



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM
DALI



**OKSİDATİF STRESE DİRENÇLİ METASTATİK PROSTAT
KANSERİ HÜCRELERİNDE NF- κ B' NİN SİRNA ARACILI
İNHİBİSYONUNUN CABAZİTAXEL DUYARLILIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİ**

BİLGE ARIÖZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2025



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



**OKSİDATİF STRESE DİRENÇLİ METASTATİK PROSTAT
KANSERİ HÜCRELERİNDE NF-KB' NİN SİRNA ARACILI
İNHİBİSYONUNUN CABAZİTAXEL DUYARLILIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Bilge ARIÖZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Işıl Ezgi ERYILMAZ

THİZ-2024-1876, TYL-2023-1617 – B.U.Ü. BAP Birimi

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Oksidatif Strese Dirençli Metastatik Prostat Kanseri Hücrelerinde NF- κ B’nin siRNA Aracılı İnhibisyonunun Cabazitaxel Duyarlılığı Üzerine Etkileri**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Bilge ARIÖZ
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

22/07/2025

Adı Soyadı: Bilge ARIÖZ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Oksidatif Strese Dirençli Metastatik Prostat Kanseri Hücrelerinde NF- κ B'nın siRNA Aracılı İnhibisyonunun Cabazitaxel Duyarlılığı Üzerine Etkileri

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u> <u>DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☐	☐	
Dış Kapak Sayfası	☐	☐	
İç Kapak Sayfası	☐	☐	
Kabul Onay Sayfası	☐	☐	
Sayfa Düzeni	☐	☐	
İçindekiler Sayfası	☐	☐	
Yazı Karakteri	☐	☐	
Satır Aralıkları	☐	☐	
Başlıklar	☐	☐	
Sayfa Numaraları	☐	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☐	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☐	☐	
Kaynaklar	☐	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Doç. Dr. Işıl Ezgi ERYILMAZ

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanserin Tanımı	5
2.2. Dünya’da ve Türkiye’de Kanser Yüğü İstatistikleri	5
2.3. Kanser Oluşumunu Etkileyen Faktörler	8
2.3.1. Kanser oluşumunu etkileyen dış kaynaklı faktörler.....	9
2.3.2. Kanser oluşumunu etkileyen iç kaynaklı faktörler.....	15
2.4. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri	20
2.4.1. Otonom büyüme sinyallerinin varlığı	21
2.4.2. Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık.....	22
2.4.3. Programlı hücre ölümünden (apoptozis) kaçış	23
2.4.4. Sınırsız replikatif potansiyel.....	24
2.4.5. Metastaz ve hücre göçü.....	25
2.4.6. Anjiyogenez.....	26
2.4.7. Genom instabilitesi ve genetik mutasyonlar	27
2.4.8. Tümör teşvik edici inflamasyon ve immün sistemden kaçış	28
2.4.9. Metabolik yeniden programlama	30
2.4.10. Fenotipik plastisite	31
2.4.11. Hücre senesens	32
2.5. Redoks Sinyalizasyonu ve Karsinogenez Sürecindeki Rollerini	33
2.5.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	33

2.5.2. Hücre içi ROS kaynakları	34
2.5.3. Hücre içi antioksidan mekanizmaları ve hücre içi redoks sinyalizasyonu	35
2.5.4. Redoks adaptasyonu ve karsinogenez sürecindeki rolü	37
2.6. Prostat Kanseri.....	42
2.6.1. Küresel prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları	43
2.6.2. Prostat kanserinin histopatolojisi ve moleküler mekanizmaları	44
2.6.3. Prostat kanseri tedavisi ve klinik uygulamalar	52
2.6.4. PK’nde redoks adaptasyonu ve Cabazitaxel duyarlılığı ilişkisi.....	54
2.7. RNA İnterferans Mekanizması Aracılığı ile Gen İfadesinin Düzenlenmesi	55
2.8. Tez Çalışmasının Amacı	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
3.1. Gereç.....	59
3.1.1. Laboratuvar donanımı ve cihazlar	59
3.2. Yöntem	61
3.2.1. Hücre kültürü	61
3.2.2. Kullanılan ilaçların stok solüsyonlarının hazırlanması ve hücrelere uygulanmak üzere uygun konsantrasyonda dilüe edilmesi.....	63
3.2.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) dirençli LNCaP hücre hattının (LNCaP-HPR5M) eldesi.....	63
3.2.4. Sitotoksosite analizi.....	64
3.2.5. siRNA transfeksiyonu	66
3.2.6. Apoptotik etkilerin belirlenmesi	68
3.2.7. Hücre içi kaspaz aktivasyonunun değerlendirilmesi	69
3.2.8. Oksidatif stresin belirlenmesi.....	71
3.2.9. Protein ekspresyon analizleri	74
3.2.10. İstatistiksel analiz.....	79
4. BULGULAR.....	80
4.1. LNCaP-HPR5M Hücre Hattının Eldesi ve Direnç Validasyonları	80
4.1.1. Sitotoksosite analizleri	80
4.1.2. Oksidatif stres analizleri.....	81
4.2. siRNA Transfeksiyonunun Optimizasyonu ve RelA Gen Sessizleştirme Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	88
4.2.1. siRNA transfeksiyonunun optimizasyonu ve RelA gen sessizleştirmesinin etkinliğinin RT-qPCR ile değerlendirilmesi	89
4.2.2. siRNA transfeksiyonunun Western Blot yöntemi ile doğrulanması	90

4.3. Sitotoksik Etkiler.....	91
4.3.1. Cabazitaxel'in parental LNCaP hücrelerinde sitotoksik etkisi	91
4.3.2. Cabazitaxel' in LNCaP-HPR5M hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	92
4.3.3. Cabazitaxel'in siRNA transfeksiyonu sonrasında LNCaP-HPR5M hücrelerinde sitotoksik etkisi	93
4.4. Apoptotik Etkiler	94
4.4.1. Parental LNCaP hücrelerinde Cabazitaxel'in apoptotik etkileri.....	94
4.4.2. LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel'in apoptotik etkisi	96
4.4.3. siRNA transfeksiyonu ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücrelerinde apoptotik etkisi	97
4.5. Hücrelerde Kaspaz Aktivasyonunun Akış Sitometrik Yöntem ile Değerlendirilmesi	100
4.5.1. Cabazitaxel' in LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkileri	100
4.5.2. Cabazitaxel' in LNCaP- HPR5M hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkileri.....	101
4.5.3. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA transfeksiyonu ve Cabazitaxel kombin tedavisinin kaspaz aktivasyonuna etkisi	103
4.6.Oksidatif Stres Üzerine Etkiler.....	105
4.6.1. siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücre hattında oksidatif stres üzerine etkilerinin akış sitometrik analizi	105
4.6.2. siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkilerinin mikroskopik analizi	107
4.7. Protein Ekspresyonu Üzerine Etkiler	110
4.7.1. siRNA-RelA ve Cabazitaxel'in tekli ve kombin tedavilerinin LNCaP-HPR5M hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	110
4.7.2. siRNA-RelA ve Cabazitaxel'in tekli ve kombin tedavilerinin TNF- α ile uyarılan LNCaP-HPR5M hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri	112
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	115
6. KAYNAKLAR	129
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	145
8. TEŞEKKÜR	149
9. ÖZGEÇMİŞ	150

TÜRKÇE ÖZET

Prostat kanseri (PK), erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Hastalığın ileri evrelerinde metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri (mKDPK) gelişmekte ve tedavi seçenekleri yetersiz kalmaktadır. Cabazitaxel, mKDPK tedavisinde kullanılan ikinci nesil taksan türevi bir kemoterapi ajanıdır. Ancak bu ajana karşı gelişen direnç ve yan etkiler, tedavinin uzun dönem başarısını sınırlamaktadır. NF- κ B sinyal yolunun hem oksidatif stres yanıtı hem de ilaç direncinde etkili olduğu bilinirken, bu yolağın hedeflenmesi ile Cabazitaxel'e olan duyarlılığın artırabileceği öne sürülmektedir. Mevcut tez çalışmasında, NF- κ B p65 (RelA) alt biriminin siRNA aracılı sessizleştirilmesinin oksidatif strese dirençli LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel duyarlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücrelerinde, siRNA-RelA ile gen sessizleştirilmesi sonrası Cabazitaxel tekli ve kombin tedavileri uygulanarak hücrelerde fonksiyonel analizler gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite WST-1 testiyle, apoptoz Annexin V ve multikaspaz analizleriyle, reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri canlı hücre ROS boyama ve akış sitometrik analizle ve NF- κ B p65 sinyal yolağı ilişkili protein ekspresyonları Western Blot ile analiz edilmiştir. Bulgular, siRNA-RelA uygulamasının NF- κ B p65 sinyal yolağında disregülasyona yol açarak Cabazitaxel'in apoptotik ve pro-oksidan etkilerini anlamlı biçimde arttırdığını göstermiştir. Sonuçlar, oksidatif strese dirençli PK hücrelerinde NF- κ B yolağının hedeflenmesinin Cabazitaxel duyarlılığının arttırılmasında terapötik potansiyel taşıdığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, ROS, NF- κ B, redoks adaptasyonu, Cabazitaxel, siRNA

İNGİLİZCE ÖZET

THE EFFECTS OF SIRNA-MEDIATED INHIBITION OF NF- κ B ON CABAZITAXEL SENSITIVITY IN OXIDATIVE STRESS-RESISTANT METASTATIC PROSTATE CANCER CELLS

Prostate cancer (PC) is the most common type of cancer in men. In advanced stages of the disease, metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) develops, and treatment options remain inadequate. Cabazitaxel is a second-generation taxane-derived chemotherapy agent used in the treatment of mCRPC. However, resistance to this agent and its associated side effects limit the long-term success of the treatment. The NF- κ B signaling pathway is known to play a significant role in both the oxidative stress response and drug resistance. Therefore, targeting this pathway may increase sensitivity to Cabazitaxel. In the present thesis study, the effects of siRNA-mediated silencing of the NF- κ B p65 (RelA) subunit on Cabazitaxel sensitivity were investigated in LNCaP-HPR cells, which are resistant to oxidative stress. Following gene silencing with siRNA-RelA in LNCaP and LNCaP-HPR cells, treatments with Cabazitaxel—both alone and in combination—were applied, and functional analyses were conducted. Cytotoxicity was assessed by WST-1 assay; apoptosis was evaluated using Annexin V and multicaspase assays; reactive oxygen species (ROS) levels were measured via live cell ROS staining and flow cytometric analysis; and the expression of NF- κ B p65 signaling pathway-related proteins was examined by Western blot. The findings demonstrated that siRNA-RelA administration significantly increased the apoptotic and pro-oxidant effects of Cabazitaxel by dysregulating the NF- κ B p65 signaling pathway. These results suggest that targeting the NF- κ B pathway in oxidative stress-resistant prostate cancer cells has therapeutic potential for enhancing Cabazitaxel sensitivity.

Keywords: Prostate cancer, ROS, NF- κ B, redox adaptation, Cabazitaxel, siRNA

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ

					
Y	Y	■	Y	Y	Y
					
Y	Y	Y	Y	Y	Y
					
Y	Y	Y	Y	Y	Y

Doktora/ Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Oksidatif Strese Dirençli Metastatik Prostat Kanseri Hücrelerinde NF- κ B’nin siRNA Aracılı İnhibisyonunun Cabazitaxel Duyarlılığı Üzerine Etkileri**” başlıklı tez 3. Sağlık ve Kaliteli Yaşam Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

Anahtar kelimeler aşağıdaki bağlantı üzerinden
<https://incites.help.clarivate.com/Content/Resources/Docs/SDG2023.xlsx>
seçilmelidir.

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PK), GLOBOCAN 2022'ye göre dünyaya çapında erkekler arasında en sık görülen ikinci kanser türü olarak bilinmektedir. Yaşlılık, siyah ırk, ailede hastalık öyküsünün olduğu BRCA1 ve BRCA2 gibi bazı gen kusurları ve Lynch Sendromu gibi bazı sendromlar PK'nin bilinen risk faktörlerindendir. Bunun yanında aşırı kilo artışı, diyet, düşük plazma selenyum seviyeleri ve sigara tüketiminin PK riskini arttırdığını gösteren araştırmalar mevcuttur (Ferlay ve ark., 2020; Sung ve ark., 2021). PK gelişimi, hücre büyümesi, çoğalması ve ölümünü kontrol eden ve DNA hasarı yanıtında rol oynayan genlerdeki mutasyonlar tarafından yönetilmektedir. PK oldukça heterojen bir hastalıktır. PK hastalarının büyük çoğunluğunda, prostat ile sınırlı olan lokalize hatalık ya da küçük bir k sımına bölgesel lenf bezlerine yayılmış lokalize hastalık tanısı konmaktadır. PK vakalarının çok küçük bir k sımında ise uzak metastaz bulunmaktadır. Bölgesel ya da lokalize hastalığın doğal seyri tipik olarak oldukça uzun sürmektedir ve hastaların birçoğunda tümör büyümesi onlarca yıl sürebilmektedir. Metastatik prostat kanseri ise önemli ölçüde azalmış genel sağ kalım (OS) oranları ile ilişkilendirilmektedir. *TP53* gen mutasyonları ve *MYC* amplifikasyonunun kombinasyonları hastalık gelişiminin tüm evrelerinde yaygın olarak görülmektedir (Rebello ve ark., 2021; Desai, McMags, & Sharifi 2021). PK genellikle androjen reseptörü (AR) sinyalizasyonu ile ilişkilidir. PK hastalarının tedavisinde ilk basamak androjen yoksunluk tedavisi (ADT) olarak kabul edilmektedir. ADT, cerrahi ya da kimyasal ilaçlar yoluyla testosteron hormonu üretiminin azaltılmasını ifade etmektedir. ADT tedavisi aracılığıyla testosteronun kastrasyon seviyelerine düşürülmesi, hastaların büyük bir oranında iyiye giden bir klinik yanıtla sonuçlanmaktadır. Ancak ADT tedavisine rağmen PK, hastaların yaklaşık %20-30'unda 2 yıl içinde metastatik kastrasyon direneli prostat kanseri (mKDPK) olarak tekrar ortaya çıkmaktadır. N kse yol açan moleküler mekanizmalar arasında sıklıkla AR mutasyonları veya amplifikasyonları ve alternatif sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşen androjen sentezinin gerçekleşmesi olarak bilinmektedir (Yamada, & Betran, 2021; vom Amsberg, & Merseburg, 2020).

MKDPK oldukça kötü bir prognoza sahip olup hastalarda ortalama 3 yıllık bir sağ kalım oranı ile karakterizedir. Bu sebepten dolayı önemli bir terapötik zorluk meydana getirmektedir. Enzalutamide (ENZ) ve Abiraterone (ABI), AR sinyalini daha fazla baskılamak amacıyla mKDPK'nin tedavisinde kullanılan AR inhibitörü (ARI) olarak bilinen terapötik ajanlardır. Bu ajanlar genel sağ kalım  zeinde etkili olmasına rağmen hastalığın tedavisinde tam yanıt elde edilememektedir (Labrecque ve ark., 2019; Wilt

ve ark., 2021). Taksan bazlı kemoterapötik ajanlar ise mitotik inhibitörlerdir ve günümüzde mKDPK hastaları için birinci ve ikinci basamak tedavi olarak kullanılmaktadır. Taksanlar anti-tümör aktivitelerini çeşitli etki mekanizmaları ile göstermektedir. Taksan bazlı kemoterapötikler, beta-tübülin proteinlerine bağlanarak onları stabile etmekte ayrıca, polimerizasyonunu sağlayarak da mitoz bölünmedeki işlevlerini yerine getirmelerini engellemektedir. Hücre döngüsünde bu süreçlerin bozulması, hücre döngüsünün G2/M evrelerinde durması ve apoptozun indüklenmesi gibi yıkıcı etkilere neden olmaktadır. Buna ek olarak, taksanların bazı anti-tümör aktiviteleri, AR ifadesinin azaltılması, AR nükleer translokasyonunun inhibisyonu ve AR transkripsiyonel aktivitesinin FOXO-1 aracılı baskılanması gibi AR sinyalizasyonu üzerine etkileri ile de gerçekleşebilmektedir (Kroon, Krooijman, Cho, Storm, & van der Pluijm, 2016).

Taksan bazlı bir kemoterapötik ajan olan docetaxel, 2004 yılından itibaren mKDPK hastalarının tedavisi için kullanılmaya başlamıştır. Ancak, hastaların neredeyse yarısında ilaca karşı oluşan direnç kritik bir problem yaratmaktadır. Son yıllarda, ABI ve AR antagonistlerine ek olarak kullanılmaya başlayan ve yarı-sentetik taksan bazlı kemoterapötik ajan olan Cabazitaxel, hastalarda iki yıllık sağ kalım oranını büyük ölçüde yükseltmiştir. Ancak, hastalarda ilaca karşı oluşan direnç ve ilacın uzun süreli kullanımı durumunda özellikle yaşlı hastalarda oluşabilen beyaz kan hücrelerindeki toksik etkisi ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar nedeniyle Cabazitaxel kullanımı sınırlandırılmaktadır (Endo ve ark., 2021; Pobel ve ark, 2021).

Kanser ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynayan anahtar sinyal moleküllerinden biri reaktif oksijen türevleridir (ROS). Hücrelerde endojen olarak mitokondriyal metabolizma ve transmembran NADPH oksidaz (NOX) ailesinin aktivitesi ile süperoksit ($O_2\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil ($\cdot OH$) dahil olmak üzere çok sayıda ROS üretilmektedir. Normal hücrelerde ROS, hücre içi homeostazın korunmasında, ikincil haberciler olarak hücre içi sinyalizasyonda ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev yapmaktadır. Hücreler ROS dengesini sağlamak için süperoksit dismutazlar (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazlar (GPX) olmak üzere ROS türevlerini metabolize edebilecek çoklu enzim sistemleri gibi mekanizmaları kullanmaktadırlar. ROS dengesinin bozulması hücrelerde, DNA ya da lipitlerde oksidatif hasarın

meydana gelmesi ve mutajenezin indüklenmesi gibi yıkıcı etkilere neden olabilen oksidatif strese yol açabilmektedir. Bu yıkıcı etkiler, kanser dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Bunun yanında artmış ROS seviyeleri kanser hücrelerinde hücre ölümünü de tetikleyebilmektedir (Slika ve ark.,2022; Tuli ve ark., 2023).

Kanser hücrelerinde artan ROS seviyeleri, hücre sağ kalımına katkıda bulunan sinyal yollarının aktivasyonu, tümör baskılayıcı gen fonksiyonunun kaybı, artan glikoz metabolizması, hipoksiye karşı adaptasyonun geliştirilmesi ve onkogenik mutasyonların gelişmesi gibi etkilere neden olmakta ve kanser gelişimini destekleyebilmektedir. Kanser hücrelerinin antioksidan kapasitesi, aşırı ROS'u temizlerken pro-tümörjenik ROS seviyelerini koruyarak anormal hücre proliferasyonu, metastaz, apoptozun baskılanması, anjiyogenezin indüklenmesi ve ilaç direncinin oluşması gibi süreçlerle sonuçlanan redoks adaptasyonunun gelişmesine katkı sağlamaktadır. Redoks adaptasyonunda, NF- κ B, HIF-1 α ve Nrf2 gibi sinyal yollarının katkısı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. NF- κ B'nin DNA bağlanma bölgesinde oksitlenebilir sisteinlerin bulunması nedeniyle H₂O₂, NF- κ B sinyal yolunu doğrudan aktive edebilmekte ve kanser hücrelerinin sağ kalımını ve proliferasyonunu indükleyebilmektedir (Moloney, & Cotter, 2018; Zhang ve ark., 2023).

NF- κ B sinyal yolunun normal hücrelerde oksidatif stres ve inflamasyon yanıtını düzenlediği, fizyolojik doku ve hücre homeostazını koruduğu bilinmektedir. NF- κ B transkripsiyon faktörü ailesi RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 ve NF- κ B2 olmak üzere 5 farklı proteinden meydana gelmektedir. NF- κ B yolunun aktivasyonu ile I κ B kinaz kompleksi (IKK) uyarıldıktan sonra ubiküitin aracılı proteazomal bozunma ile yıkılmakta ve IKK aktive edilmektedir. Aktive edilen IKK, NF- κ B dimerlerinin fosforilasyonunu ve nükleusa translokasyonunu sağlamaktadır. NF- κ B dimerinin hücre nükleusuna translokasyonu, alt yolak genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olmaktadır (Huang ve ark., 2023). NF- κ B sinyal yolunun, malign tümör hücrelerinin çoğalmasında, anjiyogenezinde ve metastazında çok önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Ma ve ark., 2021).

Bir gen susturma teknolojisi olan RNA interferans (RNAi-siRNA), yüksek verimlilik ve düşük toksisiteye sahip bir yöntem olarak bilinmektedir. siRNA'lar, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) aracılığı ile tamamlayıcı mRNA'yı parçalayarak hedef genlerin aşağı

regülasyonuna neden olmaktadır. siRNA, direkt konjugat olarak iletilebildiği gibi nano-taşıyıcılar ya da lipozom bazlı özel ajanlar tarafından da hücre içine iletilebilmektedir. Hücre içine iletilen çift zincirli siRNA molekülü, Dicer ve Argonaute-2 (Ago-2) olmak üzere birkaç farklı protein içeren RISC kompleksine katılmakta ve burada Dicer tarafından kesilerek olgun siRNA'ya dönüştürülmektedir. Olgun siRNA daha sonra RISC kompleksi tarafından hedeflediği mRNA'ya yönlendirilmekte ve mRNA'ya bağlanarak parçalanmasına neden olmaktadır. siRNA'lar hedefledikleri tek bir mRNA'yı yüksek spesifite ile susturmaktadır. Klinikte siRNA kullanımı, proliferasyon faktörlerini kodlayan spesifik genleri hedefleyerek onları susturma yeteneği ile umut verici sonuçlar sağlamaktadır. siRNA tedavisinin klinikte uygulanması bazı hastalıklar için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Xu ve ark., 2023; Friedric, & Aigner, 2022).

Mevcut tez çalışmasının temel amacı, PK tedavisinde yaygın olarak kullanılan Cabazitaxel'e duyarlılıkta oksidatif strese direncin ve bu direncin gelişmesinde rolü olan NF- κ B sinyal yolunun rolünü değerlendirmek ve bu sinyal yolunun siRNA aracılığı ile hedeflenmesinin Cabazitaxel duyarlılığı üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Bu kapsamda, oksidatif strese dirençli LNCaP-HPR5M hücre hattı incelenmiştir. Mevcut tez çalışmasında, siRNA-RelA ile NF- κ B p65 alt biriminin sessizleştirilmesinin hem Cabazitaxel'in sitotoksik etkisini hem de apoptotik yanıtları anlamlı biçimde arttırdığı gösterilmiştir. Annexin V ile analiz edilen Apoptotik hücre, kaspaz aktivitesi ve cleaved caspase-3 düzeylerindeki artış, bu etkinin apoptoz mekanizmaları üzerinden gerçekleştiğini desteklemiştir. Ayrıca, CM-H₂DCFDA ve DHE boya ile yapılan analizler ve akış sitometrik ROS analizleri kombin tedavinin hücre içi oksidatif stres düzeylerini arttırdığını ortaya koymuştur. Tezin en önemli bulgusu olarak Western Blot analizleri ise, NF- κ B ve p-NF- κ B düzeylerinde anlamlı bir azalma ve buna paralel olarak apoptoz ile ilişkili protein cleaved caspase-3'te belirgin bir artış olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, tedaviye dirençli tümörlerde Cabazitaxel etkinliğini artırmak amacıyla NF- κ B hedefli gen susturma stratejilerinin terapötik potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı

Kanser, temelde genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi sonucunda onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı nedeniyle normal hücrelerin kontrolsüz proliferasyon, metastatik ve invaziv özellik kazanması ile karakterize olan, vücudun primer bölgelerinde başlayarak yavaş ve çok adımlı bir süreçle vücudun diğer dokularına yayılabilen hücresel düzeyde çok fonksiyonlu genetik bir hastalıktır. Kanser, hücre bölünmesi ve hücre ölümünde rol oynayan çoklu genlerin ekspresyonlarındaki bozukluklarla karakterizedir ve bu bozukluklar normal hücresel sürecin bozulmasına yol açmaktadır. Bu durum, tümör hücresi popülasyonunun büyümesine katkıda bulunan hücre çoğalması ve hücre ölümünün dengesizliği ile sonuçlanmaktadır (Ruddon, 2007).

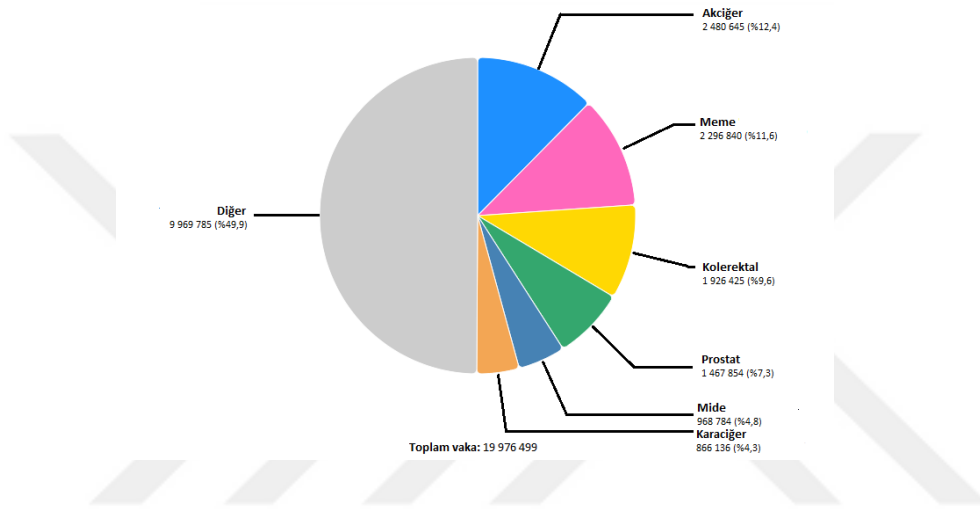
Kanser, dünya genelinde kalp hastalıklarından sonra en yüksek ölüm oranına sahip, heterojen bir hastalık grubunu temsil etmekte ve önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ciddi tehdit oluşturmaktadır (Schwartz, 2024). Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra kök hücre tedavisi, hedefe yönelik ilaç geliştirme, immünoterapi ve gen tedavisi gibi yenilikçi yaklaşımlar hızla geliştirilmektedir. Bu tedavi yöntemleri, birçok kanser türünde hastalığın prognozunu olumlu yönde etkilemektedir (Zugazagoitia ve ark., 2016; Debela ve ark., 2021; Baudino, 2015). Ancak, tütün kullanımı, alkol tüketimi, beslenme alışkanlıkları gibi çevresel faktörlerin yanında genetik yatkınlık gibi bireysel risk faktörleri nedeniyle her yıl dünya genelinde yeni kanser tanısı alan hasta sayısı ve kansere bağlı ölüm oranlarında artış devam etmektedir (Weeden ve ark., 2023).

