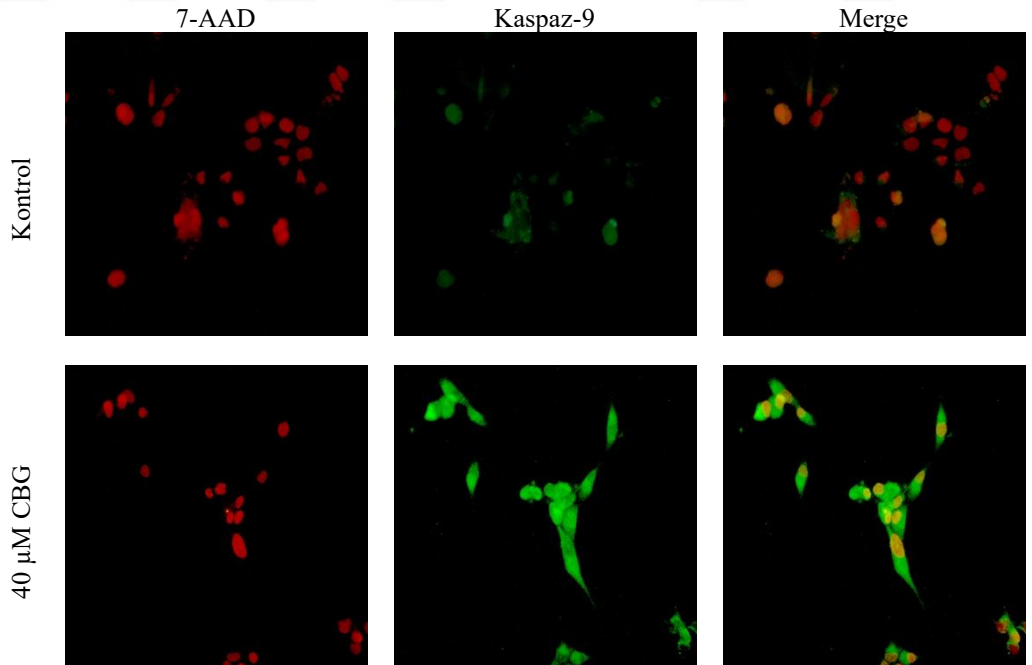
Şekil 4.18 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40μM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-3 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

Kaspaz-8



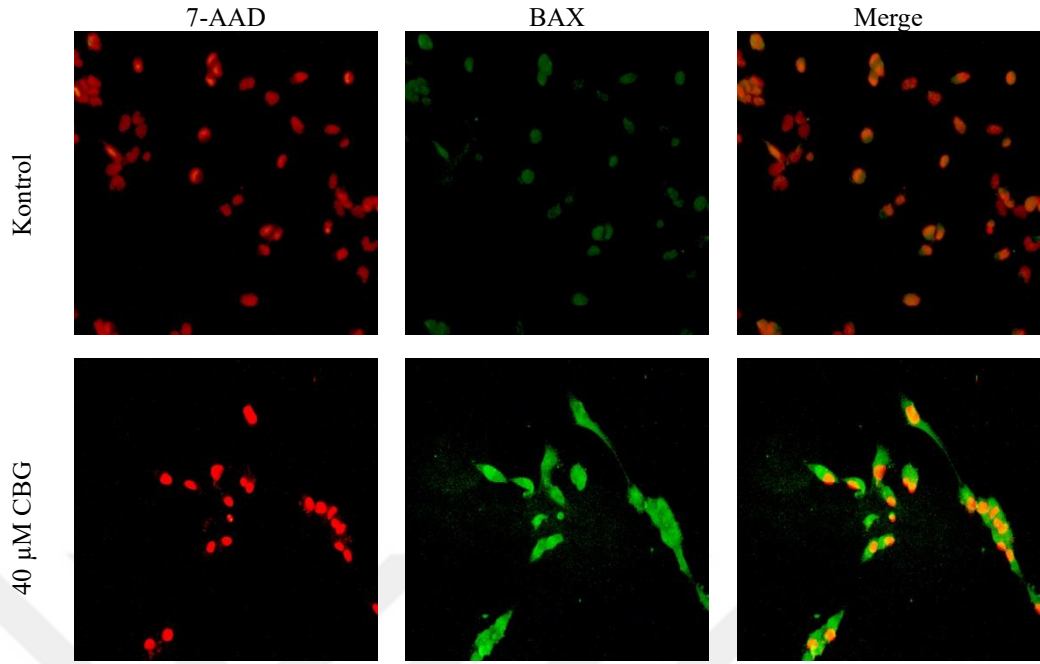
Şekil 4.19 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40µM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-8 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-8 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

Kaspaz-9



Şekil 4.20 PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40µM CBG ile muamele edildikten sonra kaspaz-9 proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. Kaspaz-9 proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

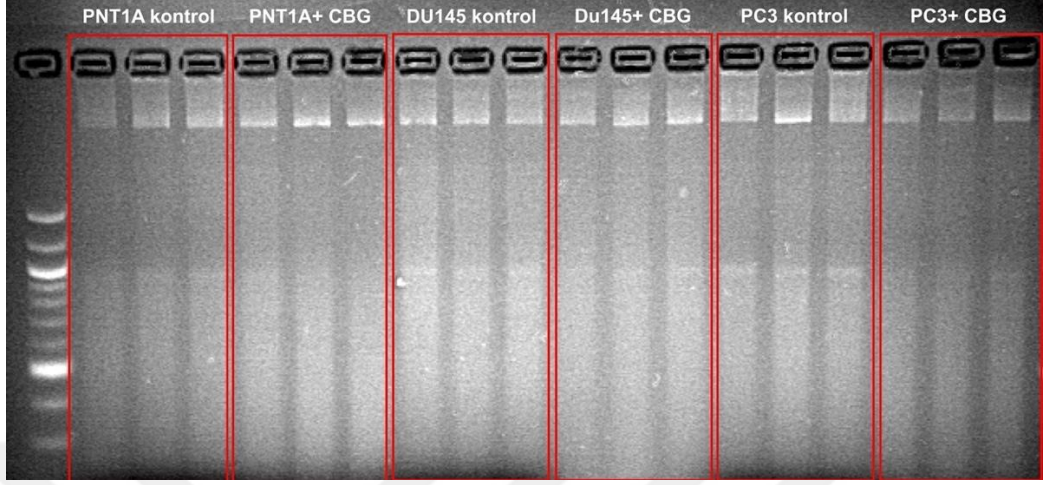
BAX



Şekil 4.21. PC3 prostat kanser hücreleri, 72 saat 40μM CBG ile muamele edildikten sonra BAX proteinin immün boyama ile görüntülenmesi. Kontrol olarak etanol kullanılmıştır. Çekirdek boyası olarak 7-AAD kullanılmıştır. BAX proteinini görüntülemek için FITC işaretli sekonder antikor kullanılmıştır.

PC3 prostat kanser hücreleri 72 saat boyunca 40μM CBG ile muamele edildikten sonra immün boyama metodu ile kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinleri görüntülenmiştir. Bu kapsamda, hücre çekirdekleri 7-AAD ile, proteinler ise FITC işaretli sekonder aracılığı ile işaretlenmiştir. Elde edilen flüoresan görüntülerde, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerin sentezini gösteren immünopozitiflikte, CBG muamelesi sonrasında anlamlı bir artış görülmektedir.

4.2.2.CBG İle Muamele Edilen Normal ve Prostat Kanseri Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Jel Üzerinde Görüntülenmesi



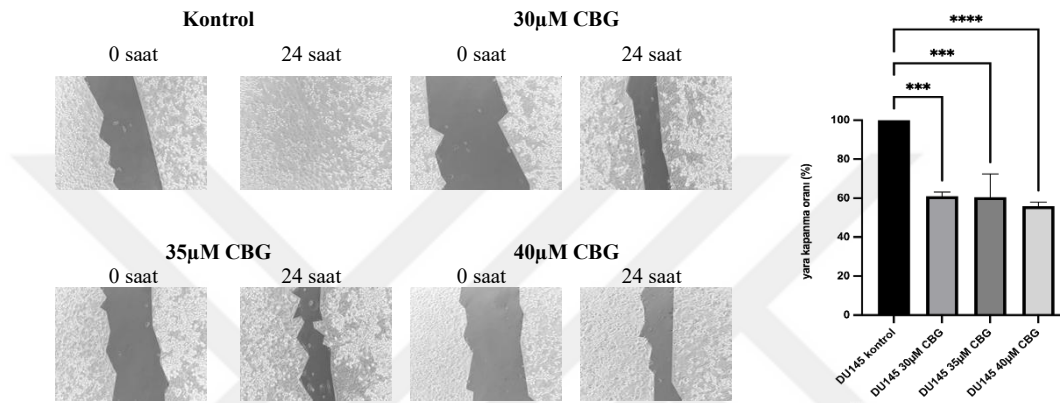
Şekil 4.22 DNA fragmentasyonunun agaroz jel görüntüsü. Normal (PNT1A) ve prostat kanser hücreleri (DU145 ve PC3) 72 saat 40 μ M CBG veya etanol maruz bırakılmıştır. Hücreler toplanıp DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. İlk kuyucuğa DNA Ladder yüklenmiştir.