2.2. Dünya’da ve Türkiye’de Kanser Yüğü İstatistikleri

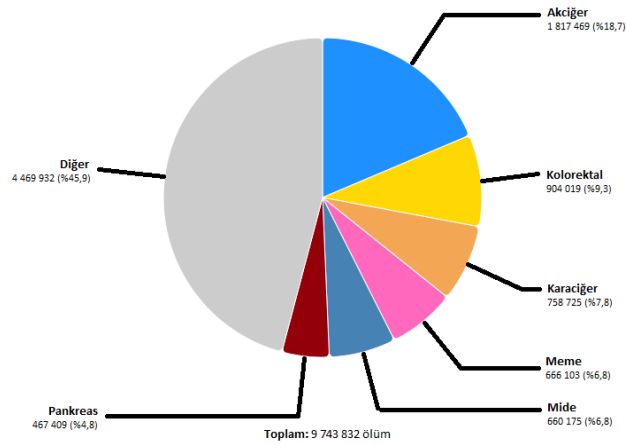
Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ ne bağlı olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)’ ın 8 Şubat 2024’ te yayımladığı GLOBOCAN 2022 küresel kanser yüğü istatistiklerine göre, dünya genelinde her 5 kişiden 1’i kanser tanısı almakta, kanser tanısı alan her 9 erkekten 1’i ve her 12 kadından 1’i yaşamını yitirmektedir. Aynı raporda yer alan verilere göre, küresel kanser insidansı yaklaşık 20 milyon yeni vaka ile GLOBOCAN 2020 verilerine kıyasla artış göstermiş, ancak kansere bağlı ölüm oranı dünya genelinde yaklaşık 10 milyon kişi ile büyük ölçüde sabit kalmıştır.

GLOBCAN 2022 verilerine göre, yaş ve cinsiyet ayrımı gözetilmeksizin dünya genelinde en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer kanseri (%12,4), meme kanseri (%11,6), kolorektal kanser (%9,6), prostat kanseri (%7,3), mide kanseri (%4,9), karaciğer kanseri (%4,3), tiroid kanseri (%4,1) ve serviks kanseri (%3,3) olarak rapor edilmiştir. Kansere bağlı mortalite oranları incelendiğinde ise, en ölümcül üç kanser türü %18,7 ile akciğer kanseri, %9,3 ile kolorektal kanser ve %7,8 ile karaciğer kanseri olarak sıralanmaktadır (Bray ve ark., 2024; Şekil 1).

A)



B)



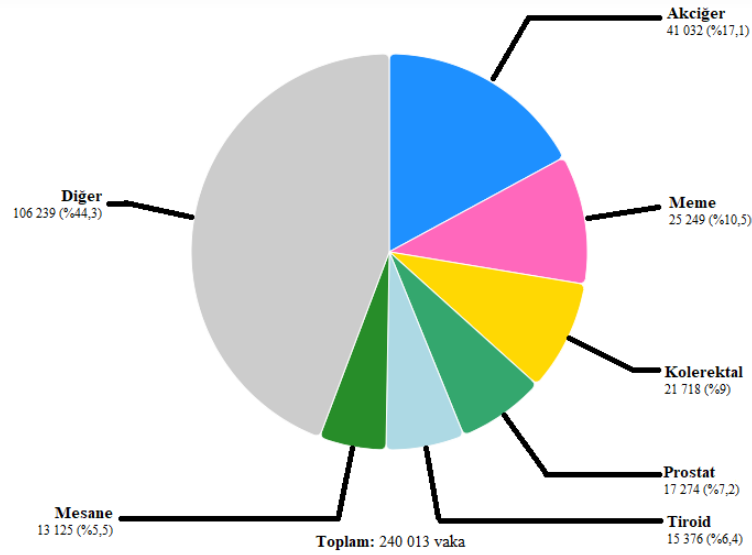
Şekil 1. Dünya genelinde kanser türlerinin A) görülme sıklığı ve B) ölüm oranları (GLOBCAN 2022).

Yaşa göre standartlaştırıldığında ve ölüm oranları incelendiğinde, erkeklerde en yüksek ölüm oranlarına sahip üç kanser türünün sırasıyla akciğer kanseri, mide kanseri

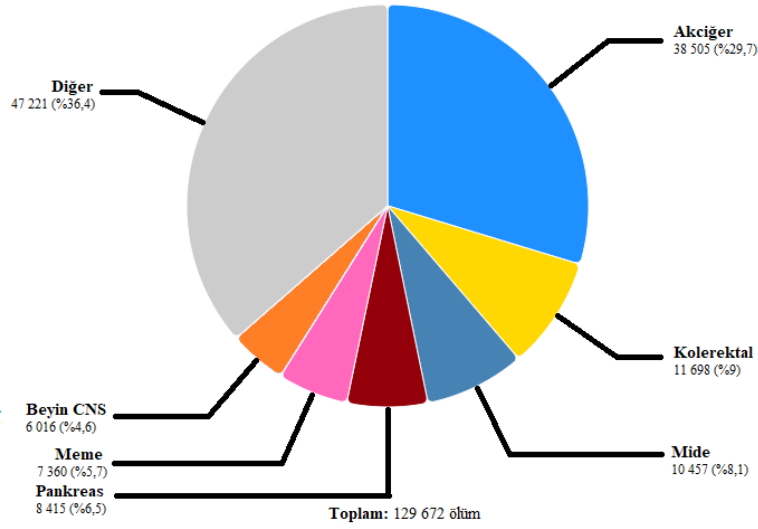
ve kolorektal kanser olduğu, kadınlarda ise en ölümcül kanser türlerinin meme kanseri, akciğer kanseri ve kolorektal kanser olarak sıralandığı gözlemlenmiştir (Bray ve ark, 2024).

GLOBCAN 2022 istatistiklerine göre, ülkemizde 240.013 yeni kanser vakası ve 129.672 kanser nedeni ölüm gerçekleşmiştir. Bu veriler, GLOBCAN2020 istatistikleri ile karşılaştırıldığında ülkemizde de dünya çapında olduğu gibi yeni kanser vakası ve ölüm oranlarında artış olduğunu göstermektedir. Türkiye'de gerçekleştirilen epidemiyolojik çalışmalara göre, en sık görülen kanser türleri arasında ilk sırada %17,1 oranıyla akciğer kanseri yer almaktadır. Akciğer kanserini sırasıyla meme kanseri (%10,5), kolorektal kanser (%9), prostat kanseri (%7,2), tiroid kanseri (%6,4) ve mesane kanseri (%5,5) izlemektedir. Kansere bağlı ölüm oranlarında ise akciğer kanseri %29,7 gibi yüksek bir oranla ilk sırada yer alırken, bunu kolorektal kanser (%9), mide kanseri (%8,1), pankreas kanseri (%6,5), meme kanseri (%5,7) ve beyin tümörleri (%4,6) takip etmektedir. Bu veriler, yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak, Türkiye'de kanser yükünün büyük bir kısmının akciğer kanseri ile sindirim sistemi kanserlerinden kaynaklandığını göstermektedir (Bray ve ark., 2024; Şekil 2).

A)



B)



Şekil 2. Türkiye’de kanser türlerinin A) görülme sıklığı ve B) ölüm oranları (GLOBCAN 2022).

Türkiye'deki kanser insidansı verilerine göre, erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer kanseri, prostat kanseri ve kolorektal kanserdir. Kadınlarda ise en sık teşhis edilen kanser türleri meme kanseri, akciğer kanseri ve kolorektal kanser olarak sıralanmaktadır. İstatistikler, kansere bağlı ölüm sayısının erkeklerde 82.446, kadınlarda ise 47.226 olduğunu ortaya koymaktadır (Bray ve ark., 2024; Bryne ve ark., 2023).

2.3. Kanser Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Kanser, hücresel fonksiyonların bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan kompleks bir biyolojik süreçtir. Bu durum, kromozomal veya moleküler düzeyde genetik dengesizliğe yol açan çeşitli anomalilerin birikmesi ile karakterize edilir. Kanser gelişiminde, hücre içi genetik ve epigenetik değişimlerin kademeli olarak birikmesi kritik bir rol oynar. Çevresel, eksojen ve endojen etkenlerin yanı sıra genetik yatkınlık da kanserin etiyolojisinde belirleyici faktörler arasındadır. Bu bağlamda, genetik yapı ve yaşam tarzı unsurları, kanser patogenezi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Lewandowska ve ark., 2019). Kanser oluşumuna etki eden faktörler genel olarak dış kaynaklı etmenler, iç kaynaklı hücre dışı etmenler ve iç kaynaklı hücre içi etmenler olarak üçe ayrılmaktadır (Weeden ve ark., 2023).

2.3.1. Kanser oluşumunu etkileyen dış kaynaklı faktörler

Kanser oluşumunda etkili olan dış kaynaklı faktörler büyük ölçüde modifiye edilebilir olup, enfeksiyon etkenleri, yaşam tarzı ve çeşitli çevresel maruziyetler gibi bireyin dış çevresi ile ilişkili unsurlardan oluşmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %35'i, düşük, orta ve yüksek gelirli ülkelerde sigara ve alkol tüketimi, enfeksiyonlar, paraziter hastalıklar ve ultraviyole radyasyona maruziyet gibi yaşam tarzına bağlı değiştirilebilir risk faktörlerine dayanmaktadır (Weeden vd., 2023).

2.3.1.1. Aile öyküsü

Aile öyküsü, çeşitli kanser türleri için iyi tanımlanmış ve önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu durum, ortak çevresel maruziyetlerin yanı sıra genetik bileşenleri de içermektedir. Kanser gelişimi ile aile öyküsüne bağlı olarak artan risk arasındaki korelasyon, birçok epidemiyolojik çalışma ile ortaya konmuştur. Pozitif aile öyküsü yalnızca kanser açısından değil, aynı zamanda çeşitli kronik hastalıklar için de bir risk faktörü olup, genetik yatkınlıkların, ortak çevresel etkenlerin ve benzer yaşam tarzı alışkanlıklarının bir sonucu olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, bireylerin aile öyküsü bilgilerinin sistematik olarak toplanması ve analiz edilmesi, hem önleyici tıp uygulamalarında değerli bir araç hem de genetik riskin belirlenmesinde kritik bir unsur olarak öne çıkmaktadır (Weeden ve ark., 2023).

Prostat kanseri tanısı almış bir erkek kardeşi veya babası bulunan bireylerde, aile öyküsü bulunmayan bireylere kıyasla prostat kanseri gelişme riski en az iki kat artmaktadır. Ayrıca, birinci derece akrabasında erken başlangıçlı (55 yaş ve öncesinde teşhis edilmiş) prostat kanseri öyküsü bulunan bireylerde bu risk üç ila beş kat daha yüksek olarak hesaplanmaktadır. Önceki epidemiyolojik çalışmalarda, 70 yaş altındaki erkeklerde görülen prostat kanseri vakalarının yaklaşık %34'ünün kalıtsal faktörlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Brook ve ark., 2023; Sabol ve ark., 2021).

Benzer şekilde, kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC) ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP) gibi genetik kökenli sendromlara sahip bireyler ile kolorektal kanser açısından pozitif aile öyküsüne sahip kişiler, bu maligniteyi

geliştirme açısından belirgin şekilde artmış risk altındadır. Kalıtsal kolorektal kanserler, tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Genel popülasyonda kolorektal kanser riski yaklaşık %6 iken, pozitif aile öyküsü bulunan bireylerde bu oran 2 ila 4 kat artış göstermektedir (Keivanlou ve ark., 2023).

Meme kanserinin ailelerde kümелendiği iyi bilinmekte olup, etkilenen birinci derece akrabaya sahip kadınlarda meme kanseri gelişme riski yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Aile öyküsü, meme kanseri açısından önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmekte olup, olasılık oranı 1,71 olarak hesaplanmıştır. Büyük ölçekli bir hasta kohortu ile gerçekleştirilen bir çalışmada, iki veya daha fazla akrabasında meme kanseri tanısı bulunan kadınların, meme kanseri geliştirme riskinin yaklaşık 2,5 kat arttığı gösterilmiştir (Mukama ve ark., 2021; Liu ve ark., 2021).

Bu veriler, prostat, kolorektal ve meme kanserleri gibi çeşitli malignitelerde aile öyküsünün güçlü bir risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır. Genetik yatkınlığın yanı sıra ortak çevresel faktörler ve benzer yaşam tarzı alışkanlıkları da bu artmış riskin oluşumunda rol oynamaktadır. Bu bağlamda, yüksek risk grubundaki bireylerin erken tanı ve önleyici sağlık taramalarına yönlendirilmesi, kanser insidansını azaltmada önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

2.3.1.2. Yaş

Yaş faktörü kötü huylu hastalıklar için en önemli etkenlerden biri olarak bilinmektedir. Kanser insidansı ve mortalitesi yaşla birlikte artmakta, prevalansı 85-90 yaş aralığında en yüksek değere ulaşmaktadır. Kanser ayrıca 60-79 yaş aralığındaki ölümlerin en önde gelen nedeni olarak da bilinmektedir. Takvim yılları ile ölçülen kronolojik yaş ile biyolojik testlerle ve klinik durumla ölçülen biyolojik yaş ayrımı, biyolojik olarak daha genç bireylerde daha düşük kanser riski ile ilişkilendirilmiştir. 60 yaş üzerindeki bireylerde invaziv kanser riskinin genç bireylere kıyasla yaklaşık 2 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir. Yaşlanma sürecinde genetik mutasyonlar ve epigenetik değişikliklerdeki artış ve bağışıklık sisteminin zayıflaması olarak bilinen immünoşenesens durumu kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca biyolojik yaş arttıkça DNA onarım mekanizmalarının etkinliği azalırken, hücresel hasarın ve inflamasyonun artması da tümör oluşumunu tetikleyebilmektedir. Bunun

yanında sigara, alkol, radyasyon ve karsinojenlere maruziyet süresinin artması da yaşa bağlı kanser riskini arttıran faktörler arasındadır (Bergengren ve ark., 2024).

2.3.1.3. Diyet ve obezite

Beslenme, kanser gelişimindeki önemli faktörlerden biri olarak bilinmektedir. Diyet hücrel büyüme sinyalleri, inflamasyon, otofaji ve DNA onarımı gibi mekanizmaları etkileyerek kanser riskini değiştirebilmektedir (Mishra ve ark., 2024). Diyetin yanı sıra obezite ve düşük fiziksel aktivite de kanserin değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer almaktadır (Papadimitriou ve ark., 2021). Dengesiz beslenme, bağırsak mikrobiyomunu bozarak kanserin yayılımını arttırabilmektedir (Qazi ve ark., 2024). Sağlıklı bir diyet, sebze, meyve, tam tahıllar, kuruyemişler ve omega-3 yağ asitlerini içerirken, şekerli içecekler, işlenmiş etler ve trans yağları sınırlandırmaktadır (Greathouse ve ark., 2022). Ayrıca meyve, sebze ve bunların mikro besini olan folatın tüketimi ağız ve yutak kanseri riskini azaltabilmektedir. Bunun yanında özellikle domateste bol miktarda bulunan likopen ve soya gıdalarında bulunan izoflavonlar ise prostat kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olarak bulunmuştur (Key ve ark., 2020).

Yanlış beslenme alışkanlıklarının kanser riskini arttırdığı bilinmektedir. İşlenmiş etler ve yüksek sıcaklıkta ya da kızartılarak pişirilmiş gıdalar kanserojen bileşikler içerebilmektedir. Ayrıca rafine şekerler insülin seviyelerini yükselterek inflamasyonu ve obeziteyi tetikleyebilmektedir. Obezitenin, Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserle ilişkili ölümlerin %14-20' sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, beslenme ve obezitenin kanser görülme sıklığı ve mortalite ile ilişkisini destekleyen kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Uluslararası kuruluşlar, gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin %30'unun beslenme ve obeziteye bağlı olduğunu belirtmektedir (Nencioni ve ark., 2018).

2.3.1.4. Sigara ve alkol kullanımı

Tütün kullanımı, en az 17 farklı kanser türüyle ilişkilendirilmiş olup, akciğer, ağız boşluğu, yutak, gırtlak, yemek borusu, pankreas, mesane, böbrek ve mide gibi birçok organın kanser riskini artırmaktadır. Sigara dumanı, en az 60'ı kanserojen olan 7000'den fazla kimyasal içerirken, özellikle benzo[a]piren ve aromatik aminler gibi

bileşiklerin kanser gelişiminde doğrudan rol oynadığı gösterilmiştir. Sigara içimi, oksidatif stres yoluyla DNA hasarına, genetik ve epigenetik değişikliklere yol açarak karsinogenezi tetiklemektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, ABD’de akciğer kanseri ölümlerinin %80’inin ve tüm kanser vakalarının %30’unun sigara kullanımına bağlı olduğunu göstermektedir. Özellikle *TP53* gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara neden olan sigara, baş ve boyun kanserleri, mesane ve pankreas kanserleri ile güçlü bir ilişki içindedir. Tütün kullanımının kanser üzerindeki etkileri 1950’lerden bu yana yapılan çalışmalarla açıkça ortaya konmuş, 1964’te yayımlanan Cerrah Genel Raporu ile sigaranın sağlık üzerindeki olumsuz etkileri toplum tarafından daha geniş kabul görmüştür. Mevcut bilimsel veriler, sigaranın erken ölümlere neden olan güçlü bir kanserojen olduğunu ve birçok kanser türünün etiyolojisinde rol oynadığını net bir şekilde ortaya koymaktadır (Sasco ve ark., 2004; Alexandrov ve ark., 2018; Caliri ve ark., 2021; Li, & Hecht 2022).

Sigara tüketiminin yanı sıra alkol tüketimi de kanser gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biri olup, 2021 yılında dünya çapında tüm kanser vakalarının %5,5’ine ve kansere bağlı ölümlerin %5,8’ine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Kronik ve yüksek oranda alkol tüketimi, karaciğer kanseri başta olmak üzere birçok malignitenin gelişiminde rol oynarken, özellikle asetaldehit olmak üzere alkolün metabolik yan ürünleri kanserojenik etkileriyle öne çıkmaktadır. Alkol, DNA metilasyon paternlerinde değişikliklere, epigenetik mekanizmaların bozulmasına ve artan reaktif oksijen türevleri aracılığıyla genetik hastalıklara neden olarak karsinogenezi tetiklemektedir. Ayrıca, alkol kullanımıyla birlikte tek karbon metabolizmasının bozulması, histon modifikasyonları ve mikroRNA düzenlemeleri gibi mekanizmaların bozulması alkol kaynaklı kanser riskini arttırmaktadır. Bu bağlamda alkolün yol açtığı epigenetik değişikliklerin belirlenmesinin, kanserin erken teşhisi, prognozu ve tedavisinde yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Ko ve ark., 2021; Fu ve ark., 2024; Floud ve ark., 2023; Calvert, Toomey, & Jones-Webb 2021; Dimitrescu, 2018).

2.3.1.5. Kimyasallara maruziyet ve çevre kirliliği

Çevresel maruziyetler kanserin etiyolojisinde önemli bir rol oynamakta ve hava kirliliği, pestisitler gibi kimyasallar ve Endokrin Bozucu Kimyasallar (EBK) gibi

faktörler kanser riskini arttırmaktadır. Kanserlerin %70-90' ının çevresel faktörlerle ilişkili olduğu ve hava kirliliğinin bu çevresel faktörlerin en ön planda olanlardan biri olduğu kabul edilmektedir (Ou ve ark., 2021). Kanserle ilgili ölümlerin ise %16'sının çevresel faktörlere atfedildiği ve bunların %36'sının ise akciğer kanseri ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir (Martinez ve ark., 2020).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, bazı pestisitleri kanserojen olarak sınıflandırmış, bunun yanında yapılan epidemiyolojik çalışmalar, özellikle pestisit maruziyeti ve insan kanserleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Pestisitlerin kanseri tetikleme mekanizmaları tam olarak bilinmemekte ancak oksidatif stres, DNA hasarı, apoptoz mekanizmaları ve epigenetik değişikliklerin bu süreçte rol oynadığı düşünülmektedir (Ataei, & Abdollahi, 2022). Bununla birlikte, tarımsal ürünlerin yetiştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir mantar ilacı olan tiyabendazolün genel toksisite, üreme toksisitesi, immünotoksisitesi ve kanserojen etkiler gibi toksik etkileri bulunmaktadır ve bu toksik etkilerin karaciğer hasarı ve kansere neden olabileceği düşünülmektedir. Ancak tiyabendazolün kanserojen etkilerinin olup olmadığını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (He ve ark., 2024). Ayrıca, Poliklorlu bifeniller, difenil eterler, ağır metaller ve dioksinler gibi sanayide kullanılan birçok kimyasalın tiroid kanseri gibi kanserlerle ilişkisi olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Marotta ve ark., 2020).

EBK'ler plastikler, endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve ağır metaller gibi çeşitli çevresel bileşikleri içermekte ve bu grup kimyasalların kanser gelişiminde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bu kimyasallardan biri olan dietilstilbestrol (DES) maruziyetinin, genç kadınlarda nadir görülen bir kanser türü olan vajinal berrak hücreli adenokarsinom riskini arttırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde per-polifloroakril maddeler (PFAS) olarak bilinen ve yapışmaz mutfak gereçleri, tekstil ve yangın söndürme tüpleri dahil olmak üzere birçok endüstriyel ve ticari alanda kullanılan kimyasalların tiroid, prostat ve meme kanseri gibi hormon ilişkili kanserler ile ilişkisi olabileceği literatürde belirtilmiştir (Modica, Benevento, & Colao, 2022; Sezavar ve ark., 2024).

2.3.1.6. Ultraviyole ve iyonize radyasyon

Ultraviyole radyasyonun (UVR), melanom başta olmak üzere cilt kanserleri için bilinen ve önemli bir risk faktörüdür. 290-320 nm dalga boyuna sahip olan UV-B maruziyeti DNA' da primidin dimerlerine yol açarak doğrudan veya dolaylı olarak DNA hasarına neden olmaktadır. Özellikle solaryum aracılığı ile bronzlaşma ve uzun süre güneşe maruz kalmanın melanom dışı cilt kanserlerinin insidansını arttırdığı bilinmektedir (Chang ve ark., 2022). İyonize radyasyon (IR) ise mide ve kolon kanserleri dahil olmak üzere çeşitli solid kanserler için belirlenmiş bir risk faktörüdür. Hiroşima ve Nagazaki atom bombalarına maruz kalan bireylerde maruz kaldıkları iyonize radyasyon sebebiyle mide ve kolon kanserlerinin insidansının arttığı ve bu bireylerde tümörle ilişkili stromal hücrelerde değişimler ve DNA' larında çift sarmal kırıkları ile ilişkili farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca bu grupta görülen meme kanseri vakalarında genomik instabilite, daha yüksek histolojik derece ve artmış kopya sayısı değişiklikleri tespit edilmiştir (Bockwoldt ve ark., 2021). Ayrıca özellikle çocukluk çağında maruz kalındığında papiller tiroid kanseri (PTC) için oldukça güçlü bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Çernobil nükleer santral kazası sonrasında radyoaktif iyot-131 (I-131) maruziyeti nedeniyle çocuklardaki PTC insidansında belirgin bir artış gözlenmiş ve bu durum I-131 dozu ve RET/PTC ve ETV6-NTRK3 füzyonları gibi mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Efanov ve ark., 2018). Bununla birlikte, nükleer endüstri çalışanları üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar ve meta-analizler, düşük doz IR maruziyetinin kronik lenfositik lösemi (KLL) dışındaki tüm kanserlerde artmış ölüm riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Freidman- Jimenez ve ark., 2022).

2.3.1.7. Viral ve bakteriyel enfeksiyonlar

İnsan kanserlerinin yaklaşık %12-15'i viral enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Günümüzde, Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü (KSHV/HHV-8), Epstein-Barr virüsü (EBV), insan papilloma virüsü (HPV), hepatit B ve C virüsleri (HBV, HCV), insan T hücreli lenfotropik virüs tip 1 (HTLV-1) ve Merkel hücreli polioma virüsü (MCV) olmak üzere kanserler ile ilişkili yedi onkogenik virüs tanımlanmıştır (White, Wu, & Damania, 2022). Bu virüsler lenfomalar, karaciğer kanseri, mide kanseri, baş ve boyun kanserleri ile cilt kanseri gibi birçok maligniteyle ilişkilendirilmiştir.

Onkogenik virüsler, hücre genomuna entegre olarak veya hücresel düzenleyici proteinleri etkileyerek kanser sürecine katkıda bulunabilmektedirler (Bhattacharjee ve ark., 2022). Ayrıca viral enfeksiyonların kanser gelişimine katkısı, viral gen ürünlerinin hücresel metabolizmayı yeniden programlama yeteneğiyle de ilişkilidir. Özellikle herpes virüslerde, latent enfeksiyon sırasında viral DNA replikasyonunu destekleyen mekanizmaların hücre çoğalmasını teşvik edebileceği öne sürülmüştür. Bu süreç bağışıklık sistemi tarafından kontrol edilemediğinde malignite gelişimini kolaylaştırabilmektedir (Purdy, & Luftig, 2020). Bununla birlikte, onkogenik virüslerin bölgesel yaygınlığı ve kanser üzerindeki etkileri değişkenlik gösterdiğinden, coğrafi faktörler de viral kanser epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (Nahand ve ark., 2021).

Bakteriyel enfeksiyonlar da onkogeneze önemli bir rol oynamaktadır. *Helicobacter pylori*, *Salmonella Typhi*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter jejuni* ve *Chlamydia* türleri gibi patojenlerin kronik inflamasyon yoluyla kanser gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (Upadhyay, Pal, & Kumar, 2023). Mikrobiyal enfeksiyonların dünya çapında kanser vakalarının yaklaşık %20'sine neden olduğu bildirilmiştir (Eyvazi ve ark., 2020). Bunlardan özellikle *H. pylori* enfeksiyonunun, inflamasyon aracılığı ile DNA hasarının artmasına yol açarak mide kanserine neden olabileceği bilinmektedir (Chen, Zhang, & Ma, 2021). Bakteriyel enfeksiyonların kronik inflamasyonu tetiklemesi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarının artışı, E-kadherin kaybı ve STAT3 aktivasyonunun indüklenmesi gibi mekanizmalar yoluyla kanserin gelişimini teşvik edebileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, bakterilerin ürettiği toksinlerin konak hücrelerde DNA hasarına neden olarak ve p53 geninde mutasyonlar aracılığıyla gen fonksiyonunu değiştirdiği ve bu fonksiyon değişikliğinin WNT sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna sebep olarak karsinogeneze katkı sağladığı bildirilmiştir (Upadhyay ve ark., 2023).

2.3.2. Kanser oluşumunu etkileyen iç kaynaklı faktörler

2.3.2.1. Hücre içi iç kaynaklı faktörler

2.3.2.1.1. Onkogenlerin aktivasyonu

Proto-onkogenler, kanserleşme potansiyeli olan ve normal hücre fonksiyonlarını

düzenleyen proteinleri kodlayan genler olarak bilinmektedir. Bu proteinler arasında transkripsiyon faktörleri, kromatin yeniden düzenleyiciler ve büyüme faktörleri bulunmaktadır. Proto-onkogenlerin onkogenlere aktivasyonu, kromozomal translokasyonlar, mutasyonlar ve gen amplifikasyonları gibi genetik değişikliklerle veya gen promotörlerinin hipo-metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlarla gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler, hücrelerin kontrolsüz büyümesine, üremesine ve artan sağkalım oranına yol açarak kanser gelişimini tetiklemektedir. Translokasyonlar ve mutasyonlar tümör gelişiminin erken evrelerinde sıkça görülmektedir. Gen amplifikasyonları ise tümör gelişiminin daha geç evrelerinde görülmektedir (Botezatu ve ark., 2016; Lockwood ve ark., 2008). Kronik miyeloid lösemi ile ilişkisi olduğu bilinen *BCR-ABL* füzyonu en iyi anlaşılan gen füzyonlarından biridir ve hastalığın seyrinde ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Roskoski Jr, 2022; El-Tanani ve ark., 2024). Ayrıca prostat kanseri hücrelerinde görülen *TMPRSS2* ve *ERG/ETV1* gibi transkripsiyon faktörlerinin füzyonlarının kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ve apoptozu engellediği bilinmektedir (Stopsack ve ark., 2023; Kong ve ark., 2020). Bununla birlikte, *K-RAS* gibi onkogenler *NF-κB* gen aktivasyonuna sebep olarak kanser gelişimine katkı sağlamaktadır (Staudt, 2010).