PNT1A, DU145 ve PC3 hücrelerinde DNA fragmentasyon seviyesini kontrol etmek için hücreler 72 saat 40 μ M CBG veya kontrol olarak etanol içeren medyada hücreler kültür edilmiştir. Hücrelerden, DNA izolasyon yapıldıktan sonra agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Fragmente olmayan DNA, jel üzerinde daha yukarıda kalırken, fragmentasyona uğramış küçük DNA'lar jelde daha uzun yürüyebilmektedir. Her koşul, 3 kere tekrarlanmıştır. PNT1A, DU145 ve PC3 hücrelerinde kontrole kıyasla 40 μ M CBG uygulanması sonrasında yukarıda olan büyük bantın (yükleme kuyucuğuna en yakın) azaldığı görülmektedir.

4.3. CBG'nin Prostat Kanseri Hücrelerinde Metastaz Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

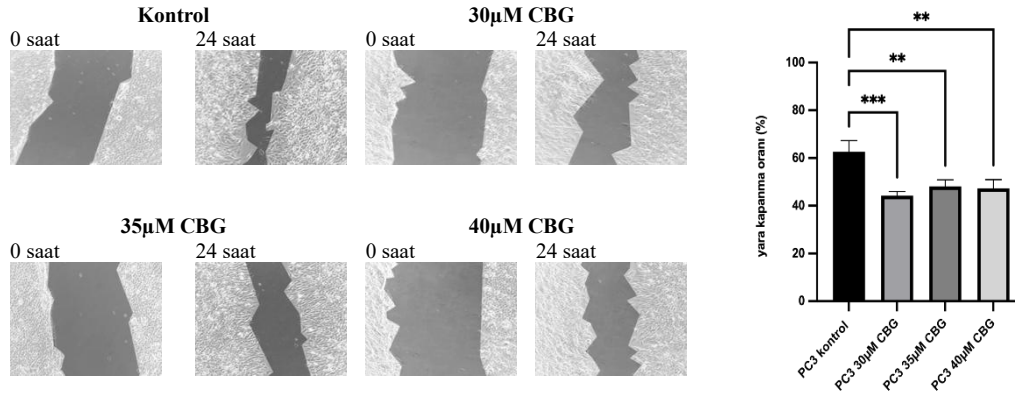
4.3.1. CBG'nin Prostat Kanseri Hücrelerinde Metastaz Üzerindeki Etkisinin İki Boyutlu Migrasyon Testi İle Tespiti

CBG'ye maruz kalmış DU145 prostat kanseri hücrelerinde migrasyon oranının tespiti



Şekil 4.23 DU145 prostat kanseri hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda CBG'ye maruz kalması sonrasında migrasyon oranının yara iyileşme testi ile gösterilmesi. Sol kısımda, farklı dozlarda CBG'ye veya kontrol olarak etanole maruz kalan DU145 hücrelerinde yapay olarak yara oluşturulmuş ve 0 ile 24 saatlerde DIC görüntüleri alınmıştır. T-scratch programı analizi ile oluşturululan yaranın alanı hesaplanmıştır. Sağ kısımda gösterildiği üzere, elde edilen veriler Graphpad Prism 9 programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Anlamlılık: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Anlamlı olmayan (ns) farklar grafikte gösterilmemiştir.

CBG'ye maruz kalmış PC3 prostat kanser hücrelerinde yara kapanma oranının tespiti

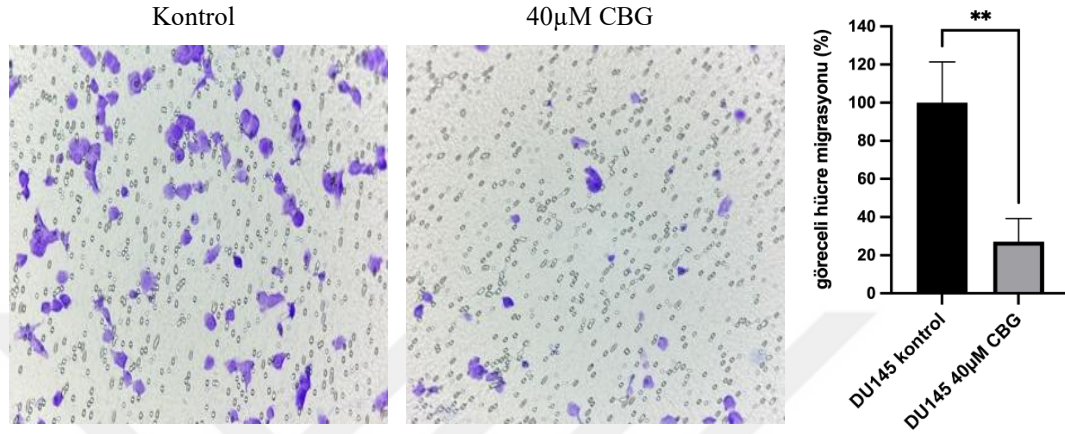


Şekil 4.24 PC3 prostat kanser hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda CBG'ye maruz kalması sonrasında migrasyon oranının yara iyileşme testi ile gösterilmesi. Sol kısımda, farklı dozlarda CBG'ye veya kontrol olarak etanole maruz kalan DU145 hücrelerinde yapay olarak yara oluşturulmuştur ve 0 ile 24 saatlerde DIC görüntüleri alınmıştır. T-scratch programı analizi ile oluşturululan yaranın alanı hesaplanmıştır. Sağ kısımda gösterildiği üzere elde edilen veriler Graphpad Prism 9 programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Anlamlılık: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Anlamlı olmayan (ns) farklar grafikte gösterilmemiştir.

CBG'nin, DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerine olan etkisini araştırmak üzere iki boyutlu migrasyon (yara iyileşme) testi yapılmıştır. Plakaya ekilen hücreler konfluent olunca, yapay bir yara oluşturulmuş ve hücreler farklı CBG konsantrasyonları veya etanol olan medyalarda 24 saat içerisinde kültür edilmiştir. Elde edilen görüntülerin analizi sonucunda, 30, 35 ve 40 μ M konsantrasyonlarda kontrole kıyasla CBG'nin DU145 prostat kanser hücrelerinde yara kapatma oranına anlamlı seviyede azalttığı görülmektedir. Yara kapanma oranının 30, 35 ve 40 μ M CBG için kontrole kıyasla %50 daha az kapandığı görülmektedir. Buna ek olarak farklı konsantrasyonlar arasında, yara kapanma oranında anlamlı bir fark görülmemektedir. Diğer yandan, PC3 prostat kanser hücreleri için 30, 35 ve 40 μ M CBG'nin kontrole kıyasla kapanma oranının anlamlı seviyede düşürdüğü görülmektedir. Kontrolde kapanma oranı %60'lardayken farklı konsantrasyonlarda CBG'de kapanma oranı %40'lara düşmektedir. Buna ek olarak farklı konsantrasyonlar arasında, yara kapanma oranında anlamlı bir fark görülmemektedir.

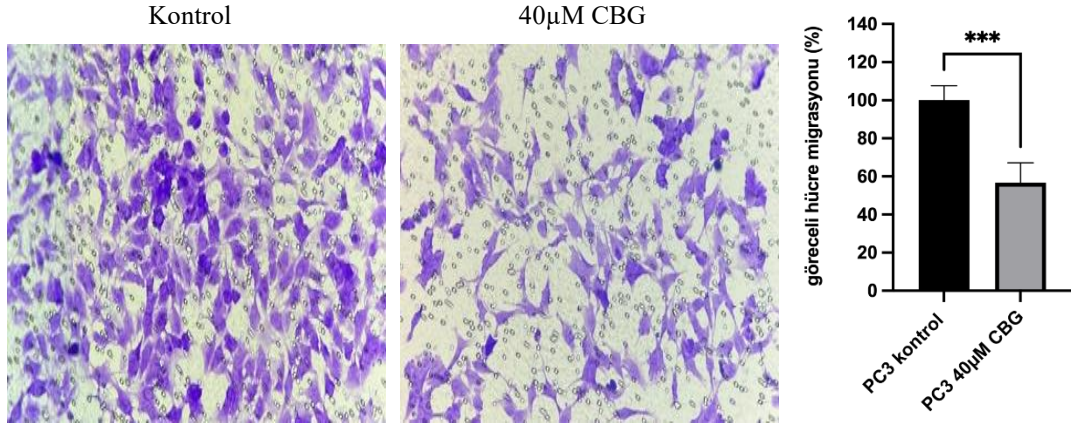
4.3.2. CBG'nin, Prostat Kanseri Hücrelerinde Metastaz Üzerindeki Etkisinin Üç Boyutlu Migrasyon Testi İle Tespiti

CBG'ye maruz kalmış DU145 prostat kanser hücrelerinde kuyucuk arası geçişin belirlenmesi



Şekil 4.25 DU145 prostat kanser hücrelerinin 40µM CBG'ye maruz kalması sonrasında kuyucuk arası migrasyon oranının kuyucuk arası (transwell) testi ile gösterilmesi. Sol kısımda, 40µM CBG'ye veya kontrol olarak etanole maruz kalan DU145 hücreleri, kuyucuk üzerine yerleştirilen inserte FBS olmayan medya ile ekilmiştir. Hücrelerin altındaki kuyucuğa ise, FBS içeren medya eklenmiştir ve 24 saat boyunca hücreler kültür edilmiştir. Insertin alt kısmına geçen hücreler, crystal violet boyası (mor) boyası ile boyanmış ve DIC mikroskop ile görüntülenmiştir. Sağ kısımda, geçen hücre sayısı belirlendikten sonra veriler Graphpad Prism 9 programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Anlamlılık: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Anlamlı olmayan (ns) farklar grafikte gösterilmemiştir.

CBG'ye maruz kalmış PC3 prostat kanser hücrelerinde kuyucuk arası geçişin belirlenmesi



Şekil 4.26 PC3 prostat kanser hücrelerinin 40µM CBG'ye maruz kalması sonrasında kuyucuk arası migrasyon oranının kuyucuk arası (transwell) testi ile gösterilmesi. Sol kısımda, 40µM CBG'ye veya kontrol olarak etanole maruz kalan PC3 hücreleri, kuyucuk üzerine yerleştirilen inserte FBS olmayan medya ile ekilmiştir. Hücrelerin altındaki kuyucuğa ise, FBS içeren medya eklenmiştir ve 24 saat boyunca hücreler kültür edilmiştir. İnsertin alt kısmına geçen hücreler, crystal violet boyası (mor) boyası ile boyanmış ve DIC mikroskop ile görüntülenmiştir. Sağ kısımda, geçen hücre sayısı belirlendikten sonra veriler Graphpad Prism 9 programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Anlamlılık: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Anlamlı olmayan (ns) farklar grafikte gösterilmemiştir.

CBG'nin, DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerine olan etkisini araştırmak üzere üç boyutlu migrasyon (transwell migrasyon) testi yapılmıştır. Kuyucuk üzerinde bulunan inserte ekilen hücreler 40 µM CBG veya etanol içeren ve FBS içermeyen medyada ekilmiştir. Alt kısma ise %10 FBS içeren medya eklenmiştir. Hücreler 24 saat boyunca kültür edilmiş ve sonrasında, insertin alt kısmına geçen hücrelerin oranının belirlenmesi için, fikse edilen hücreler crystal violet (mor) boyası ile boyanmıştır. Elde edilen görüntülerdeki hücreler sayılmış ve kontrole kıyasla 40 µM CBG'ye maruz kalan DU145 hücrelerinin insertin alt kısmına geçme oranı anlamlı seviyede daha düşük olduğu görülmüştür. PC3 hücrelerine bakıldığında ise, kontrole kıyasla 40µM CBG ile muamele edilen hücrelerin anlamlı seviyede insertin alt kısmına daha az geçtiği görülmektedir. Buna ek olarak, elde edilen görüntülerde PC3 hücrelerinin migrasyon kapasitesinin DU145 hücrelerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ikinci kanser tipi olmakla birlikte ölümcül bir kanser türüdür. Prostat kanserinde sıkça kullanılan kemoterapi, radyoterapi veya ADT gibi tedavilere karşı dirençli olan kanserlerle başa çıkmak için, yeni tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir (Fang vd., 2024). Geleneksel tıpta uygulanan kadim bilgilerin bu kapsamda kullanılması, Dünya Sağlık Örgütü tarafından desteklenmektedir (Okaiyeto & Oguntibeju, 2021). Bu doğrultuda, uzun yıllardır farklı sağlık sorunlarını tedavi etmekte kullanılan kenevirin, prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilmesi için bilimsel araştırmalar yapılmaktadır. Kenevir bitkisi farklı aktif moleküller içermektedir ve bu moleküllerden en çok öne çıkanları ise kannabinoidlerdir. Bu kategoriye, psikoaktif etkiye sahip THC, farklı hastalıklar üzerinde etkisi kanıtlanmış CBD ve bu tez çalışması kapsamında araştırılan CBG gibi moleküller dahildir (Jastrzab vd., 2022). Son yıllarda, CBG'nin farklı hastalıklar üzerindeki etkisinin araştırılması üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu kapsamda, CBG'nin anti-kanser etkisi farklı araştırmaya konu olmasına rağmen, prostat kanseri üzerindeki etkisini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, CBG'nin metastatik insan prostat kanser hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Hipotezimiz, "CBG, insan prostat kanser hücreleri üzerinde anti-kanser etkiye sahiptir" olarak belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında hipotezimizi test etmek için farklı deneyler planlanmıştır. İlk olarak, deneylerimizde üç farklı insan hücre hattı kullanılmıştır. İleri seviye metastatik ve agresif olan PC3 insan prostat kanser hücre hattı ile, daha az metastatik karaktere sahip DU145 insan prostat kanser hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmamızda, iki farklı metastatik seviyede hücre hattı kullanarak, klinik çalışmaları için daha yakın sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca hipotezimizin sonucunu güçlendirmesi için, çalışmamızın kontrol grubu olan PNT1A normal prostat hücre hattı araştırma planımıza dahil edilmiştir. CBG'nin herhangi bir anti-kanser ilaç adayı gibi kanser hücrelerine karşı seçici öldürücü etkiye sahip olması, istenilen en ideal durumdur. Bu doğrultuda, CBG'nin normal prostat hücreleri üzerindeki etkisinin araştırılması, çalışmamıza değer katmaktadır. Buna ek olarak, araştırmamızda prostat kanser tedavisinde kullanılan DCX, pozitif kontrol olarak deney gruplarımıza dahil edilmiştir. Bu şekilde araştırmamızdan elde edilen veriler, rutinde kullanılan bir ilacın etkisinin, CBG'nin etkisi ile kıyaslanmasını mümkün kılmıştır.

Literatüre bakıldığında CBG'nin, DU145 ve PC3 hücreleri için farklı IC_{50} değerleri olduğundan, ilk olarak optimum doz belirlenmiştir. Bu kapsamda, çalışmamızda WST-8 sitotoksosite testi yapılmıştır. Bu test, CBG'nin dozaja ve zamana bağlı etkisini göstermek için, 24, 48 ve 72 saatlerde gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite testinde elde edilen sonuçlar CBG'nin, normal prostat hücrelerine kıyasla prostat kanser hücrelerine daha düşük IC_{50} 'lerde etki ettiğini göstermiştir. Buna ek olarak, literatürde IC_{50} 'si 4 nM olarak belirtilen DCX'in ve CBG'nin, normal prostat ve prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi kıyaslanmıştır (Yang vd., 2019). Araştırmamızdan elde edilen verilere göre, CBG'nin normal prostat hücrelerinde IC_{50} 'sinin en düşük 40 μ M olduğu belirlenmiştir. CBG bu dozda kullanıldığında, normal hücrelerde DCX'e göre daha az sitotoksik etki (yan etki) oluşturduğu ortaya konulmuştur (Şekil 4.1-4.3).