2.3.2.1.2. Tümör supresor inaktivasyonu

Onkogenlerin yanı sıra tümör supresor genler (TSG'ler) de kanserin temel genetik ve epigenetik mekanizmalarından sorumludur. Genellikle çekinik gen kara kterinde olan ve tümör oluşturmak için iki allelin de inaktivasyonunu gerektiren TSG' ler hücrel homeostazın sağlanmasında, DNA hasar onarımında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve apoptoz mekanizmasının devamlılığının sağlanmasında görev almaktadır (Jia, & Zhao, 2019). Ancak bazı TSG'ler, iki kopyaya ihtiyaç duyan bir mekanizmayla çalışarak doza duyarlı bir şekilde işlev kaybına neden olabilmektedir. TSG olan *p53*, genetik bozulmaları tespit ederek hücre döngüsünü durdurulması veya apoptozun indüklenmesi gibi mekanizmalarla tümör oluşumunu engellemektedir ve *p53* 'ün insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğradığı bulunmuştur (Sherr, 2004). Ayrıca Retinoblastoma (*RB*), Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü-2 (*CDKN2*), Meme Kanseri Geni 1 ve 2 (*BRCA1-2*) ve Fosfataz ve Tensin Homolog (*PTEN*) gibi diğer TSG'ler de hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde ve DNA

hasarının onarımında önemli rol oynamaktadır. Özellikle prostat kanserinin ileri evrelerinde *RB* ve *CDKN2* genlerinin inaktive edildiği ve bu gen inaktivasyonunun metastatik fenotipin gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (MacGrogan, & Bookstein, 1997).

TSG'lerin inaktivasyonu gen mutasyonları, kromozomal delesyonlar, promotor hipermetilasyonu gibi epigenetik değişiklikler ve transkripsiyon sonrası düzenleyici mekanizmalar gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir. TGS'lerin epigenetik yollarla inaktivasyonu genellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (Wang ve ark., 2019). Sonuç olarak TSG inaktivasyonu kanser gelişimindeki önemli genetik mekanizmalardan birini oluşturmakta olup, onkogen aktivasyonu ile etkileşimi tümör oluşumu sırasında kanser biyolojisini ve klinik seyri belirlemektedir (Sherr, 2004; Wang ve ark., 2019).

2.3.2.1.3. DNA mutasyonları ve DNA tamir mekanizmaları

DNA mutasyonları, çevresel etkenler, genetik faktörler ve hücresel süreçler sonucunda meydana gelebilmektedir. Somatik mutasyonlar bireyin yaşam döngüsü boyunca ortaya çıkmakta ve mutasyona uğramış hücrelerin bölünmesiyle yavru hücrelere aktarılabilir. Bu somatik mutasyonlar kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Germ hücrelerinde meydana gelen ve nesiller boyu aktarılan germ hattı mutasyonlarından farklı olarak somatik mutasyonların oluşumunda özellikle UV radyasyon ve bazı belirli kimyasallar olmak üzere çevresel faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Kanserlerin yaklaşık %90'ı somatik mutasyonlar ve çevresel faktörlerden kaynaklanırken az bir kısmı germ hattı mutasyonlarıyla ilişkilidir. Kanser genomlarındaki mutasyonlar, DNA replikasyon hataları, eksojen ve endojen mutasyon etkenleri, kusurlu DNA onarımı veya DNA'nın enzimatik modifikasyonları sonucu oluşabilmektedir ve bu süreçler kanser türleri arasında değişkenlik göstermektedir. Bu süreçlere örnek olarak, cilt kanserleri genellikle UV radyasyonu maruziyetiyle, akciğer kanseri tütün tüketimiyle ve bazı kolorektal kanserler ise hatalı DNA uyumsuzluk onarımı ile ilişkilendirilmiştir (Paul, Malakar, & Chakraborty, 2019).

İnsan Genom Projesi'nin tamamlanması, kanser gibi hastalıkların genetik

temellerinin anlaşılmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Günümüzde, yaklaşık 100 genin mutasyonunun kalıtsal kanser sendromlarıyla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Lynch Sendromu'nda MLH1 ve MSH2 genleri, ailesel adenomatöz polipozda APC geni ve kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromunda BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları bulunmaktadır. Bununla birlikte Yeni Nesil Dizileme (NGS) yönteminin geliştirilmesinden sonra yapılan çalışmalar, kanserlerde neoplazmik süreçlere katkıda bulunduğu düşünülen ve somatik mutasyona uğramış yaklaşık 400 genin belirlenmesini sağlamıştır (Peltomaki, 2012; Ragone ve ark. 2024).

DNA mutasyonlarının yanında, DNA hasar onarımı da kanser biyolojisinde önemli bir araştırma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu DNA hasar onarımı mekanizmaları arasında uyumsuzluk onarımı, rekombinasyon onarımı ve eksizyon onarımı yer almaktadır. Bununla birlikte, DNA tamir mekanizmasında rol oynayan O6-metilguanin DNA metiltransferaz (*MGMT*) geni gibi bazı genler de bulunmaktadır. *MGMT* geni DNA onarım kapasitesini etkileyerek kanser gelişiminde rol oynayan bir mekanizmaya sahiptir. *MGMT* proteininin azalması bazı kanser türlerinde görülmektedir. Ayrıca *MGMT* aktivitesinden tamamen yoksun tümör hücre hatlarının, kemoterapiye daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Esteller, & Herman, 2024; Huang, & Zhou, 2021).

2.3.2.2. Hücre dışı iç kaynaklı faktörler

2.3.2.2.1. Bağışıklık sistemi ve immün yanıt

Kanser gelişiminin, bağışıklık sistemiyle karmaşık bir etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir. Tümör mikro çevresi, kanser hücreleri ve bunları çevreleyen bağışıklık hücrelerinden oluşmaktadır. Bu hücreler, sitokinler aracılığıyla iletişim kurarak tümör büyümesini şekillendirmektedir ve tümörün bağışıklık tepkisine verdiği yanıt, bu hücrelerin dengesine bağlı olarak değişmektedir. IL-2 gibi Th1 tipi sitokiller bağışıklık yanıtını güçlendirirken, IL-10 gibi Th2 tipi sitokinler bu yanıtın zayıflamasına neden olabilmektedir (Loose, & Van de Wiele, 2009; Grivennikov, Greten, & Karin 2011). Bununla birlikte, kronik inflamasyon, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin tümöre infiltrasyonu ve anjiyogenezi tetikleyerek kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Özellikle makrofajlar, mast hücreleri ve

nötrofiller gibi bağışıklığı düzenleyen hücrelerin tümör mikro çevresinde fazla miktarda oluşu kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (Prestwich ve ark., 2008). Sonuç olarak, bağışıklık sistemi ve immün yanıt kanser gelişimi için hem koruyucu hem de teşvik edici olmak üzere ikili bir rol oynamaktadır (Barbosa ve ark., 2021).

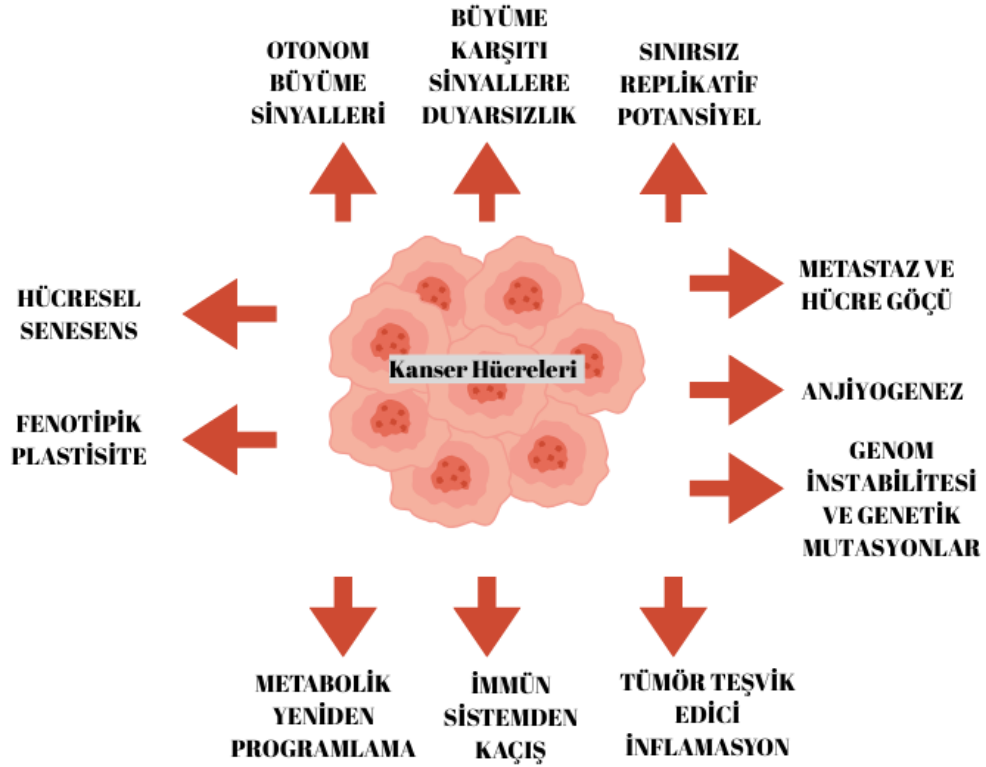
2.3.2.2.2. Aktifleştirici enzimler

Kanser gelişiminin, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan karmaşık bir süreç olduğu bilinmektedir. Kimyasal karsinojenler, hücresel makromoleküllerle etkileşime girerek kanser oluşumunu başlatabilmektedir. Ancak, karsinojenik kimyasalların çoğu biyolojik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duymaktadır. Sitokrom-P-450 (CYP) gibi oksidatif enzimler (Faz 1 enzimleri) metabolizmayı sağlarken, glutatyon S-transferanslar (GST) ve N-asetiltransferanslar (NAT) gibi konjugasyon enzimleri (Faz 2 enzimleri) ise detoksifikasyon süreçlerinde görev almaktadır. CYP enziminde görülen polimorfizmler tütün dumanına bağlı akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiştir (Raunio ve ark., 1995).

Kanser ile ilişkili diğer bir enzim olan telomeraz enzimi normal somatik hücrelerde sınırlı aktiviteye sahipken, kanser hücrelerindeki aşırı aktivasyonu sınırsız bölünme potansiyeline yol açmaktadır. Kanser vakalarının %85'inde telomeraz, geri kalan %15' lik kısımda ise alternatif telomer uzatma (ALT) mekanizmasının etkin olduğu bilinmektedir. Bu yüzden telomeraz enzimi, kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak değerlendirilmekte ve inhibisyonuna yönelik çalışmalar günümüzde de devam etmektedir (Claude, & Decottignies, 2020; Zvereva, Shcherbakova, & Dontsova, 2010). Aktifleştirici enzimlere bir diğer örnek olan glikoziltransferazlar tarafından gerçekleştirilen O-glikolizasyon, kanser biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca N-asetilgalaktozaminiltransferaz (*GALNT*) gen mutasyonları da melanom, yumurtalık ve mesane kanserleri ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte GalNAcT1 enziminin aşırı aktivasyonu, hepatoselüler karsinomda EGFR'ye O glikan eklenmesini arttırarak tümör hücrelerinin göçünü kolaylaştırmaktadır (Husain, Hoessli, & Fang, 2016).

2.4. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

Kanser, insan hücrelerinin neoplastik büyümeye ilerlerken kazandıkları işlevsel yeteneklerle tanımlanmaktadır. Hanahan ve Weinberg 2000 yılında yayınladıkları bir çalışmada otonom büyüme sinyallerinin varlığı, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kaçış, metastaz ve invazyon, sınırsız replikatif potansiyel ve anjiyogenez olmak üzere kanser hücrelerinin 6 temel yeteneğini belirtmişlerdir. Daha sonra 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında bu karakteristik özelliklere genom instabilitesi, tümör uyarıcı inflamasyon, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün sistemden kaçış olmak üzere yeni 4 karakteristik özellik ve en nihayetinde 2022 yılında yayınladıkları makalelerinde ise fenotipik plastisite, epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyomlar ve hücresel senens olmak üzere 4 yeni karakteristik daha eklemişlerdir (Hanahan, & Weinberg, 2000, 2011; Hanahan, 2022; Şekil 3). Ayrıca tümör hücrelerinin hayatta kalmasına katkısı bulunan değişmiş stres tepkisi de kanser karakteristiklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmalar baz alındığında başlangıçta kanser karakteristiklerinin yalnızca tümör dokusu ve hücreleri ile ilişkili olduğu düşünülmekteydi. Ancak, daha sonraki çalışmalar kanser karakteristiklerinin yalnızca tümör dokusu ve hücreleriyle ilgili olmadığını, aynı zamanda tümör mikroçevresi (TME) ile de ilişkisi olduğunu açığa çıkarmıştır. (Fauad, & Aanei, 2017).



Şekil 3. Kanser hücrelerinin genel özellikleri (Hanahan, & Weinberg, 2022).

2.4.1. Otonom büyüme sinyallerinin varlığı

Normal ve sağlıklı hücrelerde kanser büyümesi ve çoğalması büyüme sinyallerine dayanmaktadır ve bu sinyaller hücre dışı matriks bileşenleri, yayılabilir büyüme faktörleri ve hücre- hücre etkileşimleri gibi farklı moleküler mekanizmalar aracılığıyla hücre yüzeyindeki transmembran reseptörlerine iletilmektedir. Normal hücrelerde kontrolsüz çoğalmanın önüne geçmek amacıyla bu mekanizmalar sıkı bir şekilde denetlenmekte ve kontrol altında tutulacak şekilde düzenlenmektedir. Kanser hücrelerinde ise bu mekanizmalar bozulmakta ve onkogenler normal hücrelerdeki büyüme sinyallerini taklit ederek kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır (Hanahan, & Weinberg, 2000). Ayrıca kanser hücreleri, hücre yüzey reseptörlerini aşırı ifade ederek büyüme sinyallerine tepkilerini arttırabilmektedir. Beyin ve meme tümörlerinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Bununla birlikte HER2 reseptörünün meme ve mide kanserleri başta olmak üzere çeşitli kanserlerde yüksek düzeylerde aktive olduğu bulunmuştur (Hynes, & Lane, 2005). Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını kontrol eden sinyal yollarındaki bozulmalar, genetik değişikliklerden de kaynaklanabilmektedir ve

büyüme ligandlarını aşırı üretimi kanser hücreleri tarafından parakrin ve otokrin mekanizmalarla çoğalma sinyalleri olarak iletilmektedir (Bierie, & Moses, 2006). Bu mekanizmalara örnek olarak transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) verilebilir. Normal hücrelerde TGF- β , anti büyüme tepkisine neden olmaktadır ancak, tümör hücrelerinde farklılaşma ve hücre çoğalmasını tetikleyerek kanser progresyonunu desteklemektedir (Thakur ve ark., 2009). Kanser hücreleri, gen amplifikasyonları, somatik mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar gibi mekanizmalarla büyüme sinyallerini kontrol eden reseptörleri değiştirebilmektedir. Bu süreçlerin büyük bir kısmı kanser hücrelerinin hayatta kalmasında rol oynayan sinyal yolları tarafından kontrol edilmektedir. Bu sinyal ağlarının merkezinde bulunan RAS proteini özellikle pankreas karsinomlarının %90'ında olmak üzere tüm kanserlerin %30'unda kronik olarak aktive olmaktadır. RAS proteini, çeşitli mutasyonlar aracılığıyla sürekli aktif hale gelmekte ve hücre üremesi ve büyümesini tetiklemektedir (Cox, & Der, 2010). Sonuç olarak kanser hücrelerinde büyüme sinyallerinin bozulması, kanserlerin büyük kısmında temel rol oynamaktadır.

2.4.2. Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık

Kanser hücrelerinin çoğalmasını kontrol eden büyüme ve anti-büyüme sinyalleri, hücrel homeostazın korunmasında önemli rol oynamaktadır ve bu sinyallerin bozulması kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını sağlayarak kanser progresyonunu etkilemektedir. Bu sinyaller, hücre döngüsünü düzenleyerek G0 fazına geçişi ve mitoz sonrası farklılaşmayı teşvik etmektedir. Hücre döngüsünün G1 fazında ise pRb ilişkili proteinler E2F gibi transkripsiyon faktörlerini baskılayarak hücre çoğalmasını kontrol etmektedir. Bu mekanizmanın devamlılığını sağlayan reseptörlerin kaybı ya da TGF- β sinyal yolundaki mutasyonlar bu kontrolün kaybına neden olabilmektedir. TGF- β sağlıklı hücrelerde CDK inhibitörlerinin aktivitesini arttırarak G1 ilerlemesini engellemektedir ancak, kanser hücrelerinde TGF- β 'nin bu işlevi kaybolabilmekte veya kanser sürecinde tümör büyümesini destekleyici hale gelebilmektedir. Bununla birlikte farklılaşmanın baskılanması da kanserleşme sürecine katkı sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde c-myc' nin aşırı ekspresyonu ile farklılaşmayı indükleyen Mad-Max transkripsiyon faktörü kompleksleri engellenmekte ve hücreler proliferatif durumda tutulmaktadır. Spesifik olarak kolon kanserinde ise bu etki, APC/ β -katenin yolunun bozulması aracılığı ile

gerçekleşmektedir. HPV kaynaklı kanserlerde ise E7 proteini pRB'yi bağlayıp işlevsiz hale getirerek bu proteinin hücre döngüsü baskılayıcı işlevini devre dışı bırakmaktadır ve böylece kanser hücreleri kontrolsüz şekilde bölünmeye devam etmektedir. Ayrıca oral skuamöz hücreli karsinomda (OSCC), uzun kodlamayan RNA'lar ve kanser belirteçleri arasındaki etkileşimler büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlığı arttırarak tümör gelişimini etkilemektedir (Hanahan, & Weinberg, 2000, 2011; Lin ve ark., 2020; Preverskaya, Skryma, & Shuba, 2010).

2.4.3. Programlı hücre ölümünden (apoptozis) kaçış

Apoptozis hücrelerin ve dokuların homeostazı için önemli bir programlı hücre ölümü mekanizması olarak bilinmektedir. Bu süreç, dokuları oluşturan hücrelerin strese veya nükleik asitlerinde oluşabilecek geri dönüşümsüz bir genetik hasara yanıt olarak kendilerini ortadan kaldırmalarını sağlayarak doku bütünlüğünü korumaktadır. Apoptozis sürecinde, kaspaz enzimleri görev almaktadır. Bu süreç kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonu ile tetiklenmekte ve kaspaz-3, kaspaz-7 gibi infazcı kaspazların proteolitik yıkım ile aktivasyonu aracılığıyla hücre yapısının parçalanmasıyla sonuçlanmaktadır. Apoptoz temel olarak mitokondriyal yol (içsel yol) ve reseptör aracılığıyla yol (dışsal yol) olmak üzere iki yolla düzenlenmektedir. Mitokondriyal apoptoz yolu, B hücreli lenfoma-2 (BCL-2) ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Bu yolda, hücreye ölüm sinyali gönderildiğinde mitokondriyal zarın geçirgenliği artmakta ve bu durum da pro-apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınmasını ve sonunda apoptozom kompleksinin oluşmasını sağlamaktadır. Apoptozom kompleksi, kaspaz-9'u aktive ederek infazcı kaspazların aktivasyonunu ve hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlamaktadır. Reseptör aracılığıyla yol ise hücre dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlatılmaktadır. Hücre dışından gelen bu ölüm sinyalleri FAS (CD95) reseptörü, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü, TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) reseptörü gibi hücre zarında lokalize olan hücre ölüm ligandlarına bağlanmakta ve onları aktive etmektedir. Hücre ölüm reseptörlerine ligand bağlanmasından sonra, Fas ilişkili ölüm alanı (FADD) adı verilen adaptör moleküller reseptörler tarafından çağırılmakta ve bu adaptör moleküller ölüm indükleyen sinyalizasyon kompleksi (DISC) adı verilen bir kompleksin oluşumunu tetiklemektedir. DISC kompleksi kaspaz-8 proteinlerinin efektör kaspazlarını proteolitik olarak kesmesini sağlamak ve bu efektör kaspazların aktif forma

geçmesini sağlamaktadır. Bu sürecin sonunda da hücre ölümü gerçekleşmektedir (Fernald, & Kurokawa, 2013; Vo, & Letai, 2013; Diepstraten ve ark., 2021).

Kanser hücreleri, anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinlerinin aşırı ekspresyonu ya da stabilize edilmesi veya pro-apoptotik proteinlerin inhibisyonu gibi mekanizmalarla apoptozis yollarını devre dışı bırakarak hayatta kalma stratejisi geliştirmişlerdir (Lopez ve ark., 2022). Ayrıca kanser hücreleri, kanser hücrelerinde artan aerobik glikoliz nedeniyle bu hücrelerin hayatta kalmasını ve metastaz yapmasını sağlayan metabolik bir değişiklik olan Warburg etkisi aracılığı ile de apoptozu kontrol edebilmektedir. Bu metabolik değişiklik, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmalarını desteklemektedir. Bununla birlikte kanser hücrelerinin, *p53* ve *BRCA1/2* gibi tümör baskılayıcı genleri inaktive ederek hücre ölümüne karşı direnci arttırdıkları ve bunun da tedavi direncine neden olduğu bilinmektedir (Matsuura ve ark., 2016; Campbell, & Leung, 2021).

2.4.4. Sınırsız replikatif potansiyel

Kromozomların uçlarında replikasyon sırasında ve sonrasında genetik materyalin stabilitesini sağlayan, tekrarlayan DNA dizilerinden ve özel proteinlerden oluşan telomer adı verilen yapılar bulunmaktadır. Telomerler her hücre bölünmesinde kısalmaktadır ve bu durum, hücre yaşlanması hatta hücre ölümü (apoptozis) ile sonuçlanabilmektedir (Cohen, 2024).

Normal insan hücrelerinde telomerler, 10 ila 15 kb uzunluğunda olup, TTAGGG baz dizisi tekrarlarından oluşan 3'uçta bulunan tek zincirli bir çıkıntı ile sonlanmaktadır. Bu 3'uçtaki çıkıntı shelterin kompleksi aracılığıyla telomerik DNA'ya geri katlanarak telomerlerin hasarlı DNA bölgeleri olarak tanınmasını engellemekte ve telomer uzunluğunun korunmasını sağlamaktadır. Telomer uzunluğunun kritik seviyelere ulaşması hücre döngüsünün durması olarak bilinen replikatif senesense neden olmaktadır. Telomerlerin kısalmasının engellenmesinde telomeraz adı verilen enzimler rol oynamaktadır. Bu enzimler bütün hücrelerde bulunmasına rağmen yalnızca germ hattı hücrelerinde, bağışıklık hücrelerinde, bazı kök hücrelerinde ve kanser hücrelerinde aktif formda bulunmaktadır. Telomeraz enzimleri temelde telomeraz ters transkriptaz (TERT) ve telomeraz RNA bileşeni (TERC) olmak üzere

iki bileşenden oluşmaktadır. Ayrıca, telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinde kritik bir rolü bulunan telomerik tekrarlar içeren RNA (TERRA)'lar da telomerlerin bakımında ve homeostazında rol oynamaktadır (Gala, & Hattar, 2021).

Kanser hücreleri, telomeraz aktivitelerini arttırarak veya alternatif telomer uzunluğu (ALT) mekanizmaları aracılığıyla telomer kısalmasını engellemekte ve böylelikle sınırsız replikatif özellik kazanmaktadır (Cohen, 2024). İnsan TERT (hTERT) genindeki mutasyonlar telomeraz aktivitesinin artmasına ve kanser hücrelerinde sınırsız replikatif yeteneğe neden olmaktadır. Özellikle glioblastomalar olmak üzere birçok kanser tipinde hTERT mutasyonları sıkça görülen önemli bir özellik olarak bilinmektedir. HTERT ekspresyonu, onkogenik faktörler ve tümör baskılayıcı proteinler tarafından düzenlenmektedir ve bu gen ekspresyonu artışı kanser hücrelerinin büyümesini ve karsinogenez sürecini desteklemektedir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, artmış hTERT ekspresyonu olan hücrelerde telomer stabilitesini sağlamakta FTSJ3 adı verilen bir RNA metiltransferazın rolünün oldukça önemli olduğu bulunmuştur. FTSJ3, TERRA' nın metilasyonunu düzenlemekte ve bu şekilde heterokromatin stabilizasyonunu sağlamaktadır. FTSJ3' teki herhangi bir kayıp bu stabilizasyonun bozulmasına sebep olacağından kanserleşme sürecine de katkıda bulunmaktadır. Özetle kanser hücrelerindeki sınırsız replikatif yeteneğin temelinde telomeraz enzimi bulunmaktadır. Dolayısıyla telomeraz enzim inhibisyonunun, kanser tedavisinin geliştirilmesinde iyi bir strateji olabileceği düşünülmektedir (Taheri ve ark., 2022; Price ve ark., 2025).

2.4.5. Metastaz ve hücre göçü

Kanser hücreleri, tümör dokusunun çevresindeki dokulara göç etme (invazyon) ve uzak dokulara metastaz yapma özellikleri ile bilinmektedir. Kanser nedenli ölümlerin yaklaşık %90'ından fazlasının metastatik hastalıktan kaynaklanmaktadır. Metastatik süreç, tümör hücrelerinin ekstraselüler matriksinin (ECM) bozulması aracılığıyla çevre hücre ve dokulara invazyonu, dolaşım sistemine intravazasyonu, dolaşım sisteminde kanser hücrelerinin sağkalımı, uzak doku ve organlara ekstravazasyonu ve sonucunda da kolonizasyonu olmak üzere 5 aşamada gerçekleşmektedir. Son aşama olan kolonizasyon, makrometastaz oluşumu için hız sınırlayıcı ve oldukça kritik bir aşama olarak bilinmektedir. Metastaz sürecinin bu aşamalarında epitel hücrelerin

mezenkimal fenotip kazanarak invazyon yeteneği kazanmasını sağlayan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) oldukça önemli bir role sahiptir. EMT süreci büyüme faktörleri, hipoksi, bazı sinyal yolları ve mekanik stres gibi faktörlerle indüklenebilmektedir. EMT'nin kontrolünü sağlayan transkripsiyon faktörleri hücrelerde epitel özellik sağlayan genleri inaktive ederken mezenkimal özellik sağlayan genleri aktive etmektedir (Fouad, & Aanei,2017; Yenmiş ve ark., 2021).

Hem invazyon hem de metastaz süreçlerinde özellikle MMP-2 ve MMP-9 gibi matris metalloproteinazlar (MMP'ler), kanser hücrelerinin hareketliliğinin artmasına ve ECM' yi bozmalarına destek olmaktadır. Bu süreçte özellikle nükleer faktör kappa B (NF-κB), interlökinler, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve MMP'lerin aşırı ekspresyonuna katkıda bulunarak invazyon ve metastazda rol oynamaktadır (Yenmiş ve ark., 2021). TME, kanser ilişkili fibroblastlar (CAF'lar) ve M2 makrofajları tümör invazyonunu kolaylaştırabilen bazı faktörleri salgılayabilmektedir. Bunlardan TGF-β, EMT aracılığı ile invazyonu artırırken, eksozomlar vasküler geçirgenliği arttırarak tümör hücrelerinin damar içine girişini kolaylaştırmaktadır. Nötrofiller ise, hipoksiye bağlı olarak CXCL12/ CXCR4 aracılığıyla intravazyonu desteklemektedir (Majidpoor, & Murtazae, 2021).

2.4.6. Anjiyogenez

Anjiyogenez süreci hem fizyolojik hem de patolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır. Embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve kadınlarda üreme döngüsü gibi normal fizyolojik olaylarda kontrollü bir şekilde gerçekleşen anjiyogenez, kanser ve tümör dokusunun oluşumu gibi patolojik olaylarda sürekli aktif hale gelmektedir (Fouad, & Aanei, 2017; Al-Ostoot ve ark., 2021). Anjiyogenez, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin dengeli bir şekilde bulunmasıyla düzenlenmektedir. Ancak, bu denge tümörlerde pro-anjiyogenik faktörler yönüne doğru kaydığında tümör vaskülarizasyonu başlatılmaktadır (Lugano, Ramachandra, & Dimberg, 2019).

Tümör anjiyogenezi, normal anjiyogenez süreçlerinden farklı gerçekleşmektedir. Normal damarlara göre düzensiz, daha geniş ve geçirgen olan tümör damarlarında endotel hücreler düzgün bir tek katmanlı tabaka oluşturamamakta ve bazal membran kalınlığı değişkenlik göstermektedir. Tümör damarlarındaki bu yapısal bozukluklar,

TME’de hipoksi gibi stres faktörlerine sebep olmakta ve anjiyogenezin tetiklenmesini desteklemektedir. Hipoksi, anjiyogenezin en önemli tetikleyicilerinden biri olarak bilinmektedir. Hipoksiye yanıt olarak endotel hücreleri, hipoksi-indüklenebilir faktör (HIF) ailesi aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu gen ailesinin bir üyesi olan *HIF1-α*, *VEGF* ve diğer pro-anjiyogenik genlerin yukarı yönlü düzenlenmesini sağlayarak anjiyogenezi teşvik edebilmektedir. Pro-anjiyogenik VEGF sinyal yolağı anjiyogenezin en önemli düzenleyicilerinden biri olup, endotel hücrelerin göçünün ve vasküler geçirgenliğin artmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve anjiyopoietinler olmak üzere çeşitli moleküllerin de tümör anjiyogenezinde etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca CAF’ler ve TME’deki inflamatuvar hücreler de pro-anjiyogenik sinyallerin salınımına katkıda bulunarak tümör büyümesinde ve anjiyogeneizde rol oynamaktadır (Lui ve ark., 2023; Al-Ostoot ve ark., 2021; Lugano, Ramachandra, & Dimberg, 2019).

2.4.7. Genom instabilitesi ve genetik mutasyonlar

Hücrelerdeki genomun stabilitesi, hücrelerin DNA hasarını etkin bir şekilde onarma yeteneklerine bağlıdır. Özellikle replikasyon gibi normal hücresel süreçlerde oluşabilecek çift iplik kırıkları (DSB’ler) hücre genomunun stabilitesi için ciddi tehdit oluşturmakta ve stabilitenin korunması için bu kırıkların DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılması gerekmektedir. DSB onarımı, bölünen hücrelerde kardeş kromatidin onarımında kalıp olarak kullanıldığı ve nispeten hatasız bir onarım sağlayan homolog rekombinasyon (HR) ve kırık uçların doğrudan birleşmesi ile gerçekleştirilen, HR’a göre daha hızlı gerçekleşen ancak, mutasyona daha yatkın bir süreç olan homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) olmak üzere iki temel mekanizmayla gerçekleşmektedir (Li, Zimmerman, & Weyemi, 2021).

DNA tamir mekanizmalarındaki kusurlar, replikasyon stresi, mitozda hatalı kromozom ayrımı ve genotoksik tedaviler gibi süreçlerden kaynaklanan genomik instabilite, kanserde yaygın olarak görülen yapısal ve sayısal kromozom anomalilerine yol açmaktadır. Buna örnek olarak yanlış eşleşme onarımı (MMR) kusurları mikrosatellit instabilitesine ve nokta mutasyonlarına neden olurken, homolog rekombinasyon hataları ise mikronükleus oluşumu ve inflamatuvar yanıtın bozulması

gibi mekanizmalar aracılığıyla genomik instabiliteye katkıda bulunmaktadır (Chen, Linstra, & van Vugt, 2022). Ayrıca onkogenlerin aşırı aktivasyonu, kanser hücrelerinde replikasyon stresinin artmasına neden olarak hücre döngüsü ile ilişkili yolların bozulmasına neden olmaktadır ve bu süreç bozulmuş bir DNA hasar yanıtı mekanizmasının varlığında tümör oluşumunun teşvik edilmesine neden olmaktadır (Gaillard, Garcia- Muse, & Aguilera, 2015).

Genomik instabiliteye neden olan diğer bir mekanizma ise telomerler üzerinden gerçekleşmektedir. Bilindiği üzere, telomer uzunluğunun korunması genom bütünlüğünün sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Telomerazın aşırı aktive olmasıyla birlikte hücreler telomer kısalmasının yarattığı senesens durumundan çıkarak yeniden düzenlenmiş bir genoma sahip olan kanser hücrelerini oluşturabilmektedir. Bu süreçte, p53 ve RB gibi tümör baskılayıcı yollarda oluşabilecek bir kayıp hücrelerin büyümesini kontrolsüz hale getirebilmekte ve oluşacak kromozomal füzyonlar sonucunda genomik instabilite artmaktadır (Maciejowski, & Lange, 2017). Bu füzyonların en çok çalışılanı ve en iyi bilineni, kronik miyeloid lösemi ile ilişkilendirilen t(9;22) kromozom translokasyonu ile oluşan ve Philadelphia kromozomu olarak da adlandırılan *BCR-ABL* onkogenidir. Bu füzyonlara bir diğer örnek ise Burkitt lenfomasında *MYC* onkogeninin immüoglobulin gen bölgelerine translokasyonu sonucu oluşturduğu füzyonlardır. Genomik instabilitenin yanı sıra, kromozomal instabilite (CIN) de tümör heterojenitesinin artmasına ve tedaviye dirençli hücrelerin evrimleşmesine neden olabilmektedir (Reis, Vargas, & Lemos, 2016). Sonuç olarak genomik instabilite ile ilişkili DNA onarım mekanizmalarındaki kusurlar, telomer dinamiklerinin değişmesi, replikasyon stresi ve kromozom anomalileri gibi mekanizmalar ve süreçler tümör oluşumuna ve ilerlemesine doğrudan katkıda bulunmaktadır.

2.4.8. Tümör teşvik edici inflamasyon ve immün sistemden kaçış

İnflamasyon, bağışıklık sisteminin zararlı ajanlara karşı verdiği doğal bir yanıttır. Hücrelerde akut inflamasyon koruyucu bir rol üstlenirken, kronik inflamasyon hücrelerde kanserleşme sürecini tetikleyebilmektedir (Hou, Karin, & Sun, 2021). Kronik inflamasyonun, tüm kanserlerin yaklaşık %25'inden sorumlu olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve bu inflamasyon durumunun altında kronik enfeksiyonlar,

fiziksel ve kimyasal uyaranlar gibi mekanizmaların yattığı bulunmuştur. Özellikle *H. pylori* enfeksiyonunun gastrik adenokarsinoma ve Epstein-Barr virüsünden kaynaklanan kronik inflamasyonun ise nazofarenks karsinomuna neden olabileceği bilinmektedir (Khusnurrokhman, & Wati, 2022).

Kronik inflamasyon, TME'deki bağışıklık hücreleri, stromal hücreler ve epitel hücreleri arasındaki etkileşimler aracılığı ile tümör progresyonuna katkıda bulunmaktadır. Bu süreçte, NF- κ B, STAT3, HIF-1 ve TNF- α gibi inflamatuvar mediatörler önemli rol oynamaktadır. NF- κ B ve HIF-1 aktivasyonu tümör metastazını teşvik etmekte, TNF- α ise inflamatuvar süreçleri tetikleyerek tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bunun yanında, tümör ilişkili makrofajlar (TAM) tarafından salgılanan interlökin-1 (IL-1), IL-6 gibi sitokinler kronik inflamasyonu desteklemekte ve karsinogenezi hızlandırmaktadır (Khusnurrokhman, & Wati, 2022).

Bağışıklık sisteminin kanserli hücreleri tanıyıp yok etme süreci bağışıklık kontrol noktaları tarafından düzenlenmektedir. Bağışıklık sisteminde önemli rolü bulunan T hücrelerinin kanserli hücreleri tanıyıp yok etmeleri için dendritik hücreler tarafından antijenlerin sunulması ve T hücrelerinin bu antijenleri tanıyarak aktifleşmeleri gerekmektedir. Ancak, kanser tümörleri bu süreçten kaçmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Kanser hücreleri, bağışıklık sisteminden kaçmak için PDL1 ve MHC-1/2 gibi bağışıklık kontrol noktası proteinleri aracılığıyla T hücrelerinin aktivasyonu baskılamaktadır (Gurani, Swanton, & Quezada, 2023; Jhunjunwala, Hammer, & Dalamarre, 2021).

Kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışında rol oynayan diğer bir mekanizma da otofaji olarak bilinmektedir. Otofaji aracılığı ile bağışıklık kontrol noktası proteinlerinin bozunması aracılığıyla bağışıklık tepkisi düzenlenebilmektedir. Bağışıklık kontrol noktası proteinlerinden PD-L1'in otofaji aracılı yıkımı T hücrelerinin aktivitesini arttırarak tümör büyümesini engelleyebilmektedir. Ancak, diğer bir bağışıklık kontrol noktası proteini MHC-1/2'nin otofajik yıkımı, antijen salınımının azalmasına ve dolayısıyla T hücrelerinin etkinliğinin azalması nedeniyle tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışının desteklenmesine neden olmaktadır (Duan ve ark., 2021). Özetle, kronik inflamasyon, TME'de immün sistemin baskılanmasına ve tümör büyümesini tetikleyen faktörlerin aktifleşmesine neden

olmaktadır.

2.4.9. Metabolik yeniden programlama

Kanser hücreleri sınırsız replikatif yeteneklerini korumak ve hipoksi ve besin yetersizliği gibi durumlarda hayatta kalabilmek için metabolizmalarını yeniden düzenlemektedirler. Metabolik yeniden programlama, büyük oranda TME tarafından kontrol edilmekte ve kanser hücreleri ile TME'deki stromal hücreler arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Li, Sun, & Qin, 2021).

Kanser hücreleri, Warburg etkisi, Krebs döngüsündeki değişiklikler ve oksidatif fosforilasyon oranındaki artış gibi metabolik adaptasyonlarla hayatta kalmak için ihtiyaç duydukları enerjinin üretimini ve biyosentetik gereksinimlerini karşılamaktadırlar (Nong ve ark., 2023). TME' nin en önemli bileşenlerinden biri olan CAF'ler, kolajen ve laminler gibi ECM bileşenlerinin yeniden düzenlenmesiyle ve interlökinler ve TNF- α gibi proinflamatuvar düzenleyiciler ile fibroblast büyüme faktörü (FGF), VEGF ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörlerinin salgılanmasıyla protümörojenik etkilere neden olmaktadır (Li ve ark., 2021).

Bununla birlikte onkogenler ve tümör baskılayıcı genler de kanser hücrelerinin metabolik yeniden düzenlenmelerinde rol oynamaktadır. c-MYC onkogeni, siklin bağımlı kinaz-4 (CDK4) ve RNA polimeraz 3 gibi hücre proliferasyonunu arttıran genlerin yeniden düzenlenmesini sağlayarak tümör büyümesine katkıda bulunurken, KRAS, glikoliz enzimleri gibi moleküllerin ekspresyonunu arttırarak kanser hücrelerinin metabolik yeniden düzenlenmesinde rol oynamaktadır. AKT onkogeni, PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonunu sağlayarak hücre çoğalmasını arttırırken apoptozu baskılamaktadır. Ayrıca, HIF'ler de düşük oksijenli koşullarda kanser hücrelerinin hayatta kalmalarını sağlayarak metabolik yeniden düzenlemeye katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte PTEN kaybı glukoz metabolizmasını değiştirerek enerji üretimini arttırmaktadır (Ahmed ve ark., 2021; Xia ve ark., 2021).

Sonuç olarak kanser hücrelerinin yeniden programlanması, tümör büyümesi ve immünosupresyon ile doğrudan ilişkilidir. Hipoksik koşullar ve besin eksikliği gibi durumlarda çeşitli genler metabolik yolların yeniden düzenlenmesini teşvik ederek

tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve agresif fenotip geliştirmesini sağlamaktadır (Li, Sun, & Qin, 2021; Xia ve ark., 2021; Nong ve ark., 2023; Ahmed ve ark., 2021).

2.4.10. Fenotipik plastisite

Kanser hücrelerinin fenotipik plastisitesi, tümör oluşumu, ilerlemesi ve tedaviye yanıt süreçlerinde önemli bir rol oynayan hücresel durumların geri dönüşümlü geçişini içeren bir kavram olarak tanımlanmaktadır. Fenotipik plastisite, olgun hücrelerin progenitor duruma didiferansiyasyonu, progenitor veya kök hücre durumlarının korunmasını sağlayan farklılaşma blokajını ve alternatif hücre soylarına transdiferansiyasyonunu içeren üç temel mekanizma ile tanımlanmaktadır. Hücresel plastisite, genetik ve epigenetik değişiklikler ile tümör mikroçevresinin etkisiyle şekillenmektedir. Buradaki transdiferansiyasyon, kanser hücrelerinin yeni morfolojik ve transkripsiyonel özellikler kazanarak alternatif hücre soylarına dönüşmesini ifade etmektedir ve bu süreç ilaç direnci ve tümör nüksü ile ilişkilendirilmektedir (Hanahan, 2022).

Fenotipik plastisite ile ilişkilendirilen EMT, tümör hücrelerinin epitel hücrelerinin epitel özelliklerini kaybederek mezenkimal fenotip kazanmasına neden olmaktadır. Bu süreç Snail, Slug, Zeb1/2 ve Twist gibi faktörler tarafından şekillenmektedir. EMT' nin ters süreci olan mezenkimal- epitelyal geçiş (MET) ise metastatik kolonizasyon sırasında gözlemlenebilmektedir. EMT, metastatik yayılımın yanında, tümör hücrelerinin ilaç direnci geliştirmesinde de rol oynamaktadır. Fenotipik plastisitede rol oynayan diğer mekanizma olan kanser kök hücreleri ise, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme yetenekleriyle tümör heterojenitesine katkıda bulunmaktadır. Kanser kök hücreleri, CD44, CD133, CD24 ve EPCAM gibi belirteçler ile karakterize edilmektedir ve WNT, NOTCH ve Hedgehog gibi gelişimsel sinyal yollarını kullanmaktadır. Bu hücreler, tümörlerin agresif özellik kazanmasına ve terapötik direnç geliştirmesine yol açabilmektedir. Ayrıca özellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları olmak üzere epigenetik mekanizmalar kanser kök hücre plastisitesini arttırarak tedaviye yanıtı zorlaştırabilmektedir (Shi ve ark., 2023; Jehanno ve ark., 2022; Bhat ve ark., 2024).

2.4.11. Hücresel senesens

Senesens süreci, ilk olarak insan fetal diploid hücre türlerinde in vitro olarak normal hücrelerin çoğalma potansiyelinin sınırlı olması nedeniyle sınırlı bir yaşam süresine sahip olmaları ile ilişkili bir kavram olarak tanımlanmıştır. Kısaca senesens süreci hücrelerin yaşlanması olarak da tanımlanabilmektedir. Hücresel senesens, kalıcı ve geri dönüşümsüz şekilde hücre döngüsünün durması, yaşlanma ilişkili salgı fenotipi (SASP), makromoleküler hasar ve yeniden düzenlenmiş metabolizma olmak üzere dört karakteristik özellik taşımaktadır. Senesens, uzun süreli hücre döngüsü durması nedeniyle kansere karşı bir bariyer olarak bilinmektedir. Sürekli olarak aktive edilen onkogenlerden kaynaklanan onkogen kaynaklı senesens, promitotik aktiviteyi ve kontrolsüz DNA replikasyonunu engelleyerek proliferasyon durmasını tetikleyebilmektedir ve bu durum senesensin kansere karşı koruyucu rolü olduğu düşüncesini destekler niteliktedir (Jin ve ark., 2024; Domen ve ark., 2022; Ou ve ark., 2021).

Senesens sürecinin kansere karşı koruyucu etkileri olduğu düşünülse de bunu aksini kanıtlayan çalışmalar son yıllarda yaygınlaşmaktadır (Hanahan, 2022). Senesent hücreler, TME ile etkileşime girerek kanser fenotiplerini destekleyebilmektedir. Ayrıca, senesent hücrelerin salgıladıkları bazı sinyal molekülleri de bu hücrelerin yakınındaki kanser hücrelerini etkileyerek proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi kanser gelişiminde önemli rol oynayan karakteristikleri teşvik edebilmekte ve tümöre karşı geliştirilen bağışıklığı da baskılayabilmektedirler. CAF'ler da senesense girebilmekte ve senesens CAF'ler, salgıladıkları sinyal molekülleri aracılığıyla kanser hücrelerine tümörü uyarıcı faktörleri iletebilmektedir. Normal dokulardaki senesent fibroblastlar da tümör gelişimini ve metastazı destekleyebilmektedir. Bununla birlikte diğer stromal hücrelerin de senesens aşamasına geçerek tümör fenotiplerini etkileyebilmektedir. Buna bir örnek olarak, meme kanseri modellerinde terapi ile indüklenen senesens tümör endotel hücrelerinin tümör ilerlemesini arttırması verilebilir (Ruhland ve ark., 2016; Lee, & Schmitt, 2019; Faget, Ren, & Stewart, 2019; Wang, Kohli, & Demaria, 2020).

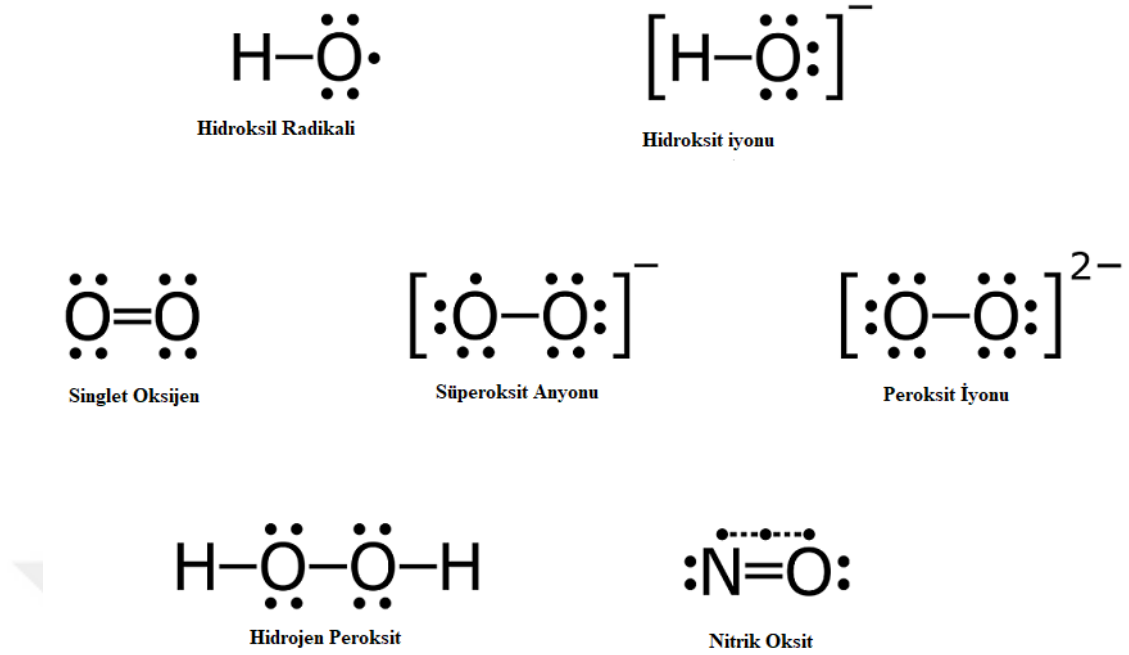
Özet olarak, senesens kanser için hem teşvik edici hem de koruyucu olmak üzere ikili bir rol oynamaktadır. Bu karmaşık mekanizmanın anlaşılması, kanser tedavi

hedefleri için önemlidir.

2.5. Redoks Sinyalizasyonu ve Karsinogenez Sürecindeki Roller

2.5.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif oksijen ara ürünleri (ROI), endojen olarak üretilen ve yüksek reaktiviteye sahip oksijen içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. ROI, moleküler oksijenin hatalı ve eksik indirgenmesi sonucunda oluşan süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksit radikali ($OH^{\cdot}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi bileşikleri içermekte, ROS ise daha kapsamlı olarak ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$) ve HOBr, HOI gibi hipohalitleri de içermektedir (Şekil 4). ROS, hücrelerdeki biyolojik oksidasyon süreçlerinde, mitokondri zarında bulunan elektron taşıma zinciri (ETS)'nden kaçan elektronlar, flavin dehidrogenaz aktivitesi gibi hücre içi faktörlerin ve UV radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle aerobik ortamlarda sürekli olarak oluşmaktadır. Hücreler, ROS birikiminin yıkıcı etkilerini önlemek amacıyla çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı ve aşırı ROS üretiminin olduğu durumda ROS dengesi bozularak oksidatif stres adı verilen stres koşulu oluşmaktadır. Oksidatif stres, lipidler, nükleik asitler ve proteinler gibi temel biyomoleküllerde oluşturdukları oksidatif hasar nedeniyle hücre fonksiyonları bozmakta ve hücre için yıkıcı etkilere neden olmaktadır. Bu yıkıcı etki, yaşlanma süreci ve kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve çeşitli inflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, ROS hücrel sinyal yollarında ikincil haberciler olarak rol oynamakta ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre proliferasyonunun kontrolü gibi fizyolojik işlevlere de katkı sağlamaktadır. Özetle ROS, hücre içi konsantrasyonuna ve denge mekanizmalarına bağlı olarak hücre için hem yararlı hem de zararlı etkilere neden olabilmektedir (Krumova, & Cosa, 2016; Winterbourn, 2008; Bartosz, 2009).



Şekil 4. Reaktif oksijen türevleri (Krumova & Cosa, 2016).

2.5.2. Hücre içi ROS kaynakları

ROS, hücrelerde metabolik ve enzimatik süreçler sonucunda mitokondri ve NADPH oksidazlar (NOX) başta olmak üzere çeşitli hücre içi kaynaklardan üretilmektedir. Mitokondride, özellikle ETS' de görevli kompleks I ve kompleks III' ün ETS'deki işlevi sırasında süperoksit ve H_2O_2 gibi ROS türleri oluşmaktadır. Özellikle NADPH-ubikinon oksidoredüktaz kompleksi olarak da adlandırılan kompleks I, mitokondriyal ROS üretiminin ana merkezi olarak bilinmektedir. Hipoksi gibi dış koşulların olduğu durumlarda kompleks I' in bir parçası olan flavin mononükleodine (FMN), NADH_2 'deki elektronların taşınması esnasında elektronlardan birinin kompleksten kaçması ve oksijen (O_2) molekülüne aktarılması sonucunda süperoksit anyonu oluşabilmektedir. Ayrıca, gliserol-3-fosfat dehidrogenaz, pirüvat dehidrogenaz ve elektron transfer flavoprotein Q oksidoredüktaz (ETFQOR) enzimleri de mitokondriyal ROS kaynaklarındandır (de Almeida ve ark., 2022; Addabbo, Montagnani, & Goligorsky, 2009). NADP oksidazlar özellikle kardiyovasküler sistemde önemli bir ROS kaynağı olarak bilinmektedir. NOX ailesine ait farklı izoformlar, farklı doku ve hücrelerde süperoksit veya H_2O_2 üretiminde rol almakta olup NOX ailesi üyelerinin aşırı ekspresyonları da

çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Lambeth, Kawahara, & Diebold, 2007).

ROS üretimine katkıda bulunan diğer enzimler ksantin oksidaz (XO) ve nitrik oksit (NO) sentazlar (NOS) olarak bilinmektedir (de Almeida ve ark., 2022). Ksantin oksidaz enzimi, hipoksantin ve ksantin ürik aside oksidasyonunu sağlamaktadır ve bu oksidasyon sırasında süperoksit ve H_2O_2 üretmektedir (Bortolotti ve ark., 2021; Liu ve ark., 2021). NOS'lar ise normal fizyolojik koşullarda NO üretirken, enzimin hatalı çalışması durumunda süperoksit üretimine neden olmaktadır. Endotel NOS'ın (eNOS), işlevini kaybetmesi durumunda, endotelyal disfonksiyon ve buna bağlı olarak vasküler yaşlanma süreci tetiklenmektedir (Guerby ve ark., 2021; Tran ve ark., 2022).

Bunlara ek olarak, endoplazmik retikulum (ER) da ROS üretiminin önemli kaynaklarından biridir. ER'de protein katlanması ve Ca^{2+} homeostazının düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylar sırasında oksidatif stres oluşabilmektedir. ER'de katlanmamış protein yanıtında (UPR) görevli inositol gerektiren enzim 1 (IRE1), inflamatuvar sinyal yolları aracılığıyla ROS üretimini arttırabilmektedir (Bhattacharai ve ark., 2021).

Özetle, hücre içi ROS üretimi, hücre tipine, ROS' un türüne ve fizyolojik ya da patolojik olaylara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Hücrel ROS homeostazi dengesini kaybettiğinde oksidatif stresin artmasıyla yaşlanma ve çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (de Almeida ve ark., 2022; Brown, & Barutaitė, 2012; Snezhkina ve ark, 2019).

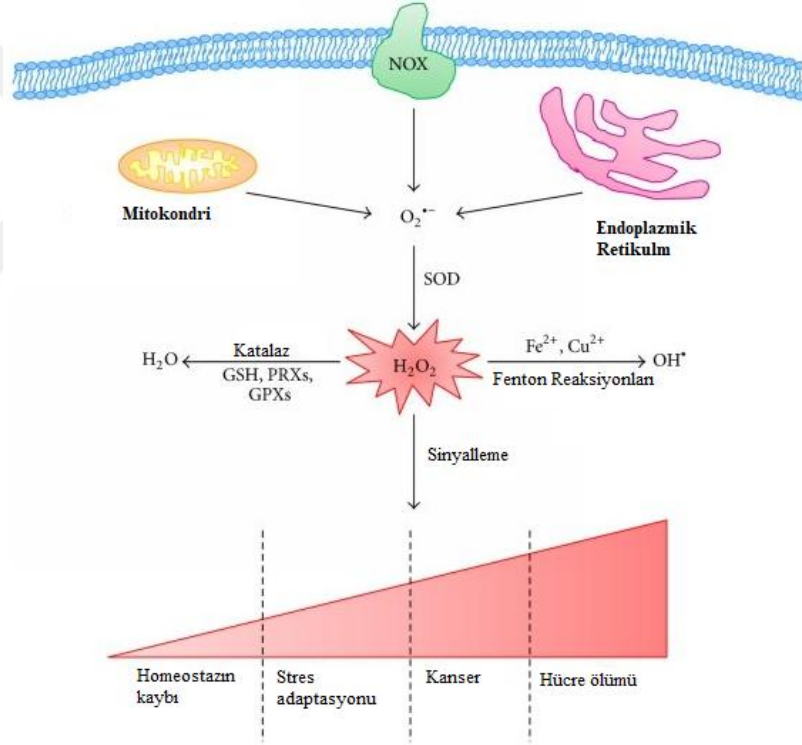
2.5.3. Hücre içi antioksidan mekanizmaları ve hücre içi redoks sinyalizasyonu

Hücreler, ROS' u düşük ve sabit seviyelerde tutmak amacıyla çeşitli antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Glikoz metabolizmasının pentoz fosfat yolunda üretilen indirgenmiş nikotinamid dinükleotid fosfat (NADPH), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin işlevi için önemli bir redoks kofaktörü olmakla birlikte, ROS üreten NOX'lar için de gerekli bileşiklerdir. Bu durum, hücrel metabolizmanın redoks durumu ile güçlü bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermektedir. Antioksidanlar, makromoleküllerin oksidasyonunu önleme veya yavaşlatma yeteneğine sahip moleküller olarak bilinmektedir. Antioksidanlar, serbest radikalleri uzaklaştırarak veya kendileri oksitlenerek oksidatif zincir reaksiyonlarını inhibe

etmektedir. Hücreler, C ve E vitaminleri, glutatyon gibi doğal antioksidanlar ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidazlar gibi antioksidan enzimlere sahiptir. SOD enzimi, süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen peroksit'e parçalanmasını katalize etmekte ve oksidatif hasarın önlenmesine katkıda bulunmaktadır. Glutatyon-S- transferazlar (GST), hücresel detoksifikasyonda rol oynayan çok işlevli proteinlerden oluşmaktadır ve genotoksik bileşiklerin metabolik temizlenmesinde kritik role sahiptir. Katalaz enzimi, en yüksek dönüşüm hızına sahip enzim olan antioksidan enzimlerden biri olup hidrojen peroksit dozuna bağlı olarak, hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanmasını sağlamaktadır. Glutatyon reduktaz (GR) ise, oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüştüren bir flavoproteindir. Bu enzim, hücrelerde glutatyon seviyelerinin korunmasını sağlayarak oksidatif strese karşı hücresel savunmayı desteklemektedir (Lennicke, & Cocheme, 2021; Reczek, & Chandel, 2015).