Diğer yandan, elde ettiğimiz verilere göre DCX'e kıyasla CBG'nin, ileri seviye metastatik PC3 prostat kanser hücrelerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. DU145 prostat kanser hücrelerinde ise DCX'in sitotoksitesi CBG'ye göre anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir. Ancak, DCX'in daha etkili olmasının istatistiksel farklılığı çok küçüktür (Şekil 4.4-4.9)

CBG'nin sitotoksitesiyle ilgili elde ettiğimiz verilerin, Ligresti ve ark. tarafından 2006'da yapılan çalışma ile aynı doğrultuda olduğu görülmektedir (Ligresti vd., 2006). Bu grup, crystal violet boyama metodunu kullanarak CBG'nin, IC_{50} 'sinin DU145 hücrelerinde 21,3 μ M olarak hesaplamıştır. Tez çalışmamız kapsamında ise, IC_{50} belirlemek için daha hassas bir yöntem olan WST-8 testi kullanılmış olup IC_{50} 'si 30,58 μ M olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Ligresti ve ark. tarafından verilen IC_{50} değeri 96 saatte elde edilmiştir. Çalışmamızda ise en fazla 72 saatte ölçüm yapılmıştır.

Petrocellis ve ark. tarafından yapılan çalışmada, CBG'nin DU145 ve PC3 hücrelerinde ve 72 saatte IC_{50} 'lerinin 25 μ M'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir. Fakat, 25 μ M üzerinde CBG konsantrasyonları denenmediği için, net bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır (De Petrocellis vd., 2013). Çalışmamızda da DU145 ve PC3 için elde edilen IC_{50} değerleri 25 μ M'ın üzerinde olduğu için bu grubun sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Literatürde bulunan verilere göre, CBG'nin diğer kanser tiplerinde IC_{50} değerlerinin 8 ile 287 μ M arasında değiştiği görülmektedir. Bu kapsamda çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların da bu aralıkta olduğu görülmektedir.

Sitotoksosite deneylerimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre, CBG'nin optimum dozu 40 µM olarak belirlenmiştir. Bu dozun optimum doz olarak seçilmesinde, normal prostat hücrelerinde DCX'ten daha az sitotoksik olması ve prostat kanser hücre hatları üzerinde maksimum sitotoksositeye sahip olması göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca elde ettiğimiz verilere göre CBG'nin 35 µM olarak kullanıldığında normal prostat hücreleri üzerinde anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda, gelecekte yapılacak çalışmaların amacı, CBG'nin en asgari sitotoksositeye sahip olması olarak planlanırsa, 35µM optimum doz olarak önerilmektedir.

İkinci aşamada, sitotoksosite deneyinde gözlemlediğimiz sitotoksik etkinin apoptoz kaynaklı olup olmadığını ortaya koymak için, iki farklı deney yapılmıştır. İlk olarak immün boyama metodu ile, içsel ve dışsal apoptoz yollarında rol oynayan kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinleri görüntülenmiştir (Şekil 4.10-4.21). Devamında ise, apoptozun son evresinde fragmente olan DNA'yı göstermek için, DNA fragmentasyon testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.22). Kaspazların sentezi ve aktivitesi, apoptoz başladığı andan itibaren artmaktadır. DNA fragmentasyonu ise, apoptozun en son aşamasında gerçekleşerek, hücre ve hücrenin DNA'sı kontrollü bir şekilde elimine edilmektedir (Zhang & Xu, 2000). CBG'nin kontrollü ve programlanmış bir hücre ölümünü aktive etmesi ve apoptozu tetiklemesi, *in vivo* kullanım için önem arz etmektedir. İmmün boyama deneyimizde, içsel apoptoz yolağında rol oynayan kaspazlar (kaspaz-3 ve kaspaz-8) ve dışsal apoptoz yolağında rol oynayan proteinler (kaspaz-3, kaspaz-9 ve BAX) görüntülenmiştir. Floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, kontrole kıyasla 40 µM CBG verilen DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerinin sentezinde bir artış görülmektedir. Diğer yandan, PNT1A normal prostat hücrelerinde bu proteinlerin sentezinde bir artış görülse de, bu artış kanser hücrelerindeki artış ile kıyaslanamayacak kadar düşük seviyededir. Buna ek olarak, gözlemlenen artış, sitotoksosite verileri ile uyumluluk göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, literatürdeki veriler ile benzerlik göstermektedir. Ligresti ve ark. meme kanserinde, Borrelli ve ark. kolorektal kanserde, Lah ve ark. glioblastomada, Viereckl ve ark. safra yolu kanserinde, Sooda ve ark. over karsinomada, Zeppa ve ark. ise pankreas kanserinde kaspaz-3'ün, CBG ile maruziyeti sonrasında arttığını göstermiştir (Borrelli vd., 2014; Lah vd., 2021; Ligresti vd., 2006; Sooda vd., 2023; Viereckl vd., 2022; Zeppa vd., 2024). Ayrıca kaspaz-3 artışını

göstermek için, literatürde farklı metotlar kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda, ELISA veya Western blot metodu kullanılırken, bazı çalışmalarda da çalışmamıza benzer şekilde immün boyama metodu ile protein sentezinin artışı tespit edilmiştir.

Literatürde, CBG ile muamele edilen safra yolu kanser hücrelerinin, BAX protein seviyesinde de bir artış olduğu gösterilmiştir. Viereckl ve ark. immün boyama deneylerinde BAX protein seviyesinde bir artış gözlemlemişlerdir (Viereckl vd., 2022). Bununla birlikte Western Blot deneylerinde bu artışın anlamlı seviyede olduğunu gösterememekle birlikte, bir artış eğilimi olduğunu belirtmektedirler. Diğer yandan, Yüksel ve ark. kolorektal kanser hücrelerinin CBG ile maruziyeti sonrasında, kaspaz-7 ve kaspaz-8 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış tespit etmemelerine rağmen, BAX ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir (Yüksel vd., 2023). Ancak, bu çalışmada protein seviyesinde bir analiz yapılmamıştır.

Petrocellis ve ark. DU145 ve PC3 insan prostat kanser hücrelerinde sadece kaspaz-3 artışını ortaya koyarken, Mahmoud ve ark. ise insan yerine fare prostat kanser hücrelerinde bu artışı göstermişlerdir (De Petrocellis vd., 2013; Mahmoud vd., 2023)

Çalışmamızda, CBG'nin apoptozu tetiklediğini göstermek için gerçekleştirdiğimiz bir diğer deney ise, DNA fragmentasyonudur. Elde edilen veriler CBG'nin, prostat kanser hücrelerinde DNA fragmentasyon seviyesini arttırdığı yönündedir. Literatüre bakıldığında, Borrelli ve ark.'nın çalışmasında da, kolorektal kanser hücrelerine CBG verildikten sonra DNA fragmentasyonu testi yapılmış ve elde ettiğimiz sonuçlara yakın veriler elde edilmiştir (Borrelli vd., 2014). Buna ek olarak, Sooda ve ark. tarafından yapılan çalışmada da, over kanser hücrelerine CBG verildikten sonra, subG1 fazında olan hücrelerin arttığı gösterilmiştir. Bu artışın ise, DNA fragmentasyonuna işaret ettiği belirtilmiştir (Sooda vd., 2023)

Sonuç olarak bu tez çalışmasında CBG'nin, prostat kanser hücrelerinde içsel ve dışsal apoptoz yolaklarını tetikleyerek hücreleri ölüme götürdüğü gösterilmiştir.

Bu doğrultuda kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinleri ilk defa tez çalışmamızda birlikte ve insan prostat kanser hücrelerinde analiz edilmiştir. Böylece apoptoz yolları üzerinden, CBG'nin moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca, ilk defa kaspaz-8'nin analizi ile CBG'nin içsel apoptotik yoldan da kanser hücrelerini ölüme götürdüğü gösterilmiştir.

Çalışmamızın son kısmında CBG'nin, prostat kanser hücrelerinin metastaz mekanizmaları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda, literatürde sıklıkla

kullanılan iki boyutlu ve üç boyutlu migrasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23-4.26). Elde ettiğimiz sonuçlar, CBG'nin hem DU145 hem de PC3 prostat kanser hücrelerinin migrasyon kapasitesini azalttığı yönündedir. Bu sonuçlar, literatürdeki veriler ile benzerlik göstermektedir. Viereckl ve ark., safra yolu kanser hücrelerinde yara iyileşme testi (iki boyutlu migrasyon testi) ve transwell migrasyon testi (üç boyutlu migrasyon testi) gerçekleştirmişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda, CBG'nin hücre migrasyonunu yavaşlattığını ortaya konulmuştur (Viereckl vd., 2022). Aynı şekilde, Colvin ve ark.'nın yaptığı çalışmada, transwell migrasyon ve invazyon deneyinde CBG'ye maruz kalan mezotelyoma hücrelerinin, migrasyon ve invazyon kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, CBG'ye maruziyeti sonrası pro-metastatik gen ifade seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (Colvin vd., 2022).