Hücre içi sinyal yolları, hücresel redoks dengesindeki değişikliklerden etkilenmektedir. İnsülin gibi hormonlar, EGF gibi büyüme faktörleri ve interferonlar gibi sitokinler reseptörlerini aktive ederek NOX enzimlerini uyarmaktadır ve H_2O_2 oluşumuna yol açmaktadır. H_2O_2 , insülin reseptörü (IR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi proteinlerin sistein kalıntılarını değiştirerek sinyal iletimini düzenlemektedir. Ayrıca hücrede redoks dengesindeki değişiklikler, fosfatazları inhibe ederken kinazların aktivitesini uyarabilmekte veya baskılayabilmektedir. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2), hücreleri oksidatif stresten koruyan genlerin ekspresyonunu düzenleyen temel bir transkripsiyon faktörüdür. Normal hücresel koşullarda Keap1 proteini tarafından kontrol edilirken, oksidatif stres altında Keap1'in sistein kalıntılarının modifikasyonu Nrf2'yi serbest bırakarak nükleer translokasyonunu sağlamaktadır. Böylelikle Nrf2, antioksidan yanıt elemanları (ARE) bölgelerine bağlanarak redoks homeostazında görev alan genlerin ekspresyonlarını uyarır. NF- κ B, redoks sinyalleriyle modüle edilen ve inflamatuvar yanıtları düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. H_2O_2 , Src ve Syk gibi kinazları aktive ederek NF- κ B'nin aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma kapasitesi, redoks şaperonları tarafından düzenlenmektedir. ROS ile düzenlenen bir diğer sinyal yolu da PI3K/Akt yolunun negatif düzenleyicisi olan PTEN'dir. H_2O_2 , PTEN'in glutatyonilasyon yoluyla geçici

olarak inhibe edilmesine neden neden olmakta ve Akt aktivasyonunu arttırmaktadır. PTEN'in uzun süreli inaktivasyonu, hücresel sinyal yollarının stres adaptasyonu aşamasına geçmesine yol açabilmekte ve kanserin gelişimine katkıda bulunabilmektedir. HIF-1 α , hücresel oksijen seviyelerine duyarlı bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Yüksek ROS seviyeleri altında HIF-1 α stabil hale gelmektedir. Son olarak FOXO transkripsiyon faktörleri de redoks sinyalleri tarafından düzenlenmektedir. Oksidatif stres koşullarında TNPO ile sistein aracılı dimerizasyonu FOXO transkripsiyon faktörlerinin nükleer lokalizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Ursini, Maiorino, & Forman, 2016; DeBlasi, & DeNicola, 2020; Semenza, 2014; Lennicke, & Cocheme, 2021; Forman, Torres, & Fukuto, 2002; Şekil 5).



Şekil 5. Redoks homeostazı (Marengo ve ark., 2016).

2.5.4. Redoks adaptasyonu ve karsinogenez sürecindeki rolü

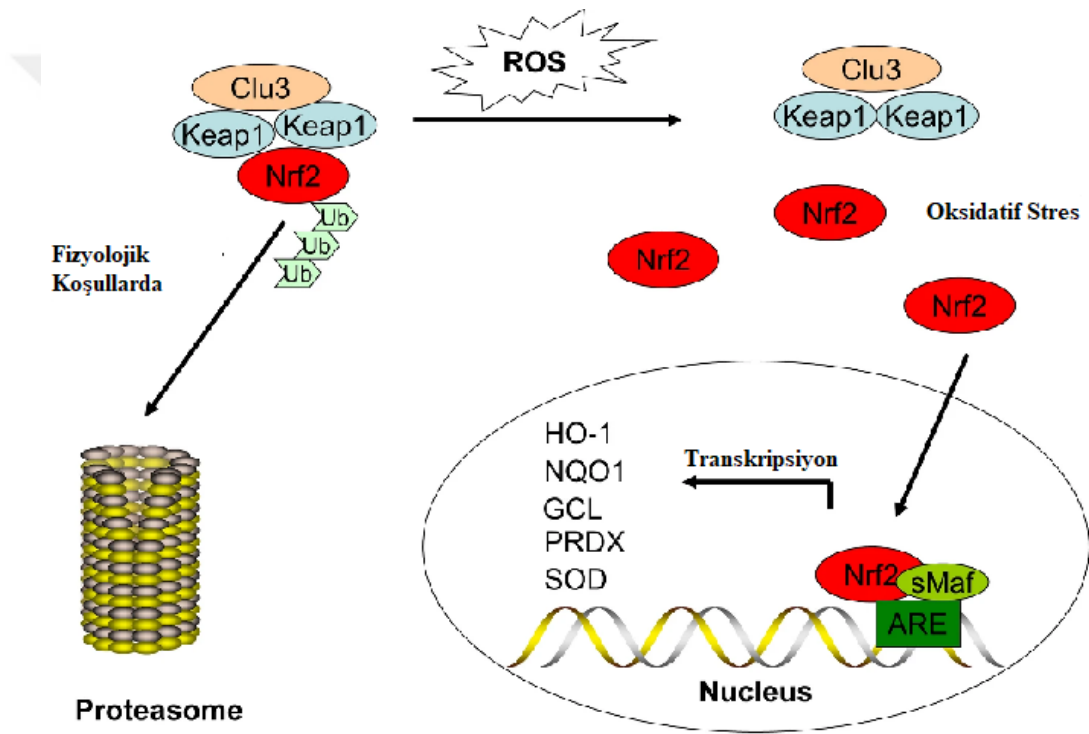
Kanser hücreleri, hızlı proliferasyonların nedeniyle artmış metabolik aktivite göstermektedirler ve bu süreç hücre içi ROS seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Hücre içi ROS seviyelerinin uzun süreli artışında oksidatif stres durumu ortaya çıkmakta ve hücre içi oksidatif stresin artışı hücre ölümüne neden olmaktadır. Kanser

hücreleri, stres kaynaklı hücre ölümünü engellemek amacıyla geliştirdikleri güçlü antioksidan mekanizmalar aracılığıyla redoks homeostazını dengede tutmaktadır ve bu sürece redoks adaptasyonu adı verilmektedir. Bu redoks adaptasyonu, kanserde önemli olan tümör büyümesi, metastaz ve ilaç direnci gibi durumları destekleyen bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır. Kanser hücreleri, redoks adaptasyonunu sağlamak için Nrf2, HIF-1 α ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinden Nrf2, hücrel antioksidan savunma mekanizmalarını artırırken, NF- κ B ve HIF-1 α ise oksidatif strese bağlı inflamatuvar yanıtları ve hipoksik adaptasyonu düzenlemektedir. Özellikle hipoksiye maruz kalan kanser hücrelerinde, HIF-1 α aracılığı ile glikoliz yönüne bir metabolik kayma gerçekleşmektedir. Bu metabolik kayma, kanser hücrelerinin oksidatif fosforilasyona bağımlılıklarını azaltarak mitokondriyal ROS üretimini sınırlandırmakta ve hücrelerdeki oksidatif stresi azaltmaktadır. Aynı zamanda glikoliz ürünleri, glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar aracılığıyla hücre içi ROS seviyelerini düzenlemektedir. Sonuç olarak, redoks homeostazı kanser hücrelerinin adaptasyon süreçlerinde kritik bir rol oynamaktadır (Eryılmaz, Egeli, & Çeçener, 2022; Pani ve ark., 2009; Hayes, Dinkova-Kostova, & Tew, 2020).

2.5.4.1. Redoks adaptasyonunda Nrf2 sinyal yolunun rolü

İnsanlarda *NFE2L2* geninden kodlanan Nrf2, oksidatif stres yanıtının temel düzenleyicilerinden biri olarak bilinmektedir ve hücrel redoks dengesini korumak için antioksidan ve detoksifikasyon genlerinin ekspresyonlarını düzenlemektedir. Bu süreç, hücreleri oksidatif hasara karşı korurken, aynı zamanda da metabolik uyumun ve hücrel canlılığın sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadır. Normal fizyolojik koşullarda, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1), Cul3/Rxb1 kompleksi aracılığıyla Nrf2' nin übikitinasyonunu veya 26S proteozomu tarafından bozunmasına neden olarak baskılanmasını sağlamaktadır. Hücrede oksidatif ya da elektrofilik bir stres olması durumunda, Keap1'in sistein kalıntılarındaki gerçekleşen bir modifikasyon sonucunda Keap1-Nrf2 etkileşimi zayıflamakta ve Nrf2'nin proteozomal yıkımı azalmakta ve hücre içindeki stabilitesi artmaktadır. Serin/treonin kinazlar, Nrf2'nin fosforilasyonunu sağlayarak nükleusa translokasyonunu uyarmaktadır. Nükleusa transloke olan Nrf2, burada antioksidan yanıt elemanlarına (ARE) bağlanarak

glutasyon sentezini ve tiyoredoksin redüktaz 1 (Trx nrd1), NADPH-kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) ve hem oksijenaz-1 (HMOX1) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Şekil 6). Bu genlerin ekspresyonlarının aktivasyonu, hücrel redoks dengesinin korunmasını ve oksidatif hasarın onarılmasını sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde Nrf2'nin aşırı aktivasyonu, kemoterapiye karşı direnç mekanizmalarına katkıda bulunabilmektedir. Aynı zamanda bu yüksek seviyedeki Nrf2 ekspresyonu, hücrelerin oksidatif strese karşı direnç kazanmasında da önemli bir rolü üstlenmektedir (Pickering ve ark., 2012; Done, & Traustadottir, 2016; Labodo ve ark., 2016).

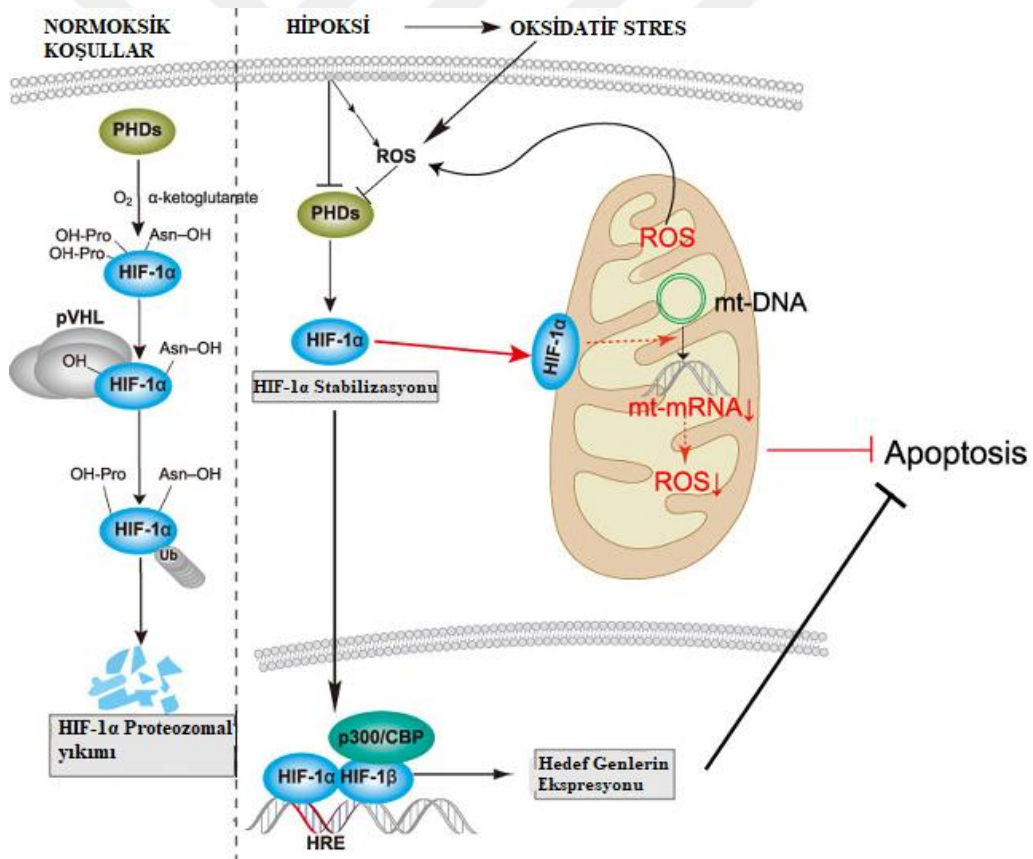


Şekil 6. Nrf2 aktivasyonu ve mekanizması (Li ve ark, 2021).

2.5.4.2. Redoks adaptasyonunda HIF-1 α sinyal yolunun rolü

Hipoksi indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α), oksijen homeostazının temel düzenleyicilerinden biri olup, normoksik ve hipoksik koşullarda farklı mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Normoksik koşullarda, HIF-1 α , von Hippel- Lindau (VHL) proteini aracılığıyla ubiquitin- proteozom aracılığı ile hızlıca yıkıma uğramaktadır. Hipoksi altında ise HIF-1 α stabil hale gelerek HIF-1 β ile heterodimer oluşturmakta ve hipoksiye yanıt veren genlerin promotör bölgelerindeki HRE sekanslarına bağlanarak

bu genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır. HIF-1 α 'nın stabilizasyonu, prolil hidroksilaz (PHD) ve HIF prolil hidroksilaz (HPH) enzimleri tarafından katalizlenen hidroksilasyon süreçlerine bağlıdır. Bu enzimler, HIF-1 α 'nın prolin kalıntılarını hidroksilleyerek VHL ile bağlanmasını sağlamakta ve proteozomal yıkımı tetiklemektedir. Hücre içi oksijen seviyelerine bağlı olarak aktif olan bu enzimler, hipoksi koşullarında etkinliğini kaybederek HIF-1 α stabilizasyonunu sağlamaktadır (Şekil 7). Özetle, HIF-1 α , oksijen homeostazının kritik bir düzenleyicisi olup, ROS aracılığıyla transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde modüle edilmektedir. Kanser biyolojisinde, HIF-1 α 'nın anjiyogenez, hücre metabolizması ve hücre sağkalımı üzerindeki etkileri nedeniyle düzensiz aktivasyonu, tümör progresyonu ve tedavi direncinde kritik bir rol oynamaktadır (Movafagh, Crook, & Vo, 2014; Karavasilis ve ark., 2023; Rabbani ve ark., 2010; Dzhalilova, & Makarova, 2021).



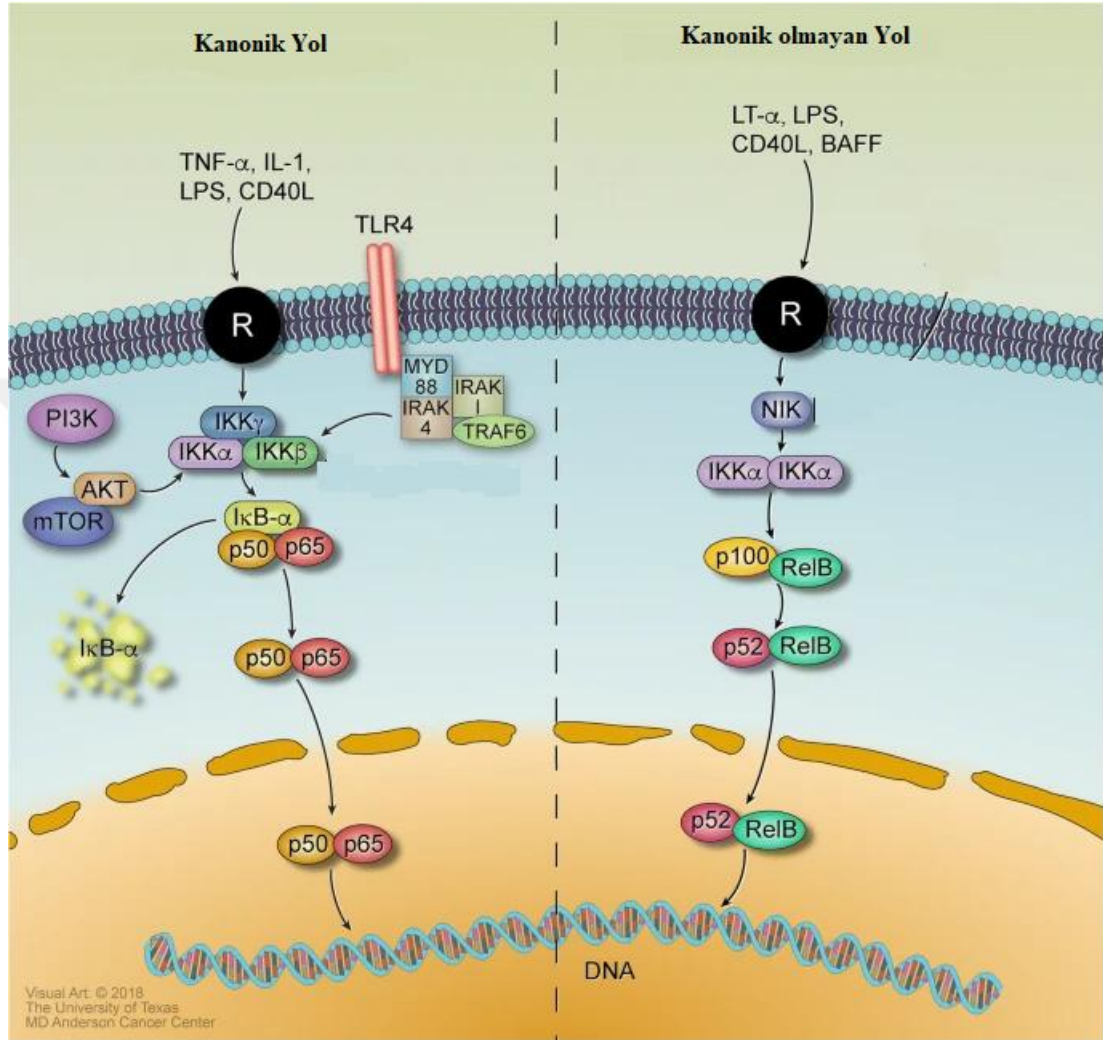
Şekil 7. HIF- 1 α aktivasyonu ve mekanizması (Li ve ark., 2019).

2.5.4.3. Redoks adaptasyonunda NF- κ B sinyal yolunun rolü

NF- κ B, hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir nükleer

transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir ve hücrelerin sağkalımı, hücre farklılaşması, inflamasyon yanıtının düzenlenmesi ve hücre büyümesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev almaktadır. NF- κ B, hücre içinde dimer formda ve genellikle inhibitör protein I κ B ile kompleks olarak inaktif formda bulunmaktadır. Oksidatif stres ve diğer hücresel sinyaller, bu kompleksin bozulmasına ve NF- κ B'nin nükleusa translokasyonuna yol açmakta ve gen ekspresyonunu düzenlemesine olanak tanımaktadır. NF- κ B'nin inflamasyon, farklılaşma ve hücre büyümesi üzerindeki etkileri, onu kanser gelişimiyle ilişkili kritik bir faktör haline getirmektedir. NF- κ B aktivasyonu, tümör hücrelerinin sağkalımını, anjiyogenezi ve metastazı teşvik eden mekanizmalara katkı sağladığından, kanser tedavisi için önemli bir kemoterapötik hedef olarak değerlendirilmektedir. Memeli hücrelerinde NF- κ B ailesi, dimerizasyon, inhibitör proteinlerle etkileşim ve DNA bağlanmasını sağlayan bir Rel homoloji alanı (RHD) içeren RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) ve NF- κ B2 (p100/p52) olmak üzere beş proteinden oluşmaktadır. RelA, RelB ve c-Rel transkripsiyon aktivasyon alanı (TAD) içermektedir ve doğrudan transkripsiyon aktivasyonu bulundurmaktadır. Ancak, p50 ve p52 doğrudan transkripsiyon aktivitesinden yoksundur. Normal koşullarda I κ B proteinleri ile kompleks ve inaktif halde bulunan NF- κ B, inflamatuvar sitokinler, mitojenler, büyüme faktörleri ve ROS gibi uyarılara yanıt olarak aktive edilmektedir. NF- κ B sinyalizasyonu klasik ve alternatif yol olmak üzere iki temel yol üzerinden düzenlenmektedir. Klasik yol, RelA'nın c-Rel ve RelB ile oluşturduğu dimerler aracılığıyla I κ B kinaz (IKK) kompleksinin aktive edilmesiyle gerçekleşmektedir. NF- κ B aktivasyonu, inhibitör proteinin bu IKK komplekslerinin aracılığıyla fosforilasyonu ve ubiquitin bağımlı degradasyonu ile gerçekleşir. Alternatif yolda ise RelB ve p52 heterodimerleri aracılığıyla gen ekspresyonu düzenlenmektedir. Burada, klasik yoldan farklı olarak IKK- α aracılığıyla NF- κ B2/ p100 heterodimeri fosforillenmekte ve proteolitik işleme uğrayarak aktif p52 formuna dönüşmektedir. Aktif forma geçen ve nükleus lokalizasyon sinyali (NLS) dizileri aracılığıyla nükleusa transloke olan NF- κ B, burada hedef genlerin promotör dizilerine bağlanarak transkripsiyonel aktiviteyi düzenlemektedir (Şekil 8). NF- κ B sinyal yolunun oksidatif stres ile aktive olabileceği yapılan çalışmalarla öne sürülmüş ve kültür ortamına H₂O₂ eklenmesinin NF- κ B aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Sonuç olarak, NF- κ B'nin aşırı aktivasyonu, kronik inflamasyon ve kanser gibi patolojik durumlarla

ilişkilendirilmektedir ve bu sinyal yolunu hedef alan tedavi stratejileri, bu hastalıkların tedavisi ve yönetimi için büyük önem taşımaktadır (Klaunig, 2019; Piva, Belardo, & Santoro, 2006; Ak ve Levine, 2010; Li ve ark., 2015; Mauro ve ark., 2011).



Şekil 8. Kanonik ve kanonik olmayan NF- κB sinyal yolu. (Zhao, Serre, & Steunou, 2025).

2.6. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PK), dünya çapında erkeklerde en sık görülen malignitelerden biridir ve dünya genelinde kansere bağlı ölümlerde beşinci sırada yer almaktadır (Gangladia ve ark., 2021). PK'nin görülme sıklığı ve mortalite oranları coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir ve bu farklılıklar genetik yatkınlık, çevresel faktörler, sosyoekonomik durum ve sağlık politikalarına bağlı olabilmektedir. Özellikle prostat spesifik antijen (PSA) testinin erken teşhis amacıyla yaygın kullanıldığı Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa' da PK, erken evrelerde

saptanabilmekte ve metastatik PK (mPK) insidansı azalmaktadır (Gandaglia ve ark., 2021; Bergangren ve ark., 2023).

Prostat bezi, McNeal tarafından tanımlanan periferik bölge, merkezi bölge ve geçiş bölgesi olmak üzere üç anatomik bölgeye ayrılmaktadır. PK vakalarının büyük bir kısmı periferik bölgede gelişmektedir. Periferik bölge dijital rektal muayene ile değerlendirilebilmektedir ve tam tanı için geleneksel olarak transektal ultrasonografi kılavuzluğunda biyopsi amacıyla numune alınmaktadır. Bununla birlikte, çok parametrelili manyetik rezonans görüntüleme tekniklerinin kullanımıyla, prostatın dijital rektal muayene ile tam olarak tespit edilemeyen anterior bölgesinde yer alan tümörlerin de saptanma oranı artış göstermiştir (Garbieh ve ark., 2025).

PK tanısında doku biyopsisi temel yöntem ve altın standart olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, manyetik rezonans görüntüleme ve fonksiyonel görüntüleme yöntemlerindeki teknolojik gelişmeler ve biyobelirteçlerin kullanımı, hastalığın doğru karakterizasyonunda önemli rol oynamaktadır. PK hastalığının farklı yönetim stratejileri bulunmaktadır. Düşük riskli ve erken evredeki hastalar için aktif izlem yaygındır. Lokalize hastalık için cerrahi yöntemler ve radyoterapi tedavi seçeneklerindendir. MPK yönetiminde ise androjen yoksunluk tedavisi (ADT) temel tedavi stratejilerindendir. ADT'nin kemoterapi ile kombin olarak uygulandığı durumlarda ise sağkalım önemli oranlarda artmaktadır. Ayrıca yeni nesil hormonal tedaviler, immünoterapiler ve kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesi ileri evre PK hastalarında umut verici tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır. Tedavideki tüm bu gelişmelere rağmen PK, erkekler için önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (Litwin, & Tan, 2017; Belkahla ve ark., 2022).

2.6.1. Küresel prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları

PK, dünya genelinde erkekler arasında en sık teşhis edilen malignitelerden biridir ve kansere bağlı ölümler açısından önemli bir sağlık problemi oluşturmaktadır. 2022 yılı itibarıyla yaklaşık 1,46 milyon yeni vaka ve 396.000 prostat kanserine bağlı ölüm bildirilmiştir. 2040 yılına kadar bu sayının artan nüfus sebebiyle de 2,4 yeni vaka ve 712.000 ölüme ulaşması öngörülmektedir. Yeni vaka ve PK' ne bağlı ölüm oranı yükünün büyük bir bölümü özellikle Afrika, Asya ve Latin Amerika ile Karayipler

bölgelerinde bulunmaktadır. PK insidansı ve mortalitesi, dünya genelinde sağlık hizmetlerine erişimdeki farklılıklar, genetik yatkınlık ve tarama stratejilerindeki değişikliklerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ve Avusturalya gibi bölgelerde, PSA tabanlı tarama testlerinin yaygın kullanımı, bu bölgelerdeki insidansın yüksek olmasına neden olmaktadır. Buna karşın, bu tarama testlerinin nispeten daha az yaygın olduğu Sahra Altı Afrika, Latin Amerika ve Karayipler’de ölüm oranları daha yüksektir. Bu bölgelerdeki genetik yatkınlık, geç teşhis ve tedaviye erişimdeki yetersizlikler gibi faktörler belirleyici özellik taşımaktadır. Son beş yıldaki, Afrika Asya ve Latin Amerika’da gözlenen hem insidans hem de ölüm oranlarındaki artış, bölgeye özgü sağlık hizmeti müdahalelerine olan acil ihtiyaca dikkat çekmektedir (Schafer ve ark., 2025; Vaccarella ve ark., 2024).