Elde ettiğimiz bulguları literatürdeki veriler ile kıyasladığımızda CBG'nin, prostat kanserinde de diğer kanserlerde oluşturduğu etkilere benzer etkiler oluşturduğu görülmüştür. Bu çalışma kapsamında CBG'nin, DU145 ve PC3 prostat kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduğu ve bu hücreleri apoptoz aracılığı ile öldürdüğü gösterilmiştir. Diğer yandan CBG'nin, metastatik olan DU145 ve PC3 hücre hatlarının migrasyon kapasitesini de inhibe ettiği ortaya konulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kapsamında elde edilen sonuçlar:

- CBG'nin, DU145 ve PC3 metastatik insan prostat kanser hücre hatlarında sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir.
- Kanser hücrelerinde kullanılan CBG konsantrasyonunun, PNT1A normal prostat hücrelerinde DCX'e (kemoterapötik ajan) kıyasla daha az öldürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.
- CBG'nin sitotoksik etkisinin, prostat kanser hücrelerinde potansiyel olarak apoptozu aktive etmesinden kaynaklandığı ortaya konulmuştur.
- CBG, prostat kanser hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve BAX proteinlerinin sentezinde artışa sebep olmasıyla hem içsel hem de dışsal yollar üzerinden apoptozu aktive ettiği düşünülmektedir.
- İlk defa çalışmamızda, CBG'nin kanser hücrelerinde kaspaz-8'in artışını ve bu artışın da içsel apoptoz yolağını aktive ettiği ortaya konulmuştur.
- CBG'nin, prostat kanser hücrelerinde apoptozun son aşaması olan DNA fragmentasyonunu da artırdığı gösterilmiştir.
- CBG'nin prostat kanser hücrelerinin migrasyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir. Bu nedenle, potansiyel olarak metastaz mekanizmasını da yavaşlatabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz verilere göre, CBG'nin, metastatik prostat kanserinde önemli bir ilaç adayı olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının devamında:

- CBG'nin moleküler düzeydeki etkisini ortaya çıkarmak için, qRT-PCR ile metastazda rol oynayan E-kaderin, N-kaderin, vimentin veya MMP gibi genlerin ifadesi ölçülebilir.

- CBG'nin sitotoksik etkisinin yanı sıra sitostatik etkisi araştırılabilir. Bu kapsamda, CBG muamelesi sonrasında, akış sitometrisi ile hücre döngüsünün yavaşlaması kontrol edilebilir.
- CBG'nin farklı kannabinoidler veya kemoterapötik ilaçlar ile kombine kullanımı araştırılabilir.
- Fare veya sıçanda gerçekleştirilecek *in vivo* deneyler, CBG'nin etki mekanizmasını daha kapsamlı bir şekilde anlamamızı ve faz çalışmalarını geçmemizi sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *The Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279-288. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>
- Akhtar, M., Haider, A., Rashid, S., & Al-Nabet, A. D. M. H. (2019). Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Advances in Anatomic Pathology*, 26(1), 69. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000219>
- Alamoudi, A. A., Alnoury, A., & Gad, H. (2018). miRNA in tumour metabolism and why could it be the preferred pathway for energy reprogramming. *Briefings in Functional Genomics*, 17(3), 157-169. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elx023>
- Al-Mehdi, A. B., Tozawa, K., Fisher, A. B., Shientag, L., Lee, A., & Muschel, R. J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: A new model for metastasis. *Nature Medicine*, 6(1), 100-102. <https://doi.org/10.1038/71429>
- Andriotis, E. G., Chachlioutaki, K., Monou, P. K., Bouropoulos, N., Tzetzis, D., Barmaplexis, P., Chang, M.-W., Ahmad, Z., & Fatouros, D. G. (2021). Development of Water-Soluble Electrospun Fibers for the Oral Delivery of Cannabinoids. *AAPS PharmSciTech*, 22(1), 23. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01895-7>
- Angelina, A., Pérez-Diego, M., López-Abente, J., & Palomares, O. (2020). The Role of Cannabinoids in Allergic Diseases: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2020. *International Archives of Allergy and Immunology*, 181(8), 565-584. <https://doi.org/10.1159/000508989>
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., & Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: A structure-activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427-1430. <https://doi.org/10.1021/np8002673>
- Aqawi, M., Gallily, R., Sionov, R. V., Zaks, B., Friedman, M., & Steinberg, D. (2020). Cannabigerol Prevents Quorum Sensing and Biofilm Formation of Vibrio harveyi. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.00858>
- Aqawi, M., Sionov, R. V., Gallily, R., Friedman, M., & Steinberg, D. (2021). Anti-Bacterial Properties of Cannabigerol Toward Streptococcus mutans. *Frontiers in Microbiology*, 12, 656471. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656471>

- Archer Goode, E., Wang, N., & Munkley, J. (2023). Prostate cancer bone metastases biology and clinical management (Review). *Oncology Letters*, 25(4), 163. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13749>
- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: Different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(6), 241-254. <https://doi.org/10.1177/2045125312457586>
- Aurilio, G., Cimadamore, A., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Verri, E., Scarpelli, M., Massari, F., Cheng, L., Santoni, M., & Montironi, R. (2020). Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*, 9(12), 2653. <https://doi.org/10.3390/cells9122653>
- Avancès, C., Georget, V., Térouanne, B., Orio, F., Cussenot, O., Mottet, N., Costa, P., & Sultan, C. (2001). Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 184(1-2), 13-24. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00669-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00669-4)
- Baek, S. H., Kim, Y. O., Kwag, J. S., Choi, K. E., Jung, W. Y., & Han, D. S. (1998). Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 21(3), 353-356. <https://doi.org/10.1007/BF02975301>
- Baek, S.-H., Du Han, S., Yook, C. N., Kim, Y. C., & Kwak, J. S. (1996). Synthesis and antitumor activity of cannabigerol. *Archives of Pharmacal Research*, 19(3), 228-230. <https://doi.org/10.1007/BF02976895>
- Başer, U., & Bozoğlu, M. (2020). Türkiye'nin Kenevir Politikası ve Piyasasına Bir Bakış. *Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi*, 6(2), Article 2.
- Bernstein, N., Gorelick, J., & Koch, S. (2019). Interplay between chemistry and morphology in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 129, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.039>
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Blankman, J. L., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & Biology*, 14(12), 1347-1356. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>
- Borrelli, F., Fasolino, I., Romano, B., Capasso, R., Maiello, F., Coppola, D., Orlando, P., Battista, G., Pagano, E., Di Marzo, V., & Izzo, A. A. (2013). Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental

inflammatory bowel disease. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1306-1316. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.01.017>

Borrelli, F., Pagano, E., Romano, B., Panzera, S., Maiello, F., Coppola, D., De Petrocellis, L., Buono, L., Orlando, P., & Izzo, A. A. (2014). Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychotropic cannabinoid. *Carcinogenesis*, 35(12), 2787-2797. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu205>

Bradford, T. J., Tomlins, S. A., Wang, X., & Chinnaiyan, A. M. (2006). Molecular markers of prostate cancer. *Urologic Oncology*, 24(6), 538-551. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2006.07.004>

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142-1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>

Calapai, F., Cardia, L., Esposito, E., Ammendolia, I., Mondello, C., Lo Giudice, R., Gangemi, S., Calapai, G., & Mannucci, C. (2022). Pharmacological Aspects and Biological Effects of Cannabigerol and Its Synthetic Derivatives. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2022, 3336516. <https://doi.org/10.1155/2022/3336516>

Cancer today. (17 December 2022). <http://gco.iarc.fr/today/home>

Cao, C., Li, Y., Liu, H., Bai, G., Mayl, J., Lin, X., Sutherland, K., Nabar, N., & Cai, J. (2014). The potential therapeutic effects of THC on Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 42(3), 973-984. <https://doi.org/10.3233/JAD-140093>

Capik, O., Sanli, F., Kurt, A., Ceylan, O., Suer, I., Kaya, M., Ittmann, M., & Karatas, O. F. (2021). CASC11 promotes aggressiveness of prostate cancer cells through miR-145/IGF1R axis. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 24(3), 891-902. <https://doi.org/10.1038/s41391-021-00353-0>

Chen, Y.-H., Wu, C.-P., Lin, H.-L., Liaw, R.-B., Lai, Y.-Y., Wu, M.-C., Chen, L.-R., & Jason Tsai, P.-S. (2020). Tetrazolium Salt WST-8 as a Novel and Reliable Chromogenic Indicator for the Assessment of Boar Semen Quality. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 2293. <https://doi.org/10.3390/ani10122293>