2.6.2. Prostat kanserinin histopatolojisi ve moleküler mekanizmaları

2.6.2.1. Prostat bezinin anatomik ve histolojik yapısı

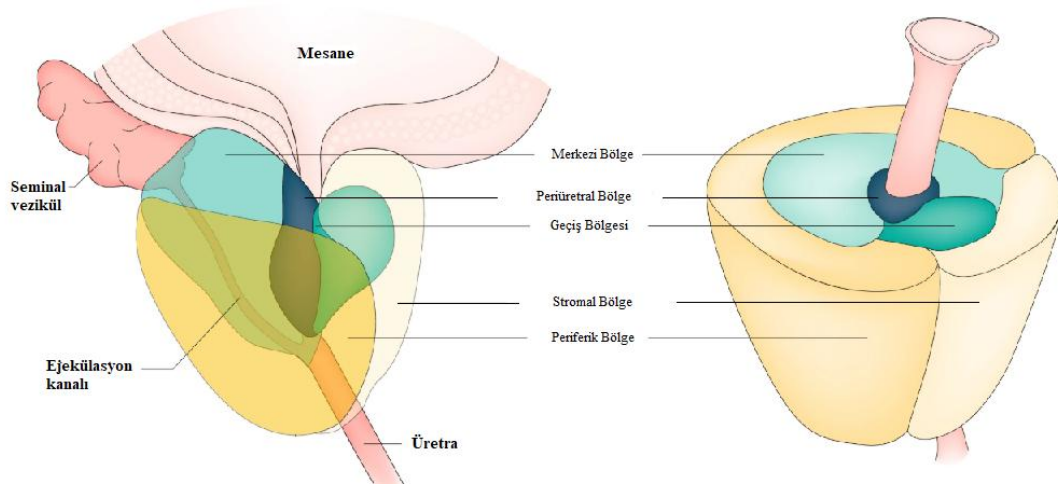
Erişkin insan prostat bezinin anatomik alt bölümleri ile ilişkili anatomik bilgi, ilk olarak Gil Vernet’in 1953 yılında ve daha sonrasında McNeal’in 1968 ve 1981 yıllarında gerçekleştirdiği çalışmalara dayanmaktadır. Gil Vernet yaklaşımında prostat, kaudal, kranial ve ara bez olmak üzere glandüler açıklıkların üretraya açılma konumuna göre sınıflandırılmış üç ana bezden oluşmaktadır. McNeal’ in yaklaşımında ise periferik bölge, merkezi bölge, geçiş bölgesi ve periüretral bölge olmak üzere prostatik üretrayı referans alarak tanımlayan dört temel glandüler bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler, prostatik üretra boyunca elde edilen kronal kesitlerin incelenmesiyle belirlenmiştir. Periferik bölge posteriolateral alanda, merkezi bölge tabanda, geçiş bölgesinin iki lobu ise proksimal üretra çevresinde yer almaktadır (Villers, Steg, & Boccon-Gibod, 1991; Amin ve ark., 2010).

Anatomik olarak prostat bezi, pelvik diyafram ile periton boşluk arasında subperitoneal bölge olarak adlandırılan alanda, Symphysis pubis’in arkasında, rektumun önünde ve mesanenin hemen altında lokalizedir. Klasik olarak ceviz büyüklüğünde ve şeklinde konik bir yapıya sahiptir. Mesaneden çıkan proksimal üretrayı çevreleyen prostat bezi, base (taban), apeks (tepe), anterior, posterior ve inferiolateral (alt-yan) yüzeylerden oluşmaktadır. Prostat ayrıca, glandüler (bez yapılı)

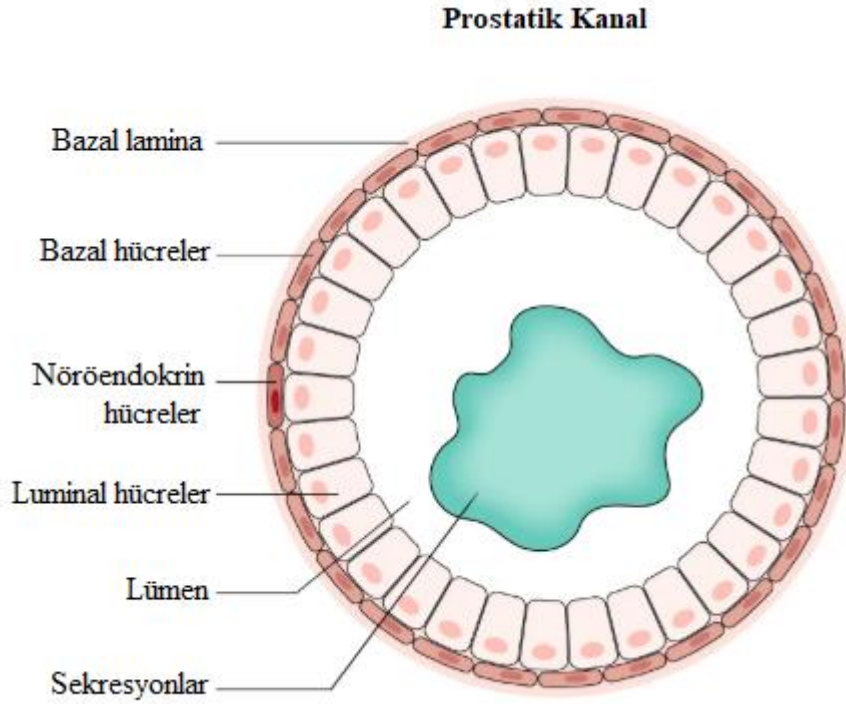
ve stromal elemanların sıkı bir şekilde kaynaşmasıyla oluşmaktadır ve bu yapı psödokapsül adı verilen yalancı bir kapsül ile çevrilidir (Lee, Akin-Olugbade, & Kirschenbaum, 2011; Şekil 9).

Prostat bezi hücreleri, prostat sıvısını salgılayan parenkimal epitel hücreleri ve bezin destek yapısını oluşturan stromal hücreler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Prostat bezinin epitel hücreleri kendi içinde bazal hücreler, luminal hücreler ve nöroendokrin hücreler olmak üzere üç farklı fenotipik ve fonksiyonel gruba ayrılmaktadır. Prostat epitelyal kök hücreleri genellikle bazal hücre tabakasında bulunmaktadır. Ayrıca epitel hücrelerin dış kısmında, bez epitelinin sararak ejakülasyon sırasında prostatik sıvıların üretraya boşaltılmasında rol oynayan fibro-müsküler bir stromal yapı da bulunmaktadır. Prostat stroması ise çoğunlukla düz kas ve fibroblast hücrelerinden oluşmaktadır. Bununla birlikte endotelial hücreler, kan damarları, lenfatik damarlar, sinirler, adipositler bağışıklık hücreleri ve mezenkimal kök hücrelerini de içermektedir. Stromal yapının prostatın gelişimi, yapısı ve fonksiyonu üzerinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Canesin, 2021; Gautner, & Prins, 2018).

A)



B)



Şekil 9. A) Prostat bezinin anatomik bölgeleri. B) Prostat kanalının histolojisi (Rebello ve ark. 2021)

2.6.2.2. Gleason skorum sistemi

PK derecelendirme sistemi, 1996 ve 1974 yılları arasında Donald Gleason ve Veterans Administration Kooperatif Ürolojik Araştırma Grubu tarafından geliştirilmiştir. Bu sistem, kanserin histolojik özelliklerini tanımlamak için 2 ile 10 arasında değişen Gleason skorları kullanmaktadır ve histolojik kalıplar 1 ile 5 arasında derecelendirilmektedir. 2005 ve 2014 yılları arasında özellikle düşük puanların derecelendirilmesi ve kanserin prognozunu daha doğru şekilde değerlendirilmesi amacıyla yapılan revizyonlarla, Gleason derecelendirmesi klinik uygulamada daha etkili olabilmektedir. 2014 Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP) konsensusuna göre, Gleason 4 paterniyle alakalı önemli bir güncelleme yapılmıştır. 10x büyütmede görülen elek benzeri, glomeruloid veya kaynaşmış bezler 2014 yılından sonra Gleason 4 olarak kabul edilmektedir (Epstein ve ark, 2015).

Gleason derecelendirmesi, hastaların prognozunu doğru bir şekilde yansıtmak için skoru derece gruplarına dönüştürmektedir. Gleason skoru 6 veya daha düşük olan hastalar genellikle iyi prognoza sahip derece grubu 1'e dahil edilmektedir. Gleason skoru 7 olan hastalar ise daha iyi prognoza sahip 3+4 ve daha kötü prognoza sahip 4+3

olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadır. Gleason skoru 8 ve üzeri olan kanserler ise daha kötü prognozlu olarak değerlendirilmektedir (Şekil 10). Sonuç olarak Gleason derecelendirme sistemindeki güncellemeler, kanserin prognozunu daha doğru bir şekilde yansıtmak ve tedavi kararlarını yönlendirmek amacıyla yapılmıştır. Bu yeni sistem, doğru tedavi kararlarını vermeyi hedeflemektedir (Epstein ve ark., 2015; Sehn, 2018).

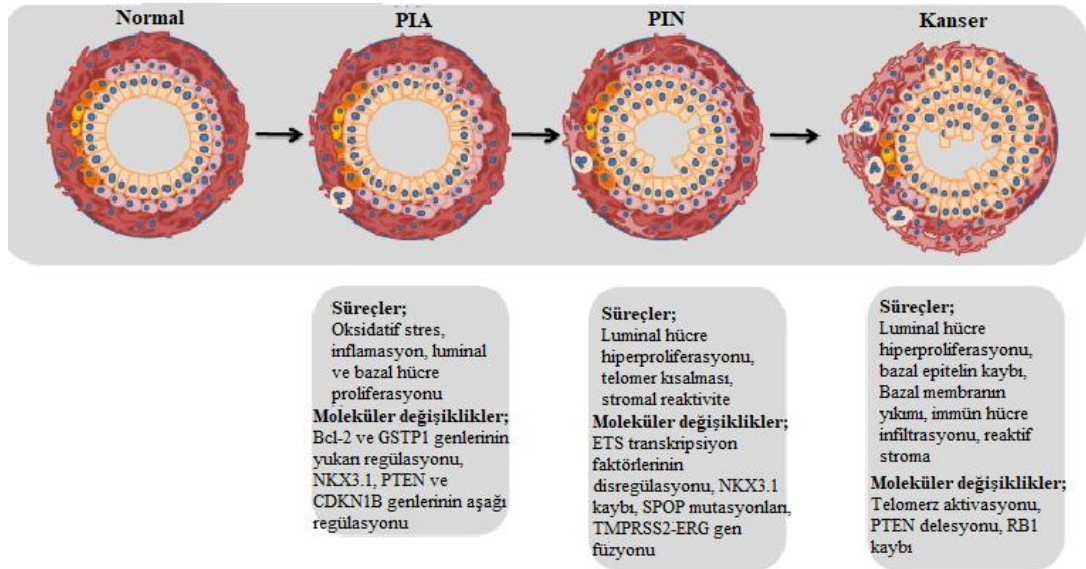
Derece Grubu (Gleason Skoru)	
	Derece Grubu 1 (GS 3+3=6) Sadece ayrı, tekil ve düzgün biçimlenmiş bez yapıları
	Derece Grubu 2 (GS 3+4=7) Baskın olarak düzgün biçimlenmiş bez yapıları bulunan, daha az oranda ise kötü oluşmuş, kaynaşmış veya delikli bez yapıları içeren bir yapı
	Derece Grubu 3 (GS 4+3=7) Baskın olarak kötü oluşmuş, kaynaşmış veya delikli bez yapıları bulunan, daha az oranda ise düzgün biçimlenmiş bez yapıları içeren bir yapı
	Derece Grubu 4 (GS=8) 4+4: Sadece kötü oluşmuş, kaynaşmış veya delikli bez yapıları 3+5: Ağırlıklı olarak iyi oluşmuş bez yapıları ve daha az oranda bez yapılarından yoksun bileşenler 5+3: Baskın olarak bez yapılarından yoksun ve daha az oranda iyi oluşmuş bez yapıları
	Derece Grubu 5 (GS= 9-10) Bez oluşumunun olmaması (veya nekrotik bez yapıları) ve kötü oluşmuş/ kaynaşmış ve delikli bez yapıları

Şekil 10. Gleason skorumaya göre derece grupları (Guerra ve ark., 2023).

2.6.2.3. Prostat kanserinin moleküler patogenezi

Son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojileri prostat kanserinin genomik ve transkriptomik yapısını ayrıntılı bir şekilde ortaya koymuştur ve tümörlerdeki klonal hiyerarşi ve karsinogenez süreci hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Prostat tümörlerinde nokta mutasyonu oranı nispeten düşük olmasına rağmen, kopya sayısı değişiklikleri ve çoğunlukla sürücü genleri etkileyen yapısal genomik yeniden düzenlemeler oldukça yaygın olarak görülmektedir. Bu düzenlemeler arasında özellikle PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkili olan *PTEN* kaybı ve *AR* geninin kopya sayısındaki artış bulunmaktadır. Ek olarak, *TP53*, *ATM*, *MED12*,

FOXA1, *COL5A1* gibi genlerde düşük sıklıkta ancak anlamlı mutasyonlar saptanmıştır. Ayrıca, yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) PK ile ilişkili 77'den fazla tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır. Tanımlanan SNP'lerin önemli bir kısmı kodlamayan bölgelerde yer almaktadır ve özellikle 8q24 lokusu ve onkogen c-MYC yakınındaki bölgeler öne çıkmaktadır. Moleküler sinyal iletim yolları açısından değerlendirildiğinde ise, AR sinyallemesinin PK gelişimi ve ilerlemesinde merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar NF- κ B, PI3K/AKT, MAPK, EGFR, Wnt/ β - katenin, FGFR, IGF-1R ve STAT3 gibi sinyal yollarının da PK patogeneğinde önemli katkılarına olduğunu göstermiştir. Prostat adenokarsinomlarının kökeninde, bazal veya luminal hücrelerde meydana gelen somatik genetik değişimlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu değişimler prostatik epitelyal neoplazi (PIN) ve atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP) gibi premalign lezyonlardan adenokarsinom gelişimine ve metastatik evreye geçişe kadar olan süreci yönlendirmektedir (Şekil 11). Aynı zamanda, süreç içerisinde biriken genetik ve epigenetik değişiklikler hastalığın moleküler heterojenitesine de katkı sağlamaktadır (Kulaç, Roudier, & Haffner, 2024; Attard ve ark., 2016; Mitchell, & Neal, 2015; Ramalingom, Ramamurthy, & Njar, 2017).



Şekil 11. Prostat kanseri gelişiminde rol oynayan süreçler ve moleküler değişiklikler (Packer, & Maitland, 2016).

2.6.2.3.1. Lokalize prostat kanserinin moleküler mekanizmaları

PK, genetik ve moleküler düzeyde oldukça heterojen bir hastalık olmakla birlikte, tümörün erken evresinden itibaren çeşitli genetik değişiklikler yoluyla *ETS* gen füzyonları, *SPOP* mutasyonları, *FOXA1* mutasyonları, *IDH1* mutasyonları ve *PTEN* kayıpları olmak üzere farklı alt tiplere ayrılabilir. Bu genetik değişiklikler genellikle birbirini dışlayan şekilde meydana gelmektedir ve tümör gelişiminin erken evresi olan lokalize hastalık evresinde görülmektedir. PK'nin yaklaşık %50'sinde *ETS* ailesi transkripsiyon faktörlerini içeren gen füzyonları görülmektedir. Bu en füzyonlarının en yaygın görüleni, *TMPRSS2* geninin androjene duyarlı promotörünün *ERG* geni ile füzyon gerçekleştirdiği *TMPRSS2-ERG* füzyonu olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra, *TMPRSS2*'nin *ETV1*, *ETV4* ve *ETV5* ile füzyonları da tanımlanmıştır. Bu füzyonlar, AR sinyalleşmesine bağlı olarak *ERG* ekspresyonunun artmasına neden olmakta ve genellikle lokalize PK'nde hatta yüksek dereceli PIN lezyonlarında bile saptanabilmektedir. *ERG* füzyonları, WNT/ β - katenin, NOTCH ve PI3K gibi onkogenik yolları aktive ederek tümör ilerlemesine katkı sağlayabilmektedir. Lokalize PK'nde görülen diğer önemli değişiklik de *SPOP* mutasyonlarıdır ve PK'nde yaklaşık %6-15 oranında görülmektedir. Bu mutasyonlar çoğunlukla, *SPOP* geninin substrat tanıma bölgesinde meydana gelmektedir ve *ETS* füzyon pozitif PK vakalarında görülmemektedir. *SPOP* mutasyonu, AR ve BRD4 gibi hedef genlerin übikitinasyon yoluyla yıkımını engelleyerek bu proteinlerin hücre içinde birikmesine neden olmaktadır. Bu durum AR sinyalizasyonunu ve PI3K/ Akt yolunun aktivasyonunu sağlayabilmektedir. *FOXA1*, AR transkripsiyonel aktivitesini düzenleyen öncü bir faktör olmakla birlikte mutasyonları PK vakalarının yaklaşık %4'ünde görülmektedir. Bu mutasyonlar genellikle DNA'ya bağlanma bölgesinde yer almakta ve *FOXA1*'in gen ekspresyonunu düzenleme yetisini değiştirerek AR sinyalleşmesini arttırabilmektedir. *FOXA1* mutasyonları hem lokalize hem de metastatik ve kastrasyona dirençli PK'nde saptanabilmektedir. Lokalize PK'nde görülen diğer bir genetik alt tip de *IDH1* mutasyonlarıdır ve PK'nde %1 civarında görülmektedir. Bu mutasyonların en yaygın olanı R132 pozisyonundaki mutasyondur ve hücredeki α -ketoglutarat düzeyini azaltarak DNA ve histonların hipermetilasyonuna neden olmaktadır. Bu durum gen ekspresyonunun geniş çapta yeniden düzenlenmesine ve tümör hücrelerinin farklılaşma özelliklerinin değişmesine yol açmaktadır. Lokalize

PK'nde %10-20 oranında görülen *PTEN* tümör baskılayıcı geninin kaybı PK'nde sık görülen ve en önemli moleküler değişikliklerden biri olarak bilinmektedir. *PTEN* kaybı genellikle homozigot delesyon şeklinde olmaktadır ve FISH ve immunohistokimya teknikleriyle tespit edilebilmektedir. Bu moleküler değişiklik, PI3K-AKT-mTOR yolunun aktivasyonuna neden olmakta ve bu şekilde hücrel proliferasyonu ve sağkalımı arttırmaktadır (Arora, & Barberi, 2018; Inamura, 2018; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016; Rebello ve ark., 2021).

2.6.2.3.2. Metastatik PK'nin moleküler mekanizmaları

Metastatik PK (mPK), prostat beziyle sınırlı olmayan, sıklıkla lenf nodları veya kemik metastazlarını da içeren ileri evre hastalığı kapsayan heterojen bir hastalıktır. MPK, *de novo* metastatik kastrasyon sensitive PK (mKSPK) ve androjen yoksunluk tedavisi (ADT) sırasında veya sonrasında gelişen metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK) olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır. Bu tümörler moleküler düzeyde, lokalize prostat kanserine kıyasla belirgin şekilde artmış bir mutasyon yükü ve kopya sayısı değişikliği (CNA) sıklığı göstermektedir. MKSPK'nden mKDPK'ne ilerleyen hastalarda yapılan eşleştirilmiş genomik analizler, mKSPK evresinde AR genindeki mutasyonlarının oranının yalnızca %2-6 arasında olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte *PTEN* geninin bulunduğu kromozom 10q bölgesinde homozigot delesyonlar mKSPK tümörlerinin %12-17'sinde tespit edilmiştir. Bu bulgular, *PTEN* kaybının, hastalığın erken evrelerinden itibaren var olabileceğini göstermektedir. Lokalize PK'nde nadir olarak gözlemlenen *TP53* ve *RB1* mutasyonları, metastatik hastalığa geçişte belirgin bir şekilde artmaktadır. Bu genlerdeki değişiklikler, mKSPK tümörlerinin sırasıyla %27 ve %5'inde görülmektedir. Benzer şekilde, PI3K-AKT-mTOR yolunda yer alan genlerdeki mutasyonlar da mKSPK'nde anlamlı düzeyde artış göstermekte ve bu tür değişiklikler mKSPK vakalarının %35-40'ında rapor edilmektedir. Ek olarak, Wnt sinyal yolu bileşenlerindeki değişiklikler mKSPK hastalarının %10-20'sinde meydana gelmektedir. Ayrıca, immüno-onkoloji açısından önemli bir gen olan CDK12, mKSPK hastalarının yaklaşık %5'inde mutasyona uğramaktadır. Bu mutasyonlar, tümör immünitesi üzerinde etkili olabilecek neoantijenlerin yükünün artışıyla ve özellikle bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine karşı dirençle ilişkilendirilmiştir (Arora, & Barbieri, 2018; Rabello ve ark., 2021;

Eecken ve ark., 2021; Robinson ve ark., 2015).

2.6.2.3.3. Kastrasyona dirençli mPK (mKDPK)'nin moleküler mekanizmaları

PK, başlangıçta androjen bağımlı bir kanser türü olmasına rağmen, hastalık ilerledikçe androjen deplesyon tedavisine (ADT) karşı direnç gelişimiyle karakterize olan kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK)' ne dönüşebilmektedir. KDPK'nin metastatik formu olan mKDPK, PK'nin genomik olarak oldukça heterojen ve karmaşık bir alt tipi olarak tanımlanmaktadır. Yapılan genom düzeyindeki çalışmalar, mKDPK'nde yüksek oranda somatik mutasyonların varlığını ortaya koymuştur. Tümör örneklerinin geniş ölçekli dizilenmesine dayalı analizlerde, mKDPK vakalarından %35'inde TP53, %19' unda AR ve PTEN, %13' ünde FOXA1, %9'unda SPOP ve RB1 mutasyonlarının yer aldığı gösterilmiştir. Bu mutasyonlar, PI3K/AKT, Wnt, DNA hasar onarımı (DDR), hücre döngüsü ve epigenetik düzenlemeler gibi temel hücresel yollarda ve süreçlerde rol almaktadır. MKDPK'nin en belirgin ve önemli özelliklerinden biri, AR sinyalizasyonunun yeniden aktive olmasıdır. Bu aktivasyon, *AR* amplifikasyonu, nokta mutasyonları, genomik yapısal yeniden düzenlemeler (AR-GSR) ve ekson ekleme varyantları (AR-V'ler) gibi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özellikle AR-V7 gibi AR varyantları, ligand bağlanma bölgesi içermemelerine rağmen transkripsiyonun aktivasyonunu sağlayarak, hastalığın androjen bağımsız progresyonuna neden olmaktadır. Prostat kanserine özgü en yaygın kromozomal düzenlemelerden biri, TMPRSS2'nin androjene yanıt veren promotor elemanları ile ETS ailesinden ERG transkripsiyon faktörü ile birleşerek oluşturduğu ve ERG'nin anormal ekspresyonuna yol açan TMPRSS2-ERG füzyonudur. TMPRSS2'nin ETS ailesi üyeleri ile füzyonlarının PK'lerinin yaklaşık %50'sinde görüldüğü ve özellikle epigenetik hipermetilasyon, Wnt/Notch sinyal yolunun aktivasyonu ve PI3K/AKT sinyalleme ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, hastalığın ilerleyen evrelerinde *PTEN*, *TP53* ve *RBI* gibi tümör baskılayıcı genlerdeki kayıpların da önemli bir rol oynadığı vurgulanmaktadır. *PTEN* delesyonları ve *TP53/RBI* mutasyonları, genomik instabilite, apoptoz direnci ve hücresel proliferasyonda artışla ilişkilidir. Son olarak, mKDPK'de *CDK12*, *ZFHX3*, *MLL2* ve *IDH1* gibi diğer genlerde de tekrarlayan mutasyonlar tanımlanmış; ayrıca gen füzyonları, delesyonlar, tandem duplikasyonlar ve kromozomlar arası translokasyonlar

gibi yapısal varyantların (SV) hastalığın moleküler heterojenitesine katkı sunduğu gösterilmiştir. Bu veriler, mKDPK'nın genomik düzeyde oldukça karmaşık bir hastalık olduğunu ve tedaviye direnç mekanizmalarının çok boyutlu olduğunu göstermektedir (Merseburger ve ark., 2021; Tong, 2021; Hatano, & Nonomura, 2021; Feng ve ark., 2022; Robinson ve ark., 2015; Quigley ve ark., 2018).

2.6.3.Prostat kanseri tedavisi ve klinik uygulamalar

PK tedavisi için hastalığın evresine bağlı olarak birçok tedavi seçeneği bulunmaktadır. Lokal PK tanısı alan erkeklerde bekle-gör yöntemi, cerrahi müdahale(prostatektomi) ve radyoterapi olmak üzere üç temel tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bekle-gör yöntemi bekleyici yaklaşım ve aktif gözlem olarak iki ana yaklaşıma ayrılmaktadır ve hastalık ilerlemesi açısından hastayı izlerken aktif bir tedavi uygulamamayı ifade etmektedir. Bekleyici yaklaşımda yalnızca semptomlar ortaya çıktığında tedavi uygulanırken aktif gözlem yaklaşımında ise hastalığın anlamlı hale gelip gelmediği PSA testleri, prostat biyopsileri, fizik muayeneler gibi yöntemlerle sürekli kontrol edilmekte ve hastalık ilerlediğinde tedaviye başlanmaktadır. İleri evre PK, cerrahi veya radyasyon sonrasında nüks eden ya da tanı anında metastatik olan PK'ni ifade etmektedir ve bu hasta grubunda tedavi seçimi günden güne daha kişiselleştirilmiş hale gelmektedir. 1940'lardan günümüze temel tedavi olarak süregelen ADT, testis kaynaklı testesteron üretiminin baskılanmasını hedeflemektedir. ADT, luteinize edici hormon (LHRH) antagonistleri aracılığıyla farmakolojik olarak ya da orşiektomi aracılığıyla cerrahi olarak uygulanabilmektedir. MKSPK yönetimi, yüksek ve düşük hacimli hastalık kriterlerine göre şekillendirilmektedir. Yüksek hacimli hastalık, visseral metastazların varlığını veya pelvis ya da omurilik dışındaki kemiklerde en az dört metastaz olmasını ifade etmektedir. MKSPK için güncel tedavi seçenekleri arasında abirateron, apalutamide, enzalutamide gibi AR inhibitörleri ve docetaxel yer almaktadır. Bu ajanların, hastalığın erken döneminde ADT ile kombine edilmesi hastaların genel sağkalımı üzerinde belirgin bir avantaj sağlamaktadır. MKDPK tedavisinde ise abirateron, enzalutamide, apalutamide ve darolutamide gibi yeni nesil androjen sinyal inhibitörleri (ASi) yer almaktadır. Bunların yanında, docetaxel ve cabazitaxel gibi taksan bazlı mikrotübül inhibitörleri de genel sağ kalıma (OS) katkı sağlamaktadır. Hastalığın ileri

evrelerinde kullanılan Radium-223, özellikle kemik metastazlarında tercih edilen bir ajandır. Bir dentritik hücre aşısı olan Sipuleucel-T'nin ise bağışıklık sistemini hedefleyen bir ajan olarak visseral metastazı olmayan hastalarda anlamlı OS katkısı gösterdiği bulunmuştur. Bu gelişmelerin ışığında özellikle ileri PK tedavisinde, hastalık biyolojisine, moleküler alt tiplere ve direnç mekanizmalarına göre tedavi yöntemleri şekillendirmek giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Genomik profil analizleri ve biyobelirteçlerin klinik uygulamalara entegrasyonu, uygun ajan seçimi ve sıralaması açısından yeni soruları gündeme getirmekte, kişiselleştirilmiş tıbbın önemini artırmaktadır. Bu alanda yürütülen prospektif ve retrospektif çalışmalar, optimum tedavi dizilemesi ve kombine tedavi yaklaşımlarını belirlemek amacıyla değerli bilgiler sağlamaya devam etmektedir (Litwin, & Tan, 2017; Trewartha, & Carter, 2013; Swami ve ark., 2020; Komura ve ark., 2017; Gillessen ve ark., 2023; Yamada, & Beltran, 2021).