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research: MCR*, 6(10), 1521-1533. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>

- Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S., & Gertsch, J. (2012). Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34660-34682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373241>
- Chinigo, G. (2022). *TRP channels functional role in prostate cancer angiogenesis and invasion* [These de doctorat, Université de Lille (2022-....)]. <https://www.theses.fr/2022ULILS103>
- Chung, S. C., Hammarsten, P., Josefsson, A., Stattin, P., Granfors, T., Egevad, L., Mancini, G., Lutz, B., Bergh, A., & Fowler, C. J. (2009). A high cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(1), 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.010>
- Colasanti, B. K., Craig, C. R., & Allara, R. D. (1984). Intraocular pressure, ocular toxicity and neurotoxicity after administration of cannabinol or cannabigerol. *Experimental Eye Research*, 39(3), 251-259. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(84\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0014-4835(84)90013-7)
- Colvin, E. K., Hudson, A. L., Anderson, L. L., Kumar, R. P., McGregor, I. S., Howell, V. M., & Arnold, J. C. (2022). An Examination of the Anti-Cancer Properties of Plant Cannabinoids in Preclinical Models of Mesothelioma. *Cancers*, 14(15), 3813. <https://doi.org/10.3390/cancers14153813>
- Corti, M., Lorenzetti, S., Ubaldi, A., Zilli, R., & Marcoccia, D. (2022). Endocrine Disruptors and Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1216. <https://doi.org/10.3390/ijms23031216>
- Costello, A. J. (2020). Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nature Reviews. Urology*, 17(3), 177-188. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-0287-y>
- Crawford, E. D., Higano, C. S., Shore, N. D., Hussain, M., & Petrylak, D. P. (2015). Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies. *The Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.06.106>
- Crocq, M.-A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223-228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq>
- Czifra, G., Varga, A., Nyeste, K., Marincsák, R., Tóth, B. I., Kovács, I., Kovács, L., & Bíró, T. (2009). Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(4), 507-514. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0482-3>

- Çalışkan, U. K., & Yildirim, S. (2020). Kenevir ve Sağlık Alanında Kullanımı. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), Article 1. <https://doi.org/10.33483/jfpau.559665>
- Dariš, B., Verboten, M. T., Knez, Ž., & Ferk, P. (2019). Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1), 14-23. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.3532>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Schiano Moriello, A., Iappelli, M., Verde, R., Stott, C. G., Cristino, L., Orlando, P., & Di Marzo, V. (2013). Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: Pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), 79-102. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02027.x>
- Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., Woodcock, H., Dorward, P., Pigliacampo, B., Close, S., Platt, B., & Riedel, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology*, 219(3), 859-873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>
- Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618>
- Deveaux, V. (2008). *Mise en évidence de deux nouvelles fonctions du système endocannabinoïde dans la physiopathologie de la stéatose hépatique: Propriétés stéatogènes du récepteur CB2 et profibrogéniques du récepteur CB1* [These de doctorat, Paris Est]. <https://www.theses.fr/2008PEST0039>
- di Giacomo, V., Chiavaroli, A., Recinella, L., Orlando, G., Cataldi, A., Rapino, M., Di Valerio, V., Ronci, M., Leone, S., Brunetti, L., Menghini, L., Zengin, G., Ak, G., Abdallah, H. H., & Ferrante, C. (2020). Antioxidant and Neuroprotective Effects Induced by Cannabidiol and Cannabigerol in Rat CTX-TNA2 Astrocytes and Isolated Cortexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3575. <https://doi.org/10.3390/ijms21103575>
- Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2010). Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 17(14), 1430-1449. <https://doi.org/10.2174/092986710790980078>
- Díaz-Laviada, I. (2011). The endocannabinoid system in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.130>
- Dochez-Arnault, J. (2022). *Impact de deux phytocannabinoïdes, le Delta-9-Tétrahydrocannabinol et le CBD, utilisés à des fins récréatives et*

thérapeutiques, sur la physiologie du testicule [Phdthesis, Université de Rennes]. <https://theses.hal.science/tel-04293702>

DU 145—HTB-81 | ATCC. 07 Kasim 2023. <https://www.atcc.org/products/htb-81>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 103, 1-36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1

Endsley, M. P., Thill, R., Choudhry, I., Williams, C. L., Kajdacsy-Balla, A., Campbell, W. B., & Nithipatikom, K. (2008). Expression and Function of Fatty Acid Amide Hydrolase in Prostate Cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 123(6), 1318-1326. <https://doi.org/10.1002/ijc.23674>

Fang, W., Du, J., Nie, M., & Wang, X. (2024). Recent advances in flavonoid compounds for the treatment of prostate cancer. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 653. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09567-6>

Feng, Q., & He, B. (2019). Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00858>

Filipiuc, L. E., Ababei, D. C., Alexa-Stratulat, T., Pricope, C. V., Bild, V., Stefanescu, R., Stanciu, G. D., & Tamba, B.-I. (2021). Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors? *Pharmaceutics*, 13(11), 1823. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111823>

Fong, P., Xue, W., Ngan, H. Y. S., Chiu, P., Chan, K. Y. K., Tsao, S. W., & Cheung, A. N. Y. (2006). Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: A cDNA array differential expression study. *Journal of Clinical Pathology*, 59(2), 179-183. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.028027>

Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 14(8), 777-783. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>

Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124(3), 511-515. <https://doi.org/10.1002/ijc.24064>

Fulda, S. (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 370835. <https://doi.org/10.1155/2010/370835>

Gabrielli, M., Battista, N., Riganti, L., Prada, I., Antonucci, F., Cantone, L., Matteoli, M., Maccarrone, M., & Verderio, C. (2015). Active endocannabinoids are

secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Reports*, 16(2), 213-220. <https://doi.org/10.15252/embr.201439668>

Ghovanloo, M.-R., Dib-Hajj, S. D., Goodchild, S. J., Ruben, P. C., & Waxman, S. G. (2022). Non-psychotropic phytocannabinoid interactions with voltage-gated sodium channels: An update on cannabidiol and cannabigerol. *Frontiers in Physiology*, 13, 1066455. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1066455>

Giacoppo, S., Gugliandolo, A., Trubiani, O., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2017). Cannabinoid CB2 receptors are involved in the protection of RAW264.7 macrophages against the oxidative stress: An in vitro study. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 61(1), 2749. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2749>

Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(6), 2129-2144. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>

Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

Green, D. R., & Kroemer, G. (2005). Pharmacological manipulation of cell death: Clinical applications in sight? *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2610-2617. <https://doi.org/10.1172/JCI26321>

Guzmán, M., Duarte, M. J., Blázquez, C., Ravina, J., Rosa, M. C., Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Velasco, G., & González-Feria, L. (2006). A pilot clinical study of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *British Journal of Cancer*, 95(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603236>

Han, D. S., Jung, K. H., Jung, W. Y., Oh, I. K., Kang, K. U., & Baek, S. H. (2000). Synthesis and cytotoxic effects of deoxy-tomentellin. *Archives of Pharmacal Research*, 23(2), 121-127. <https://doi.org/10.1007/BF02975500>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: A unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357-1392. <https://doi.org/10.1039/c6np00074f>
- Hartley, A., & Ahmad, I. (2023). The role of PPAR γ in prostate cancer development and progression. *British Journal of Cancer*, 128(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02096-8>
- Hoedemaeker, R. F., Vis, A. N., & Van Der Kwast, T. H. (2000). Staging prostate cancer. *Microscopy Research and Technique*, 51(5), 423-429. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001201\)51:5<423::AID-JEMT4>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001201)51:5<423::AID-JEMT4>3.0.CO;2-4)
- Howlett, A. C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 619-631. [https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00060-6](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00060-6)
- Howlett, A. C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 53-79. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_2
- Iannotti, F. A., & Vitale, R. M. (2021). The Endocannabinoid System and PPARs: Focus on Their Signalling Crosstalk, Action and Transcriptional Regulation. *Cells*, 10(3), 586. <https://doi.org/10.3390/cells10030586>
- Jain, K. K. (2005). Personalised medicine for cancer: From drug development into clinical practice. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6(9), 1463-1476. <https://doi.org/10.1517/14656566.6.9.1463>
- Jastrzab, A., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2022). The Origin and Biomedical Relevance of Cannabigerol. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7929. <https://doi.org/10.3390/ijms23147929>
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2), 139-163. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1508>
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 239-252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*, 17(1), 16-23.
- Kang, M. H., & Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: Targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), 1126-1132. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0144>
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein*