2.6.3.1. Taksan bazlı kemoterapötik ajanlar ve Cabazitaxel

Taksan bazlı kemoterapötikler, hücre bölünmesi, sinyal iletimi ve hücre içi taşıyım gibi temel işlevlerde görev alan mikrotübüllerin yapılarını stabilize ederek bu dinamik sistemlerin bozulmasına neden olmaktadır. Bu ajanlar, mikrotübüllerin dimerizasyonunu engelleyerek hücre döngüsünü metafaz evresinde durdurmakta ve bu olayın sonucunda da apoptoz sürecini başlatmaktadır. Bununla birlikte, anti-apoptotik proteinlerden biri olan Bcl-2'nin fosforilasyonu yoluyla inhibisyonunu sağlayarak pro-apoptotik etkiyi güçlendirmektedir. İkinci nesil taksan bazlı kemoterapötik ajanlardan biri olan docetaxel, ilk nesil taksan bazlı kemoterapötik olan paclitaxelin daha aktif bir türevidir ve 2004 yılında mKDPK hastalarının tedavisi için FDA onayı almıştır. Bu ajan mikrotübül stabilizasyonuna ek olarak, AR bağımlı gen ekspresyonunu da baskılayabilmektedir ve bu yolla PSA üretimini azaltabilmektedir. Ancak hastalarda docetaxel direnci görülebilmektedir. Taksanlara karşı dirençte çok faktörlü mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar arasında P-gp aracılı ilaç dışı atılımı, β -tübülün izoformlarında meydana gelen değişiklikler ve apoptoz sinyalleme yollarının bozulması bulunmaktadır. 2010 yılında, docetaxel sonrası progresyon gösteren mKDPK hastalarında kullanım için FDA tarafından onay alan cabazitaxel, P-gp'ye karşı düşük afinitesi sayesinde çoklu ilaç direnci geliştiren tümör hücrelerinde

etkinliğini koruyabilen bir ajan olarak dikkat çekmektedir. Çeşitli kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda, cabazitaxelin güçlü antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan TOPIC faz III çalışmasında, docetaxel tedavisine dirençli 755 mKDPK hastası incelenmiş ve Cabazitaxel' in prednizon ile tedavisi ile mitoksantron ve prednizonun beraber tedavisi karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada Cabazitaxel'in, genel sağkalım süresini anlamlı olarak uzattığı bulunmuştur. Bununla birlikte Cabazitaxel tedavisindeki en sık görülen yan etki ateşli nötropeni olarak rapor edilmektedir ve bu sebeple nötropenik komplikasyon riskini azaltmak amacıyla büyüme faktörü desteği ve doz modifikasyonları önerilmektedir (Pobel ve ark., 2021; Paller, & Antonarakis, 2011; Michielsen, Braeckman, & Denis, 2011; Galsky ve ark., 2010; Yap, Pezaro, & de Bono, 2012).

2.6.4. PK'nde redoks adaptasyonu ve Cabazitaxel duyarlılığı ilişkisi

Redoks adaptasyonu, artmış ROS seviyelerine karşı kanser hücrelerinin geliştirdiği dinamik bir savunma yanıtıdır ve kemoterapiye direnç, tümör progresyonu ve metastaz ile doğrudan ilişkilidir. Bu süreçte hücreler, oksidatif stresi tolere edebilmek adına antioksidan savunma sistemlerini yeniden yapılandırmakta, özellikle HIF-1 α , NF- κ B ve Nrf2 gibi redoks-duyarlı transkripsiyon faktörlerini yukarı yönde düzenlemektedir. Bu moleküler değişimler, PK hücrelerinin sitotoksik ROS seviyelerinde dahi hayatta kalmasına olanak tanıyarak Cabazitaxel dahil birçok kemoterapötik ajana karşı duyarlılığı azaltmaktadır. Yakın tarihli çalışmalar Cabazitaxel'in, sestrin-3 ekspresyonunun inhibe ederek endojen ROS üretimini arttırdığını, dolayısıyla pro-oksidan ajan olarak da işlev gördüğünü göstermektedir. Ancak yapılan çalışmalarda, redoks adaptasyonu kazanan PK hücrelerinde artan NF- κ B, Nrf2 ve HIF-1 α düzeyleri, mitokondriyal membran bütünlüğünün korunması ve glutatyon seviyelerinin yüksek olması nedeniyle Cabazitaxel'in pro-oksidan etkisinin baskılandığı ve ilaca olan yanıtın azaldığı rapor edilmiştir. Mevcut veriler, PK hücrelerinde redoks adaptasyonunun Cabazitaxel duyarlılığını azalttığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu durum redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin yukarı düzenlenmesi, ROS detoksifikasyonu sistemlerin güçlenmesi ve mitokondriyal stres toleransının artışı gibi moleküler düzeyde değişimlerle ilişkilidir. Dolayısıyla, redoks adaptasyonunu hedefleyen stratejilerin, Cabazitaxel etkinliğini artırma potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir (Eryılmaz, Egeli, & Çeçener 2024; Endo ve ark., 2021).

2.7. RNA İnterferans Mekanizması Aracılığı ile Gen İfadesinin Düzenlenmesi

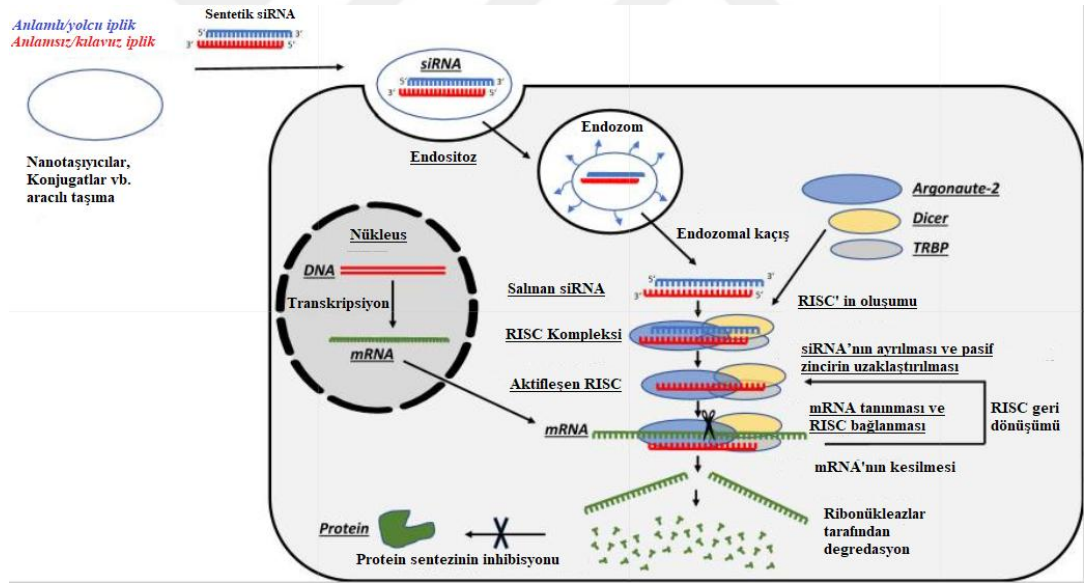
RNA interferans (RNAi), çift sarmallı RNA (dsRNA) moleküllerinin aracılık ettiği, gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzeyde susturulmasını sağlayan oldukça etkili bir mekanizma olarak bilinmektedir. Bu süreç ilk kez 1998 yılında Craig Mello ve Andrew Fire tarafından tanımlanmıştır. Bu mekanizma taksonomik olarak oldukça korunmuş bir süreçtir. RNAi'nin başlıca araçları, küçük girişimci RNA'lar (siRNA'lar) ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) gibi kısa RNA dupleksleridir. Bu moleküller, ribonükleaz III ailesine ait olan Dicer enzimi tarafından uzun çift sarmallı RNA transkriptlerinden kesilerek üretilmektedir. Dicer enzimi, N-ucu RNA helikaz, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) RNA bağlayıcı alanı, iki RNaz III alanı ve dsRNA bağlanma alanından oluşmaktadır. Bu yapısı sayesinde, 3'-uçta iki nükleotidlik çıkıntılara sahip, 5'-fosfat ve 3'-hidroksi grupları taşıyan 21 ila 23 nükleotid uzunluğundaki kısa RNA çiftleri oluşturulmaktadır (Aigner, 2006; Duxbury, & Whang, 2004). Oluşan siRNA'lar, RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) adı verilen, Argonaute proteinleri ve diğer yardımcı proteinleri içeren çok proteinli bir komplekse yüklenmektedir. RISC, çift sarmallı siRNA'nın yolcu ipliğini uzaklaştırmakta ve kılavuz ipliği hedef mRNA ile eşleştirmektedir. Tamamlayıcı bağlanma gerçekleştiğinde, Argonaute 2 aracılığıyla mRNA'nın endonükleolitik kesimi ve ardından bozulması sağlanmaktadır (Bobbin, & Rossi, 2016; Caplen, & Mousses, 2003; Sharp, & Zamore, 2000; Şekil 12). RNAi mekanizması, yalnızca endojen süreçlerin düzenlenmesinde değil, aynı zamanda terapötik ve deneysel gen susturma uygulamalarında da yaygın şekilde kullanılmaktadır. RNAi yoluyla gen susturma, miRNA taklitleri, siRNA'lar, kısa saç tokası RNA'ları (shRNA) ve Dicer substrat RNA'ları (dsRNA) gibi çeşitli küçük RNA türlerinin hücreye iletilmesiyle sağlanmaktadır. Ancak RNAi'nin memeli hücrelerinde kullanımı bazı zorluklar içermektedir. Uzun dsRNA'ların memeli hücrelerine doğrudan verilmesi, dsRNA-bağımlı protein kinaz (PKR) aktivasyonunu tetikleyerek spesifik olmayan translasyonel duraklamaya, interferon üretimine ve apoptoza neden olabilmektedir. Bu nedenle, siRNA'lar gibi daha kısa RNA çiftleri tercih edilmekte ve bu moleküllerin etkili biçimde hücre içine alınabilmesi için lipozomal veya amin-bazlı transfeksiyon koşullarının optimize edilmesi gerekebilmektedir (Bobbin, & Rossi, 2016).

RNAi, gen ifadesinin postranskripsiyonel düzeyde spesifik olarak baskılanmasını sağlayan güçlü bir moleküler araçtır. Bu mekanizma, özellikle kanser gibi genetik bozuklukların önemli rol oynadığı kompleks hastalıkların tedavisinde umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir. RNAi' nin en etkili formlarından olan siRNA' lar, hedef mRNA'yı tanıyarak spesifik susturma sağlamaktadır. Bu özgüllük, özellikle mutasyona uğramış onkogenler ve kansere özgü genlerin susturulmasında büyük avantaj sunmaktadır. SiRNA'nın terapötik etkisinin değerlendirilmesi süreci genellikle *in vitro* kanser hücrelerinde başlamakta ve ardından uygun hayvan modellerinde *in vivo* doğrulama ile devam etmektedir. İlk aşamada, RNAi aracılı baskılamaya yönelik hedef genlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu genler büyüme faktörleri, anjiyogenik sinyaller ve apoptotik mekanizmalarda görev alan, mutasyona uğramış ya da yüksek seviyelerde ifade edilen genler olabilmektedir. Ayrıca siRNA dizilerinin tasarımı, hedef mRNA dizisiyle yüksek özgüllükte eşleşme sağlayacak şekilde optimize edilmelidir. Günümüzde bu amaç için geliştirilen biyoinformatik yazılımlar, araştırmacıların hedef dışı etkilerden kaçınarak en etkili dizileri seçmelerini sağlamaktadır. Seçilen siRNA'ların doğrulanması, hedef genin mRNA ve protein düzeylerindeki azalma ile proliferasyon, morfolojik değişiklikler ve apoptozun değerlendirilmesi gibi çeşitli işlevsel analizler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Mansoori, Shotorbani, & Baradaran, 2014; Takeshita, & Ochiya, 2006).

PK gelişiminde rol oynayan EGFR, c-MYC, Wnt/ β -katenin, NF- κ B ve AKT gibi sinyal yollarının RNAi ile baskılanmasının, PK tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlere ek bir tedavi stratejisi sağlayabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, IL-8'in siRNA aracılı sessizleştirilmesinin CXCR7 ekspresyonunun seviyelerini düşürerek bu sayede proliferasyonu azalttığı ve hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olduğu görülmüştür. Ayrıca CXCR7'ye karşı shRNA kullanımının VEGF, siklin D1 ve p-EGFR düzeylerini düşürerek PK ksenograft tümörlerini baskıladığı bulunmuştur. Bununla birlikte VEGF'nin siRNA aracılı baskılanmasının tümör büyümesi ve kemik metastazını inhibe ettiği ve PKC- ζ ve C-FABP gibi metastazla ilişkili genlerin siRNA ile hedeflenmesinin maligniteyi azalttığı belirlenmiştir (Boccelino ve ark., 2015; Wannenes ve ark., 2005). Yapılan diğer bir çalışmada ise, KDPK'nde KLF6-SV1 genlerinin sessizleştirilmesinin, proliferasyonu ve tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı ve P2XL ve L1CAM gibi metastatik

onkogenlerin siRNA ile inhibisyonunun hücre göçü ve invazyonu azalttığı gösterilmiştir (Boccelino ve ark., 2015). Saeinasab ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, EpCAM aptameri ile modifiye edilmiş ZIF-8 nanopartiküllerinin, SNHG15'i hedefleyen siRNA'ların stabilitesini ve hedefe iletimini arttırarak tümör büyümesinin azalmasını ve apoptozun artmasını sağladığı bulunmuştur (Saeinasab ve ark., 2024). Ayrıca, enerji metabolizmasının siRNA aracılığı ile hedeflendiği çalışmalar da mevcuttur ve bu çalışmalarda ATP düzeylerinin azalmasının mitokondriyal fonksiyonların bozulması aracılığı ile tümör büyümesini azalttığı görülmüştür (Chen ve ark., 2023).

Sonuç olarak, RNAi tabanlı gen sessizleştirme yaklaşımları, PK dahil birçok kanser türünde tümör büyümesini, metastazı ve anjiyogenezi inhibe etmede etkili olabileceği ve nano-taşıyıcılar gibi taşıyıcı sistemlerle birlikte kullanıldığında klinik potansiyelinin artabileceği düşünülmektedir.



Şekil 13. siRNA aracılı sessizleştirmenin şematik gösterimi (Friedrich, & Aigner, 2022).

2.8. Tez Çalışmasının Amacı

Mevcut tez çalışmasında, siRNA aracılı NF- κ B p65 alt birimi sessizleştirmesinin oksidatif stres direnci bulunan mPK hücrelerinde Cabazitaxel monoterapisinin apoptotik etkilerini ne ölçüde değiştirdiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Mevcut amaç doğrultusunda, ana hücre hattı olarak tez çalışması sırasında LNCaP

hücre hattında hidrojen peroksit direnci oluşturulmasıyla elde edilen ve çeşitli validasyon yöntemleriyle direnç fenotipi gösterdiği belirlenen LNCaP-HPR5M hücre hattı ve parental hücre olarak AR (+) hormona duyarlı metastatik PK hücre hattı LNCaP kullanılmıştır. Bu oksidatif strese direnç fenotipini yansıtan hücre hattında öncelikle Cabazitaxel'in hücre canlılığı ve sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla belirli doz/zaman aralıklarında hücre canlılığı, hücre ölümü ve hücre içi ROS artışı analizleri gerçekleştirilmiştir. siRNA sessizleştirmesinin optimizasyonu amacıyla hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda siRNA transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyonun optimizasyonu ve validasyonu mRNA ve protein ekspresyonu seviyelerinin değerlendirilmesi ile sağlandıktan sonra Cabazitaxel ve siRNA transfeksiyonu için etkin konsantrasyon ve zaman aralığı belirlenerek, NF- κ B p65 alt birimi sessizleştirmesinin Cabazitaxel'in etkinliği üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hücre canlılığı, hücre ölümü, hücre içi ROS analizleri, multikaspaz analizi, NF- κ B ilişkili sinyal yolağı proteinlerinin (p65, p-p65, I κ B- α ve -I κ B- α) ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Laboratuvar donanımı ve cihazlar

- 152°C yatay tip derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- 86°C dikey tip ultra derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- 20°C dikey tip derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- 20°C yatay tip derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- +2°C - +8°C buzdolabı (Alaska, Türkiye)
- +2°C - +8°C dik tip şişe soğutucu (AsTerm, Türkiye)
- CO2 inkübatör (Panasonic, Japonya)
- Class II biyogüvenlik kabini (Laminar flow) (ScanLaf, Labogene, Danimarka)
- Inverted ışık mikroskobu (Euromex, Hollanda)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- Etüv (Ecocell, Siemens, Almanya)
- Santrifüj (NF 800R, Nüve, Türkiye)
- Şarjlı pipetör (Axygen MotoPet, Canadawide Scientific, Kanada)
- Mikropipet seti (Axygen, ABD)
- Çok kanallı pipet (Accumax, Hindistan)
- Mikropor şırınga filtresi (0.22 µM) (Merck Millipore, Almanya)
- Cell scraper small (Corning, ABD)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Microfuge 20R, Beckman Coulter, ABD)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Orbital çalkalayıcı (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
- Manyetik ısıtmalı karıştırıcı (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
- Mini rotatör (Biosan, Letonya)
- Combi-spin & vorteks (Biosan, Letonya)
- Hassas terazi (Radwag, ABD)
- Buz makinesi (Scotsman, ABD)

UV-Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD)
Multimode mikropate okuyucu (Berthold Technologies, Almanya)
Thermal cycler (Bio-Rad, ABD)
ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, ABD)
StepOnePlus™ Real Time-PCR System (Applied Biosystems, ABD)
Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, ABD)
Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, ABD)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad, ABD)
C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR, ABD)

3.1.2. Kimyasallar ve sarf malzemeler

Dimetil sülfoksit (DMSO) (VWR International, ABD)
Kloroform (Merck, Almanya)
Etanol (Isolab, Almanya)
Metanol (Merck, Almanya)
Paraformaldehit (Merck, Almanya)
Hidrojen peroksit solüsyonu %30 (w/w) H₂O (Sigma-Aldrich, Almanya)
Tripın mavisi solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Hoechst 33258 (Merck, Almanya)
Cabazitaxel %99,88 (TargetMol, ABD)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium with L-glutamine (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Trypsin-EDTA (0,25%), phenol red (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X
Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Antibiyotik/Antimikotik solüsyonu (100x) (Capricorn Scientific, Almanya)
Sodyum pirüvat (100 mM) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Cell Proliferation Colorimetric Reagent, WST-1 (ScienCell, Carlsbad, ABD)
Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)
Muse® Oxidative Stress Kit (Merck Millipore, Almanya)
Muse® Multicaspase Kit (Merck Millipore, Almanya)
Invitrogen™ CM-H₂DCFDA 20x50µg (General Oxidative Stress Indicator) (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Dihydroethidium (Hydroethidine) 10x1mg (Thermo Fisher Scientific, ABD)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, ABD)
RIPA Lizis Buffer (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
Proteaz ve Fosfataz İnhibitör Kokteyli (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Precast Gels (Bio-Rad, ABD)
2X Reducing Protein Loading Buffer (Cell Signaling Technology, ABD)
Prestained Protein Ladder (5- 245 kDa) (Cell Signaling Technology, ABD)
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0.45µm (Bio-Rad, ABD)
10X Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad, ABD)
10X Tris/Glycine Buffer (Bio-Rad, ABD)
Ponceau S solüsyonu (Sigma-Aldrich, Almanya)
Nonfat dry milk (Cell Signaling Technology, ABD)
Tris Buffered Saline with Tween 20, 20X (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich, Almanya)
SuperSignal™ Western Blot Enhancer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Nüklear faktör-κB p65 (p-p65 NF-κB) fosfo S536 rabbit poliklonal, Nüklear faktör-κB p65 rabbit poliklonal ve Aktin-β rabbit poliklonal Primer Antikorları (Abcam, Birleşik Krallık)
Cleaved Caspase-3 (Asp175) rabbit poliklonal, IκBα (44D4) rabbit poliklonal ve Phospho-IκBα (Ser32) (14D4) rabbit monoklonal Primer Antikorları (Cell Signaling Technology, ABD)
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) poliklonal sekonder antikor (Abcam, Birleşik Krallık)

3.2. Yöntem

Mevcut tez çalışmasında kullanılan yöntemler hücre kültürü yöntemleri olduğundan ve hasta materyali veya deney hayvanı kullanılmadığından çalışmada etik kurul iznine gerek duyulmamaktadır.

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Kullanılan hücre hatları

Androjen reseptör (AR) pozitif hormona duyarlı insan metastatik prostat karsinoma hücre hattı LNCaP (CRL-1740™) Bursa Uludağ Üniversitesi Tıbbi

Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Dr. Öğretim Üyesi Işıl Ezgi Eryılmaz' ın doktora tezinde kullandığı hücre hattı olup ücretsiz sağlandı. Hücre hattı stokları kültür aşamasına kadar -152°C 'de %5 DMSO içerisinde saklandı.

3.2.1.2. Hücre hattı stoklarının açılması

-152°C ' de saklanan donmuş haldeki hücre hatları 37°C 'de sıvı hale getirildikten sonra içerisindeki %5 DMSO' dan arındırılmak amacıyla steril koşullarda 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve 2000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelletinin üzerine hücre hattı için uygun besiyeri eklenerek süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler T25 filtreli kapaklı hücre kültürü flasklarına aktarıldı. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 ile desteklenen nemli inkübatörde steril ortamda inkübe edildi.

3.2.1.3. Hücre kültürü koşulları

3.2.1.3.1. LNCaP hücre kültürü

LNCaP hücre hattı, 2mM L-Glutamine, 1 mM sodyum pirüvat, 100 $\mu\text{g/mL}$ Streptomisin, 100 U/mL Penisilin ve %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri içerisinde kültüre edildi. Her 4-6 günde bir besiyeri değiştirilerek hücre kültürünün devamlılığı sağlandı.

3.2.1.4. Hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin kültüre edildiği flask içerisinde hücre yoğunluğu %70-80' in üzerine ulaştığında hücrelerin besi ortamı şarjlı pipetör ve serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Flaskın hücrelerin tutunduğu yüzeyi steril PBS ile temizlendi. Hücreleri tutundukları flask yüzeyinden ayırmak amacıyla flask boyutuna uygun miktarda %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler 37°C ' de 5% CO_2 etüvde 3-5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop altında kontrol edildi. Tripsin-EDTA solüsyonunun 2 katı kadar hacimde FBS içeren besiyeri eklenerek flasklardaki tripsinin inaktivasyonu sağlandı. Hücre süspansiyonu 15 mL' lik tüpe aktararak 2000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Hücre yoğunluğuna uygun olarak pellet üzerine yeterli miktarda besiyeri eklendi ve hücreler süspanse edildi. Hücreler yeni flasklara pasajlandı.

3.2.1.5. Hücre stoklarının hazırlanması

Hücrelerin stoklama işlemi gerçekleştirileceğinde, pasajlama sırasında pellet

haline getirilen hücre süspansiyonunun üzerine hücre yoğunluğuna bağlı olarak her vial için 950 µL FBS + 50 µL DMSO eklenerek hücreler oda sıcaklığından -20°C' ye kaldırıldı ve 1 saat bekletildikten sonra -152°C' ye alınarak stoklandı.

3.2.1.6. Hücre sayısının belirlenmesi

Hücre sayısı tripan blue boyama yöntemi kullanılarak Countess™ 3 FL Otomatik Hücre Sayım Cihazı (ThermoFisher Scientific, ABD) aracılığı ile gerçekleştirildi. Hücreler tripsinle kaldırıldı ve santrifüjle hücre pelleti elde edildikten sonra kendi besiyeri ile tekrar süspanse edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 10µL çekildi ve üzerine eşit miktarda tripan blue boyası eklendi ve pipetaj ile karışması sağlandı. Karışımdan 10 µL çekilerek Countess™ slaydına yerleştirildi ve cihazda otomatik sayım gerçekleştirildi.

3.2.2. Kullanılan ilaçların stok solüsyonlarının hazırlanması ve hücrelere uygulanmak üzere uygun konsantrasyonda dilüe edilmesi

3.2.2.1. Cabazitaxel

Cabazitaxel 99,88% saflıkta 20 mg/vial olmak üzere liyofilize şekilde TargetMol' den (Katalog No: T2543) temin edildi. İlacın ana stoğu DMSO ile hazırlandıktan sonra çözünen ilaç 0,22 µm'lik mikropor filtreden geçirildi. 25 µL' lik hacimlerde 0,2 mL'lik tüplere alikotlanan stok ilaç solüsyonları deney aşamasına kadar -80°C' de saklandı. Her deney öncesinde taze ana stoktan uygun dilüsyonlar hücre hattının besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi ve ilaç hücrelere uygulanabilir hale getirildi. Literatür taraması sonucunda Cabazitaxel uygulama dozları 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM ve 10 nM olarak belirlendi. En yüksek uygulama dozunda saf DMSO oranı 0,002%'nin altında tutuldu.

3.2.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) dirençli LNCaP hücre hattının (LNCaP-HPR5M) eldesi

İlk olarak parental LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM dozlar ile H₂O₂ uygulandı ve WST1 sitotoksosite testi ile doza ve zamana bağlı hücre duyarlılığı belirlendi. LNCaP hücre hattına 24 ve 48 saat H₂O₂ uygulanması sonucunda, 24 saatte ve 25 µM, 50 µM ve 100 µM dozlarda hücre canlılığı sırasıyla %80,53, %57,42 ve %46,71 olarak bulunduğundan direnç protokolünde 100 µM ve 24 saatlik doz kullanıldı. LNCaP hücreleri 5x10⁶ yoğunluğunda T25 flasklara ekildi ve hücrelere 60 gün boyunca düzenli aralıklar ile

24 saatlik 100 μ M H₂O₂ uygulandı. 60 gün sonunda hücreler T25'lik flasksı tamamen doldurduğundan T75'lik flaskslara pasajlanarak 60 gün daha aynı prosedürün tekrarı sağlandı. Parental LNCaP hücrelerinin canlılığını 24 saatte yaklaşık %50 oranında azaltan (IC₅₀) 100 μ M'lık doz için dirençli hücrelerde yaklaşık 3,53-kat direncin tespit edildiği 120.gün sonunda direnç protokolü tamamlandı ve elde edilen dirençli hücre hattına LNCaP-HPR5M adı verildi.