- Kaufmann, S. H., Mesner, P. W., Samejima, K., Toné, S., & Earnshaw, W. C. (2000). [1]—Detection of DNA Cleavage in Apoptotic Cells. İçinde J. C. Reed (Ed.), *Methods in Enzymology* (C. 322, ss. 3-15). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)22003-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)22003-X)
- Kearn, C. S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., & Glass, M. (2005). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: A mechanism for receptor cross-talk? *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1697-1704. <https://doi.org/10.1124/mol.104.006882>
- Kenevir raporu. (2021, Mart). <https://www.ordutb.org.tr/wp-content/uploads/2021/03/Kenevir-Raporu.pdf>
- Koltai, H., & Shalev, N. (2022). Anti-Cancer Activity of Cannabis sativa Phytocannabinoids: Molecular Mechanisms and Potential in the Fight against Ovarian Cancer and Stem Cells. *Cancers*, 14(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/cancers14174299>
- Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E. A., Asou, H., Said, J. W., Holden, S., Miyoshi, I., & Koeffler, H. P. (1998). Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 58(15), 3344-3352.
- Lah, T. T., Majc, B., Novak, M., Sušnik, A., Breznik, B., Porčnik, A., Bošnjak, R., Sadikov, A., Malavolta, M., Halilčević, S., Mlakar, J., & Zomer, R. (2022). The Cytotoxic Effects of Cannabidiol and Cannabigerol on Glioblastoma Stem Cells May Mostly Involve GPR55 and TRPV1 Signalling. *Cancers*, 14(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/cancers14235918>
- Lah, T. T., Novak, M., Pena Almidon, M. A., Marinelli, O., Žvar Baškovič, B., Majc, B., Mlinar, M., Bošnjak, R., Breznik, B., Zomer, R., & Nabissi, M. (2021). Cannabigerol Is a Potential Therapeutic Agent in a Novel Combined Therapy for Glioblastoma. *Cells*, 10(2), 340. <https://doi.org/10.3390/cells10020340>
- Lamb, A., Warren, A., & Neal, D. (2011). Pre-malignant Disease in the Prostate. İçinde *Pre-Invasive Disease: Pathogenesis and Clinical Management* (ss. 467-491). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6694-0_22
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

- Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., & Di Marzo, V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1375-1387. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105247>
- Lipinski, M. M., & Jacks, T. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, 18(55), 7873-7882. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203244>
- Liu, A. Y., & True, L. D. (2002). Characterization of Prostate Cell Types by CD Cell Surface Molecules. *The American Journal of Pathology*, 160(1), 37-43.
- Lopez-Beltran, A., Mikuz, G., Luque, R. J., Mazzucchelli, R., & Montironi, R. (2006). Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 448(2), 111-118. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0102-4>
- Lopez-Cavestany, M., Hahn, S. B., Hope, J. M., Reckhorn, N. T., Greenlee, J. D., Schwager, S. C., VanderBurgh, J. A., Reinhart-King, C. A., & King, M. R. (2023). Matrix stiffness induces epithelial-to-mesenchymal transition via Piezo1-regulated calcium flux in prostate cancer cells. *iScience*, 26(4), 106275. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106275>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Mahmoud, A. M., Kostrzewa, M., Marolda, V., Cerasuolo, M., Maccarinelli, F., Coltrini, D., Rezzola, S., Giacomini, A., Mollica, M. P., Motta, A., Paris, D., Zorzano, A., Di Marzo, V., Ronca, R., & Ligresti, A. (2023). Cannabidiol alters mitochondrial bioenergetics via VDAC1 and triggers cell death in hormone-refractory prostate cancer. *Pharmacological Research*, 189, 106683. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106683>
- Mansoury, M., Hamed, M., Karmustaji, R., Al Hannan, F., & Safrany, S. T. (2021). The edge effect: A global problem. The trouble with culturing cells in 96-well plates. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100987. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100987>
- Maselli, F. M., Giuliani, F., Laface, C., Perrone, M., Melaccio, A., De Santis, P., Santoro, A. N., Guarini, C., Iaia, M. L., & Fedele, P. (2023). Immunotherapy in Prostate Cancer: State of Art and New Therapeutic Perspectives. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 30(6), 5769-5794. <https://doi.org/10.3390/currncol30060432>

- McArthur, K., & Kile, B. T. (2018). Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*, 28(6), 475-493. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.003>
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1), 203-212. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>
- Michaud, D. S., Augustsson, K., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Willet, W. C., & Giovannucci, E. (2001). A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes & Control: CCC*, 12(6), 557-567. <https://doi.org/10.1023/a:1011256201044>
- Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S46-55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>
- Molina, A., & Belldgrun, A. (2011). Novel Therapeutic Strategies for Castration Resistant Prostate Cancer: Inhibition of Persistent Androgen Production and Androgen Receptor Mediated Signaling. *Journal of Urology*, 185(3), 787-794. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.10.042>
- Monge, A. (2008). *Conséquences fonctionnelles et structurales de l'association de deux mutations du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate* [These de doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008)]. <https://www.theses.fr/2008STR13120>
- Moradi, A., Srinivasan, S., Clements, J., & Batra, J. (2019). Beyond the biomarker role: Prostate-specific antigen (PSA) in the prostate cancer microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(3), 333-346. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09815-3>
- Mouraviev, V., & Polascik, T. J. (2006). Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006. *Current Opinion in Urology*, 16(3), 152. <https://doi.org/10.1097/01.mou.0000193393.54598.9f>
- Muller, T. (2017). *Rôle des récepteurs aux cannabinoïdes 1 (CB1R) du tissu adipeux sur la lipolyse et conséquences sur le métabolisme glucido-lipidique de la souris* [These de doctorat, Bourgogne Franche-Comté]. <https://www.theses.fr/2017UBFCI008>
- Nakamura, Y., Suzuki, T., Sugawara, A., Arai, Y., & Sasano, H. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate carcinoma. *Pathology International*, 59(5), 288-293. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02367.x>
- Nguyen, S. T., Nguyen, H. T.-L., & Truong, K. D. (2020). Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines.

- Nicolussi, S., & Gertsch, J. (2015). Endocannabinoid transport revisited. *Vitamins and Hormones*, 98, 441-485. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.011>
- O'Brien, K. (2022). Cannabidiol (CBD) in Cancer Management. *Cancers*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/cancers14040885>
- O'Brien, L. D., Wills, K. L., Segsworth, B., Dashney, B., Rock, E. M., Limebeer, C. L., & Parker, L. A. (2013). Effect of chronic exposure to rimonabant and phytocannabinoids on anxiety-like behavior and saccharin palatability. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 103(3), 597-602. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.10.008>
- Ochoa, S. V., Casas, Z., Albarracín, S. L., Sutachan, J. J., & Torres, Y. P. (2023). Therapeutic potential of TRPM8 channels in cancer treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1098448. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1098448>
- Okaiyeto, K., & Oguntibeju, O. O. (2021). African Herbal Medicines: Adverse Effects and Cytotoxic Potentials with Different Therapeutic Applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5988. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115988>
- Oláh, A., Markovics, A., Szabó-Papp, J., Szabó, P. T., Stott, C., Zouboulis, C. C., & Bíró, T. (2016). Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrhoeic skin and acne treatment. *Experimental Dermatology*, 25(9), 701-707. <https://doi.org/10.1111/exd.13042>
- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 389-462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Pacher, P., Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2020). Beyond THC and Endocannabinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60, 637-659. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441>
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K., & Naik, S. (2022). Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere*, 289, 133012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
- PC-3—CRL-1435 | ATCC. 07 Kasim 2023, <https://www.atcc.org/products/crl-1435>
- PNT1A human Normal prostate epithelium immortalized with SV40. 95012614 | Sigma-Aldrich. 07 Kasim 2023, <http://www.sigmaaldrich.com/>

- Pollastro, F., De Petrocellis, L., Schiano-Moriello, A., Chianese, G., Heyman, H., Appendino, G., & Taglialatela-Scafati, O. (2017). Amorphusin-type phytocannabinoids from *Helichrysum umbraculigerum*. *Fitoterapia*, 123, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.09.010>
- Prandi, C., Blangetti, M., Namdar, D., & Koltai, H. (2018). Structure-Activity Relationship of Cannabis Derived Compounds for the Treatment of Neuronal Activity-Related Diseases. *Molecules*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules23071526>
- Prateeksha, P., Sharma, V. K., Singh, S. M., Sharma, M., Diwan, D., Hesham, A. E.-L., Guleria, S., Nguyen, Q. D., Gupta, V. K., & Singh, B. N. (2023). Tetrahydrocannabinols: Potential cannabimimetic agents for cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 42(3), 823-845. <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10078-2>
- Preisser, F., Cooperberg, M. R., Crook, J., Feng, F., Graefen, M., Karakiewicz, P. I., Klotz, L., Montironi, R., Nguyen, P. L., & D'Amico, A. V. (2020). Intermediate-risk Prostate Cancer: Stratification and Management. *European Urology Oncology*, 3(3), 270-280. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2020.03.002>
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Rakotondrahaso, V. (2019). *Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cancer de la prostate* [These de doctorat, Montpellier]. <https://www.theses.fr/2019MONTT023>
- Ramot, Y., Mastrofrancesco, A., Camera, E., Desreumaux, P., Paus, R., & Picardo, M. (2015). The role of PPAR γ -mediated signalling in skin biology and pathology: New targets and opportunities for clinical dermatology. *Experimental Dermatology*, 24(4), 245-251. <https://doi.org/10.1111/exd.12647>
- Robinson, N. J., & Schiemann, W. P. (2022). Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation. *Cancers*, 14(3), 808. <https://doi.org/10.3390/cancers14030808>
- Ruiz, L., Miguel, A., & Díaz-Laviada, I. (1999). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Letters*, 458(3), 400-404. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01073-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01073-X)
- Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 80, 67-134. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>

- Safa, A. R., & Pollok, K. E. (2011). Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. *Cancers*, 3(2), 1639-1671. <https://doi.org/10.3390/cancers3021639>
- Sandhu, S., Moore, C. M., Chiong, E., Beltran, H., Bristow, R. G., & Williams, S. G. (2021). Prostate cancer. *Lancet (London, England)*, 398(10305), 1075-1090. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00950-8)
- Sathianathan, N. J., Konety, B. R., Crook, J., Saad, F., & Lawrentschuk, N. (2018). Landmarks in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0060-7>
- Saxena, M., & Christofori, G. (2013). Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular Oncology*, 7(2), 283-296. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009>
- Schoeman, R., Beukes, N., & Frost, C. (2020). Cannabinoid Combination Induces Cytoplasmic Vacuolation in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Molecules*, 25(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/molecules25204682>
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motloun, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(17), 5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>
- Seltzer, E. S., Watters, A. K., MacKenzie, D., Granat, L. M., & Zhang, D. (2020). Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers*, 12(11), E3203. <https://doi.org/10.3390/cancers12113203>
- Sevrioukova, I. F. (2011). Apoptosis-inducing factor: Structure, function, and redox regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(12), 2545-2579. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3445>
- Sikka, S., Chen, L., Sethi, G., & Kumar, A. P. (2012). Targeting PPAR γ Signaling Cascade for the Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *PPAR Research*, 2012, e968040. <https://doi.org/10.1155/2012/968040>
- Singh, K., Nassar, N., Bachari, A., Schanknecht, E., Telukutla, S., Zomer, R., Piva, T. J., & Mantri, N. (2021). The Pathophysiology and the Therapeutic Potential of Cannabinoids in Prostate Cancer. *Cancers*, 13(16), 4107. <https://doi.org/10.3390/cancers13164107>
- Sohail, M. F., Rehman, M., Sarwar, H. S., Naveed, S., Salman, O., Bukhari, N. I., Hussain, I., Webster, T. J., & Shahnaz, G. (2018). Advancements in the oral delivery of Docetaxel: Challenges, current state-of-the-art and future trends. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 3145-3161. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164518>

- Sooda, K., Allison, S. J., & Javid, F. A. (2023). Investigation of the cytotoxicity induced by cannabinoids on human ovarian carcinoma cells. *Pharmacology Research & Perspectives*, 11(6), e01152. <https://doi.org/10.1002/prp2.1152>
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., & Paulson, D. F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*, 21(3), 274-281. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210305>
- Suliman, N. A., Taib, C. N. M., Moklas, M. A. M., & Basir, R. (2018). Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) Induce Neurogenesis and Improve Cognitive Performances of Male Sprague Dawley Rats. *Neurotoxicity Research*, 33(2), 402-411. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9806-x>
- Swortwood, M. J., Newmeyer, M. N., Andersson, M., Abulseoud, O. A., Scheidweiler, K. B., & Huestis, M. A. (2017). Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled smoked, vaporized, and oral cannabis administration. *Drug Testing and Analysis*, 9(6), 905-915. <https://doi.org/10.1002/dta.2092>
- Tahir, M. N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., & Trant, J. F. (2021). The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research*, 3, 7. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00062-4>
- Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2009). Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Letters*, 583(12), 2061-2066. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.024>
- Thors, L., Bergh, A., Persson, E., Hammarsten, P., Stattin, P., Egevad, L., Granfors, T., & Fowler, C. J. (2010). Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: Association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. *PloS One*, 5(8), e12275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012275>
- Turner, C. E., Elsohly, M. A., & Boeren, E. G. (1980). Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products*, 43(2), 169-234. <https://doi.org/10.1021/np50008a001>
- Ueda, N., Tsuboi, K., & Uyama, T. (2013). Metabolism of endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: Canonical and alternative pathways. *The FEBS Journal*, 280(9), 1874-1894. <https://doi.org/10.1111/febs.12152>
- Unal, A., Baran, Y., & Kiraz, Y. (2018). *Kanser Moleküler Biyolojisi*.
- Valdeolivas, S., Navarrete, C., Cantarero, I., Bellido, M. L., Muñoz, E., & Sagredo, O. (2015). Neuroprotective Properties of Cannabigerol in Huntington's Disease: Studies in R6/2 Mice and 3-Nitropropionate-lesioned Mice. *Neurotherapeutics*, 12(1), 185-199. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0304-z>

- Vallabhapurapu, S. D., Blanco, V. M., Sulaiman, M. K., Vallabhapurapu, S. L., Chu, Z., Franco, R. S., & Qi, X. (2015). Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget*, 6(33), 34375-34388.
- Vanharanta, S., & Massagué, J. (2013). Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*, 24(4), 410-421. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.007>
- Viereckl, M. J., Krutsinger, K., Apawu, A., Gu, J., Cardona, B., Barratt, D., & Han, Y. (2022). Cannabidiol and Cannabigerol Inhibit Cholangiocarcinoma Growth In Vitro via Divergent Cell Death Pathways. *Biomolecules*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/biom12060854>
- Wei, B. Q., Mikkelsen, T. S., McKinney, M. K., Lander, E. S., & Cravatt, B. F. (2006). A Second Fatty Acid Amide Hydrolase with Variable Distribution among Placental Mammals *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36569-36578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606646200>
- WHO Traditional Medicine Strategy: 2014–2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>
- Wittekind, C., & Neid, M. (2005). Cancer invasion and metastasis. *Oncology*, 69 Suppl 1, 14-16. <https://doi.org/10.1159/000086626>
- Wong, Y. C., & Wang, Y. Z. (2000). Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *International Review of Cytology*, 199, 65-116. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(00\)99002-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(00)99002-8)
- Wyrobnik, I., Steinberg, M., Gelfand, A., Rosenblum, R., Eid Mutlak, Y., Sulimani, L., Procaccia, S., Ofran, Y., Novak-Kotzer, H., & Meiri, D. (2023). Decreased melanoma CSF-1 secretion by Cannabigerol treatment reprograms regulatory myeloid cells and reduces tumor progression. *OncolImmunology*, 12(1), 2219164. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2023.2219164>
- Yang, C., Zhang, W., Wang, J., Chen, P., & Jin, J. (2019). Effect of docetaxel on the regulation of proliferation and apoptosis of human prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 19(5), 3864-3870. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9998>
- Yuan, S., & Akey, C. W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure (London, England: 1993)*, 21(4), 501-515. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
- Yüksel, B., Hızlı Deniz, A. A., Şahin, F., Sahin, K., & Türkel, N. (2023). Cannabinoid compounds in combination with curcumin and piperine display an anti-tumorigenic effect against colon cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1145666>

- Zagzoog, A., Mohamed, K. A., Kim, H. J. J., Kim, E. D., Frank, C. S., Black, T., Jadhav, P. D., Holbrook, L. A., & Laprairie, R. B. (2020). In vitro and in vivo pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77175-y>
- Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Kaigorodova, E. V., Krakhmal, N. V., & Perelmuter, V. M. (2019). Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 84(7), 762-772. <https://doi.org/10.1134/S0006297919070071>
- Zeppa, L., Aguzzi, C., Morelli, M. B., Marinelli, O., Giangrossi, M., Luongo, M., Amantini, C., Santoni, G., & Nabissi, M. (2024). Cannabigerol Induces Autophagic Cell Death by Inhibiting EGFR-RAS Pathways in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms25042001>
- Zhang, J. H., & Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290049>