3.2.4. Sitotoksosite analizi

Hücrelerde sitotoksitenin analizi WST-1 reaktifi kullanılarak ölçüldü. WST-1, hücre çoğalması ve canlılığının spektrofotometrik yöntem aracılığı ile ölçülmesinde kullanılan kolorimetrik temelli ve tetrazolyum tuzu bazlı bir reaktiftir. WST-1 testi sitotoksosite analizleri için hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntem olup bu testin temeli, canlı hücrelerde WST-1 reaktifindeki tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine bağlı olarak koyu renkli formazan kristallerine parçalanmasına ve oluşan renk değişiminin kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek sayısal değerlere dönüştürülmesine dayanmaktadır. Hücrelerin sayısındaki artış, mitokondriyal dehidrogenazların genel aktivitesinde artışa neden olacağından tetrazolyum tuzlarının parçalanmasıyla oluşan formazan kristallerinin miktarı artmaktadır. Formazan kristallerinin miktarı hücre canlılığının azalması ile azalacağından renk skalasında artan doza bağlı olarak koyudan açık renge doğru geçiş gerçekleşmektedir ve bu geçiş sayısal olarak ölçülebilmektedir. Tez çalışması kapsamında yapılan literatür taraması baz alınarak parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücre hatlarında Cabazitaxel için 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde farklı dozda (0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM) sitotoksosite analizi gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücreleri, her bir hücre hattı için ve her kuyu başına 15x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi. Ekilen hücrelere belirlenen süre ve dozlarda Cabazitaxel uygulandı ve 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyuya 10 μ L WST-1 reaktifi eklendi. Reaktifin hücreler tarafından metabolize edilmesi için hücrelerin 2 saat boyunca 37°C' de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sağlandı. 2 saat sonunda multimode mikropate okuyucuda (Berthold Technologies, Almanya) her bir kuyu için 520 nm referans alınarak 440 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Bu uygulama her iki hücre hattında

ve her bir doz için en az 3 kuyuda tekrarlandı. İlaç uygulanmamış hücrelerin (negatif kontrol) canlılığı %100 olarak kabul edildi ve her bir doz grubu absorbas değerine göre negatif kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Hücre canlılığı her doz grubu için aşağıda belirtilen formül kullanılarak % değeriyle gösterildi;

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Her bir doz grubunun absorbas değeri ortalaması}}{\text{Negatif kontrol grubunun absorbas değeri ortalaması}} \times 100$$

Hücre canlılığının hesaplanmasının ardından Compusyn programı aracılığıyla parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücrelerinde hem Cabazitaxel hem de H₂O₂ için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.4.1. LNCaP- HPR5M hücreleri için sitotoksosite analizi ile H₂O₂ direnç katsayısının belirlenmesi

LNCaP hücrelerine uygulanan 120 günlük direnç protokolü sonunda hücrelerin H₂O₂ direnci sitotoksosite analizi aracılığıyla katsayı olarak belirlendi. Bu amaç doğrultusunda, 120 gün sonunda hücreler kuyu başına 1,5×10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi ve hücrelere 24 saat 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM doz olacak şekilde uygulandı. 24 saat sonunda hücrelere, hücre canlılık analizi yapıldı ve elde edilen sonuçlar ile hücrelerin %canlılıkları hesaplandı. Ardından, hücrenin kazandığı H₂O₂ direnç katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Direnç Katsayısı} = \frac{\text{LNCaP-HPR5M H}_2\text{O}_2 \text{ IC}_{50} \text{ değeri}}{\text{Parental LNCaP H}_2\text{O}_2 \text{ IC}_{50} \text{ değeri}}$$

3.2.4.2. LNCaP-HPR5M hücreleri için sitotoksosite analizi ile Cabazitaxel direnç katsayısının belirlenmesi

LNCaP hücrelerine uygulanan 120 günlük direnç protokolü sonunda hücrelerin Cabazitaxel direnci sitotoksosite analizi aracılığıyla katsayı olarak belirlendi. Bu amaç doğrultusunda, 120 gün sonunda hücreler kuyu başına 1,5×10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi ve hücrelere 72 saat süre ile 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM ve 10 nM doz olacak şekilde Cabazitaxel uygulandı. 24 saat

sonunda hücrelere, hücre canlılık analizi yapıldı ve elde edilen sonuçlar ile hücrelerin %canlılıkları hesaplandı. Ardından, hücrenin kazandığı Cabazitaxel direnç katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Direnç Katsayısı} = \frac{\text{LNCaP-HPR5M Cabazitaxel IC}_{50} \text{ değeri}}{\text{Parental LNCaP Cabazitaxel IC}_{50} \text{ değeri}}$$

3.2.5. siRNA transfeksiyonu

RelA (p65) gen ekspresyonunun geçici olarak baskılanması amacıyla, Silencer® Select siRNA RelA (p65) ve kontrol grubu için Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemleri, üretici firmanın önerilerine uygun şekilde Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, ABD) aracılığıyla gerçekleştirildi. siRNA'lar, hücre kültürü ortamına serum içermeyen koşullarda eklendi ve hücrelerde RNA interferans (RNAi) yoluyla hedef mRNA'nın spesifik olarak yıkımı sağlanarak gen susturulması amaçlandı.

3.2.5.1. siRNA'nın resüspansiyonu

Liyofilize halde sağlanan Silencer® Select siRNA RelA (p65) ve Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA (ThermoFisher Scientific, ABD), üretici firmanın talimatlarına uygun olarak 500 µL steril RNaz free su içerisinde yavaşça pipetajlanarak resüspanse edildi. Resüspanse edilen siRNA RelA (p65) ve siRNA negatif kontrol, 50 µL stoklar halinde –80°C'de saklandı.

3.2.5.2. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonu

LNCaP-HPR5M hücreleri siRNA ile transfeksiyon amacıyla, kuyu başına $2,5 \times 10^5$ – 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültürü plakalarına 1500 µL antibiyotiksiz besiyeri içerisinde ekildi ve 72 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin transfeksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla Lipofectamine RNAiMAX® (ThermoFisher Scientific, ABD) /siRNA kompleksi oluşturuldu. Bu bağlamda Lipofectamine RNAiMAX® ve siRNA ayrı ayrı 0,5 mL steril ependorflarda 150 µL OptiMEM® (ThermoFisher Scientific, ABD) besiyerinde karanlık ortamda dilüe edildi. Dilüe edilen Lipofectamine ve siRNA daha sonra başka bir 0,5 mL ependorfta 300 µL hacimde olacak şekilde karıştırıldı ve 20

dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek Lipofectamine/siRNA kompleksinin oluşması sağlandı. İnkübasyon süresinin sonunda 6 kuyulu hücre plakasında bulunan kuyulardaki besiyeri hücreleri rahatsız etmeden çekildi. Transfeksiyonun gerçekleşeceği her bir kuyuya 1250 µL antibiyotik içermeyen besiyeri koyuldu. Ardından her kuyuya 250 µL Lipofectamine/siRNA kompleksi eklendi ve karışımın hafifçe kuyu içerisinde eşit dağılması sağlandı. Hücreler 72 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İlaç uygulanacak hücre gruplarına transfeksiyon işleminden 6 saat sonra ilaç dozlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.3. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonunun RT-qPCR ile optimizasyonu

Transfeksiyonun optimizasyonunun sağlanması amacıyla LNCaP-HPR5M hücreleri, kuyu başına $2,5 \times 10^5$ ve 5×10^5 hücre olacak şekilde farklı iki konsantrasyonda ekildi ve 72 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler prosedüre uygun olarak işlem sonunda kuyulardaki siRNA konsantrasyonu 10 nM ve 20 nM olacak şekilde sırasıyla 30 pmol ve 60 pmol siRNA RelA ve siRNA negatif kontrol ile transfekte edildi. Ayrıca kontrol amacıyla eş zamanlı olarak bir hücre grubu 9 µL Lipofectamine ile transfekte edildi. Transfekte edilen hücreler 72 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler, kuyulardan 500 µL tripsin ile kaldırıldı ve 1,5 mL endorflar içinde 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra GeneALL® HybritR RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçüm ile OD değeri ve miktar tayini OD₂₆₀ absorbans değeri ölçülerek ng/µL cinsinden belirlendi. Ardından elde edilen RNA'lardan son konsantrasyon 300 nM olacak şekilde High Capacity (ThermoFisher, ABD) cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi ardından SYBR Green yöntemi ile qPCR işlemi gerçekleştirilerek RelA geni için gen ekspresyonu analizi yapıldı. RT-qPCR verilerinden elde edilen değerlerle aşağıdaki formül aracılığıyla siRNA transfeksiyonunun verimliliği hesaplandı:

$$\text{Sessizleştirme Yüzdesi} = (1 - [\text{Hedef siRNA Fold Change} / \text{Negatif Kontrol Fold Change}]) \times 100$$

Elde edilen sonuçlara göre final siRNA konsantrasyonunun 20 nM olduğu ve 60 pmol siRNA kullanılan ve hücre sayısının $2,5 \times 10^5$ olduğu transfeksiyon grubunda

transfeksiyon verimliliği en yüksek oranda %86,36 olarak saptandığından sonraki deneylere bu transfeksiyon koşullarında devam edilmiştir.

3.2.5.4. Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonunun Western Blot yöntemi ile validasyonu

Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonunun validasyonu amacıyla i) kontrol LNCaP-HPR5M hücreleri, ii) 20 nM siRNA negatif kontrol ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücreleri, iii) 20 nM siRNA RelA (p65) ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücreleri olmak üzere deney grupları belirlendi. Hücreler her bir deney grubu için 1×10^6 hücre olacak şekilde T25 hücre kültürü flasklarına ekildi ve ekimden 48 saat sonra belirlenen siRNA konsantrasyonunda (20 nM) transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonun 72. saatinde hücrelerden RIPA lizis solüsyonu (Santa Cruz, ABD) ile total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir ve Qubit 4.0 (Invitrogen, ABD) cihazında proteinlerin $\mu\text{g/mL}$ cinsinden ölçümü yapıldı. Protein ölçümünün ardından β -aktin ve NF- κ B p65 proteinleri için Western Blot protokolü gerçekleştirildi (** Protokol 3.2.9. da detaylandırıldı).

3.2.6. Apoptotik etkilerin belirlenmesi

Öncelikle sitotoksikite analizi sonuçlarına dayanarak, parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel için parental hücrenin IC_{50} değerini de kapsayacak aralıkta seçilen 3 doz grubu için (0,5 nM, 1 nM ve 2,5 nM) 72 saatlik etkin sürede apoptotik aktivasyon değerlendirildi.

Karakterizasyon için etkin süre ve dozlar LNCaP-HPR5M hücrelerinin hücre canlılık analizi sonuçları; transfeksiyon grubundaki siRNA konsantrasyonu optimizasyon deneylerinin sonuçları baz alınarak 20 nM ve 72 saat olarak seçildi. Deney gruplarındaki tek başına ve siRNA ile kombin olarak uygulanan Cabazitaxel dozu ise LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel'in IC_{50} değeri (1,35 nM) olarak belirlendi

Transfeksiyonun ardından apoptotik etkilerin değerlendirilmesi amacıyla i) Kontrol LNCaP-HPR5M hücreleri, ii) siRNA RelA ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücreleri, iii) siRNA negatif kontrol ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücreleri, iv) siRNA ReLA ile transfekte edilen ve Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP-HPR5M hücreleri ve v) Sadece Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP-HPR5M hücreleri siRNA ile transfeksiyonun deney gruplarını oluşturdu. Tüm deney gruplarında

apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla Annexin & Dead Cell kit protokolü uygulandı. Bu yöntemin temeli, apoptozun erken evresinde fosfatidilserinin, hücre membranının iç yüzünden dış yüzüne yer değiştirmesine dayanmaktadır. Fosfolipitlere bağlanma özelliği taşıyan kalsiyum bağımlı bir protein olan Annexin V, fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Hücre membranı dışındaki fosfatidilserinlere Annexin V bağlanması aracılığıyla apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte 7-AAD boyası da hücre membranının yapısal bütünlüğünün ve ölü hücrelerin bir belirteci olarak kullanılmakta ve bu sayede ölü hücreler, erken apoptotik hücreler ve sağlıklı hücreler ayırt edilebilmektedir. Böylelikle, toplam hücre popülasyonu i) Canlı hücreler: Annexin V (-), 7-AAD (-), ii) Erken apoptotik hücreler: Annexin V (+), 7-AAD (-), iii) Geç apoptotik hücreler: Annexin V (+), 7-AAD (+) ve iv) Ölü hücreler (nükleer debris): Annexin V (-), 7-AAD (+) olmak üzere 4 farklı popülasyonda analiz edilebilmektedir.

Bu amaç doğrultusunda, 6-kuyulu hücre kültürü plakalarına parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücreleri kuyu başına $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi ve ilgili dozlar ve etkin sürelerde transfeksiyon ve Cabazitaxel dozlama işlemleri gerçekleştirildi. Etkin süre sonunda hücreler %0,25'lik Tripsin- EDTA ile muamele edilerek kaldırıldı ve 1,5 mL'lik endorf içerisinde süspanse hale getirilerek 1 kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında 75 µl besi yeri ile süspanse edilen hücrelere eşit miktarda Annexin V & Dead Cell reaktifi eklenerek karışımları için pipetajlandı. Hücreler karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi ve sonrasında Muse® Cell Analyzer cihazında analize tabi tutuldu. Tüm deney gruplarında her bir doz grubu için 3 farklı analiz gerçekleştirildi.

3.2.7. Hücre içi kaspaz aktivasyonunun değerlendirilmesi

Öncelikle Sitotoksite analizi sonuçlarına dayanarak, parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel için parental hücrenin IC₅₀ değerini de kapsayacak aralıkta seçilen 3 doz grubu için (0,5 nM, 1 nM ve 2,5 nM) 72 saatlik etkin sürede kaspaz aktivasyonu değerlendirildi.

Transfeksiyonun ardından hücre içi kaspaz aktivasyonu ve hücre membran geçirgenliğinin değerlendirilmesi amacıyla i) Kontrol LNCaP-HPR5M hücreleri, ii) siRNA RelA ile transfekte edilen LNCaP- HPR5M hücreleri, iii) siRNA negatif kontrol ile transfekte edilen LNCaP- HPR5M hücreleri, iv) siRNA ReLA ile transfekte edilen

ve Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP- HPR5M hücreleri ve v) Tek doz Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP-HPR5M hücreleri siRNA ile transfeksiyonun deney gruplarını oluşturdu.

Tüm deney gruplarında kaspaz aktivasyon oranının belirlenmesi amacıyla Muse® Multicaspase kit (Merck Millipore, Almanya) protokolü gerçekleştirildi. Bu kit, kaspaz-1, kaspaz-3, kaspaz-4, kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 olmak üzere aktif kaspazların varlığını tespit edebilen FLICA (Fluorescent- Labeled Inhibitor of Caspases) yapısını içermektedir. FLICA, hücre zarını geçebilen, toksik olmayan ve florometil keton (FMK) ile konjuge edilmiş floresan bir Valin(V)-Alanin(A)-Aspartik asit(D) peptidinden oluşmakta olup, kaspazlara spesifik olarak bağlanarak floresan sinyal üretmektedir. Böylelikle hücre içindeki kaspaz aktivitesi miktarına bağlı olarak floresan sinyal artmaktadır. Ayrıca bu testte de hücre membranının yapısal bütünlüğünü ve ölü hücreleri tespit eden 7-AAD boyası kullanılmaktadır. Bu sayede hücre popülasyonları aynı anda hem kaspaz aktivitesine hem de membran geçirgenliğine göre değerlendirilebilmektedir. Bu bağlamda, Muse® yazılımı ile analiz edilen hücreler, i) Canlı hücreler: FLICA (-), 7-AAD (-), ii) Kaspaz (+) hücreler (erken apoptoz): FLICA (+), 7- AAD (-), iii) Kaspaz (+) ve ölü hücreler (geç apoptoz): FLICA (+), 7-AAD (+) ve iv) Ölü hücreler (nekrotik/ nükleer debris): FLICA (-), 7-AAD (+) olmak üzere 4 ana popülasyonda sınıflandırılabilir.

Bu amaç doğrultusunda, 6-kuyulu hücre kültürü plakalarına parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücreleri kuyu başına $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekildikten sonra ilgili dozlar ve etkin sürelerde transfeksiyon ve Cabazitaxel dozlama işlemleri gerçekleştirildi. Etkin süre sonunda hücreler %0,25'lik Trypsin- EDTA ile muamele edilerek kaldırıldı ve 1,5 mL'lik ependorf içerisinde süspanse hale getirilerek 1 kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında Multicaspase Assay Buffer içerisinde hücreler süspanse edildi. Daha sonra kit prosedürüne uygun olarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Her bir tüpe 10 µl hücre süspansiyonu ve 190 µl çalışma solüsyonu konularak ve orta hızda 3-5 saniye vorteks yapıldı ve karışması sağlandı. Daha sonra 30 dakika 37°C'de %5 CO₂ etüvde karanlık ortamda inkübasyon gerçekleştirildi ve inkübasyon süresinin sonunda hücreler Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Tüm deney gruplarında her bir doz grubu için 3 farklı analiz gerçekleştirildi.

3.2.8. Oksidatif stresin belirlenmesi

Tez çalışmasında, hem LNCaP-HPR5M hücrelerinin karakterizasyonu amacıyla hem de siRNA transfeksiyonu sonrasında uygulama yapılam doz grupları i) Kontrol LNCaP-HPR5M hücreleri, ii) siRNA RelA ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücreleri, iii) siRNA negatif kontrol ile transfekte edilen LNCaP- HPR5M hücreleri, iv) siRNA ReLA ile transfekte edilen ve Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP-HPR5M hücreleri ve v) Tek başına Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP-HPR5M hücreleri olmak üzere ilgili deney gruplarında hücre içi oksidatif stres değişimleri üç farklı yöntem kullanılarak belirlendi.

Karakterizasyon için etkin süre ve dozlar LNCaP-HPR5M hücrelerinin hücre canlılık analizi sonuçları; transfeksiyon grubundaki siRNA konsantrasyonu optimizasyon deneylerinin sonuçları baz alınarak 1,35 nM ve 72 saat olarak belirlendi.

3.2.8.1. Oksidatif stresin akış sitometrik yöntem aracılığıyla belirlenmesi

Bu yöntem, Muse® Oksidatif Stres Kit (Merck Millipore, Almanya) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde bulunan reaktif dihidroetidium temelli bir bileşen olup, hücre içine kolayca difüze olabilmekte ve süperoksit anyonları ($\bullet\text{O}_2^-$) varlığında oksidasyona uğrayarak 2-hidroksietidiuma dönüşmektedir. 2-hidroksietidium, DNA ile etkileşebilen kırmızı renkli florofor bileşiktir. Böylelikle canlı hücreler ROS negatif [DHE(-)] ve ROS pozitif [DHE(+)] olarak gruplandırılmaktadır. Bu kapsamda hücreler 1×10^6 hücre olacak şekilde T25 hücre kültürü flasklarına ekildi. Ekim sonrasında LNCaP-HPRM hücrelerinin karakterizasyonu amacıyla 25 μM , 50 μM ve 100 μM dozlarda ve 24 saat etkin sürede, siRNA transfeksiyon grubunda ise ilgili deney gruplarında transfeksiyon ve dozlama işlemi 72 saat etkin sürede gerçekleştirildi. İlgili süre sonlarında hücreler %0,25 Trypsin-EDTA ile muamele edilerek 15 mL' lik falkon içerisinde süspanse edildi ve 2 kez PBS ile yıkandı. Kit içeriğindeki oksidatif stres reaktifi kit talimatlarına uygun olarak önce 1:100 oranında ara stok olarak hazırlandı ve son aşamada 1:80 oranında kit içeriğindeki tampon ile dilüe edilerek boya solüsyonu hücrelere uygulanabilecek şekilde hazırlandı. Her doz ve deney grubu için 10 μL hücre süspansiyonu 190 μL boya solüsyonu ile karıştırıldı ve hücreler 37°C'de karanlık ortamda inkübasyon ile boyandı 30 dakika inkübasyonun sonunda hücreler Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Tüm deney gruplarında her bir doz grubu için 3 farklı analiz gerçekleştirildi.

3.2.8.2. Oksidatif stresin floresan mikroskop ile belirlenmesi

LNCaP-HPR5M hücrelerine karakterizasyon için H_2O_2 , deney gruplarında ise siRNA transfeksiyonu ve Cabazitaxel uygulanması sonrasında oksidatif stresin görüntülenebilmesi amacıyla genel oksidatif stres belirteci olan CM- H_2DCFDA ve serbest radikal sensörü olarak bilinen dihidroetidium (DHE) olmak üzere iki farklı floresan boyama yöntemi gerçekleştirildi. Diklorodihidrofluorescein diasetat (H_2DCFDA)'ın tiol reaktif klorometil grubu taşıyan karboksi türevi olan CM- H_2DCFDA , hücrelerde ROS'un ölçümünde yaygın olarak kullanılan bir prob olarak bilinmektedir. Hücre membranından pasif difüzyon yoluyla geçebilen CM- H_2DCFDA , hücre içine alındıktan sonra esterazlar tarafından diasetillenerek hücre içi formu olan diklorodihidrofluorescein (H_2DCF) molekülüne dönüştürülmektedir. Daha sonra klorometil grubu, hücre içi glutatyon ve diğer tiyollerle reaksiyona girerek boyanın hücre içine hapsolmasını sağlamaktadır. Oluşan H_2DCF , hidrojen peroksit başta olmak üzere ROS türleri tarafından oksitlemekte ve yüksek floresans veren diklorofluorescein (DCF) formuna dönüşmektedir (Eksitasyon/emisyon: 492/517 nm). DCF' nin bu floresan sinyali (yeşil renkli), hücre içinde biriken ROS ile doğru orantılı olarak artmakta ve bu nedenle de oksidatif stresin dinamik olarak izlenmesini sağlamaktadır. Dihidroetidium (DHE) ise hücre içi süperoksit anyonlarının ($\bullet O_2^-$) özgül bir göstergesi olarak yaygın kullanılan bir floresan probdur. DHE, indirgenmiş formunda sitozolde zayıf mavi floresan ışımaya yaymaktadır. Süperoksit tarafından oksitlendiğinde ise yüksek floresansa sahip 2-hidroksietidium ($2-OH-Et^+$, eksitasyon/emisyon: 518/605 nm) oluşmaktadır. Bu dönüşüm, DHE'nin hücre içi DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlanmasını sağlamakta ve çekirdekte belirgin bir kırmızı floresan birikimi ile sonuçlanmaktadır. ROS' un hücre içinde hızla metabolize olması nedeniyle bu tür canlı hücre ROS boyama yöntemlerinde, canlı hücrelerde ROS varlığını gösteren floresan ışımının doğrulanmasının hemen ardından hücrelerin fikse edilmesi gerekmektedir.

3.2.8.2.1. Canlı hücre CM- H_2DCFDA boyama

Tez çalışmasında, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) tespiti için CM- H_2DCFDA (InvitrogenTM, ABD) boyası (50 $\mu g/vial$, liyofilize) kullanıldı. Boya, karanlık ortamda ve hava ile teması en az seviyede tutularak laminar akış içerisinde, 17,3 μl steril DMSO içerisinde çözündürülerek 5 μM stok çözeltisi hazırlandı. Dirençli

hücrelerin karakterizasyonu için parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücreleri, kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6-kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi. Hücreler, 24 saat boyunca 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda H_2O_2 ile dozlandı.

Önceki kısımlarda belirtilen LNCaP-HPR5M hücrelerinin siRNA deney grupları ise 1×10^6 hücre olacak şekilde T25 hücre kültürü flasklarına ekildi ve 72 saat süre için transfeksiyon ve dozlama işlemleri uygulandı. Hücreler, inkübasyon sürelerinin sonunda iki kez PBS ile yıkandı ve her bir kuyuya steril PBS içerisinde hazırlanmış 10 μ M CM-H₂DCFDA çözeltisi eklenerek 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde karanlık ortamda 1 saat boyandı. Boyama sonrasında, hücrelerin canlılık durumları ve yeşil floresan ışığa kontrol edildi. Ardından hücreler, %4 paraformaldehit çözeltisi (Merck, Almanya) ile oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika süre ile inkübe edilerek fiksasyon sağlandı. Fiksasyonun ardından hücreler 2 kez PBS ile 5 dakika süre için yıkandı. Son olarak 10 μ g/ μ L konsantrasyonda hazırlanan Hoechst (Merck, Almanya) boyası ile oda sıcaklığında 5 dakika karanlık ortamda nükleus boyaması gerçekleştirildi ve hücreler son kez PBS ile yıkanarak EVOS™ M5000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD altında görüntülendi. Her bir deney grubu için 6 farklı alan görüntülendi.

3.2.8.2.2. Canlı hücre DHE boyama

Tez çalışmasında, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) tespiti için DHE (Invitrogen™, ABD) boyası (1 μ g/vial, liyofilize) kullanıldı. Boya, karanlık ortamda ve hava ile teması en az seviyede tutularak laminar akış içerisinde, 634 μ l steril DMSO içerisinde çözündürülerek 5 μ M stok çözeltisi hazırlandı. Dirençli hücrelerin karakterizasyonu için parental LNCaP ve LNCaP- HPR5M hücreleri, kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6-kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi. Hücreler, 24 saat boyunca 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda H_2O_2 ile dozlandı.

Önceki kısımlarda belirtilen LNCaP-HPR5M hücrelerinin siRNA deney grupları ise 1×10^6 hücre olacak şekilde T25 hücre kültürü flasklarına ekildi ve 72 saat süre için transfeksiyon ve dozlama işlemleri uygulandı. Hücreler, inkübasyon sürelerinin sonunda iki kez PBS ile yıkandı ve her bir kuyuya steril PBS içerisinde hazırlanan 10 μ M DHE çözeltisi eklenerek 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde karanlık ortamda 1 saat süre ile boyandı. Boyama sonrasında, hücrelerin canlılık durumları ve kırmızı floresan ışığa kontrol edildi. Ardından hücreler, %4 paraformaldehit çözeltisi ile oda

sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika süre ile inkübe edilerek fiksasyon sağlandı. Fiksasyonun ardından hücreler 2 kez PBS ile 5 dakika süre için yıkandı. Son olarak 10 µg/µl konsantrasyonda hazırlanan Hoechst (Merck, Almanya) boyası ile oda sıcaklığında 5 dakika karanlık ortamda nükleus boyaması gerçekleştirildi ve hücreler son kez PBS ile yıkanarak EVOS™ M5000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) altında görüntülendi. Her bir deney grubu için 6 farklı alan görüntülendi.

3.2.9. Protein ekspresyon analizleri

Tez çalışması kapsamında, ilişkili sinyal yolu NF-κB'nin değerlendirilmesi amacıyla bu yolakta görev alan NF-κB p65 alt birimi (RelA), p-p65 ve IκBα, p-IκBα proteinleri ile apoptoz belirteci olan kesilmiş kaspaz-3'ün ekspresyon düzeyleri, siRNA ve Cabazitaxel uygulaması sonrasında incelenmiştir. Bununla birlikte uyaran varlığında protein ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi amacıyla siRNA transfeksiyonu ve Cabazitaxel tedavisi sonrası hücreler 4 saat boyunca 10 ng/µl konsantrasyonda TNF-α ile uyarıldı. Protein ekspresyon analizleri, Western blot yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup analiz için Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell, Mini-PROTEAN® Tetra Cell ve Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad, ABD) sistemleri kullanıldı. Cabazitaxel'in sitotoksik etkisinin değerlendirildiği deneylerden elde edilen sonuçlara dayanarak, protein analizleri için 72 saatlik zaman dilimi seçildi. Protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi ve normalizasyonu amacıyla referans protein olarak β-Aktin kullanıldı.

3.2.9.1. Hücrelerin TNF-α ile uyarılması

LNCaP-HPR5M hücre hattında TNF-α ile uyarma sonucu ilgili yolak proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla kontrol, negatif kontrol 10ng/µl TNF-α, TNF-α+ 1,35 nM Cabazitaxel, 10 ng/µl TNF- α+ 20 nM siRNA-RelA, 10 ng/µl TNF- α+20 nM siRNA-negatif kontrol ve 10 ng/µl TNF- α+ 20 nM siRNA-RelA+ 1,35 nM Cabazitaxel olmak üzere 6 deney grubu belirlendi. Hücreler, transfeksiyon ve Cabazitaxel ile dozlama işlemlerinden 68 saat sonra (son 4 saati TNF-α uyarımı) besiyeri çekildi ve FBS'siz RPMI 1640 (%1 sodyum pirüvat, %1 antibiyotik) 10 ng/µl konsantrasyonda TNF-α (RayBiotech, ABD) ile muamele edilerek 4 saat boyunca 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. İnkübasyon

süresinin sonunda hücreler PBS ile yıkanarak total protein izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.9.2. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu için RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, ABD) bazlı lizis protokolü uygulandı. Bu amaçla, LNCaP-HPR5M hücre hattı her biri 1×10^6 hücre içerecek şekilde T25 hücre kültürü flasklarına ekildi. TNF- α uyarısına maruz bırakılmayan deney gruplarında ise hücrelere 72 saat boyunca siRNA transfeksiyonu ve/veya Cabazitaxel uygulaması gerçekleştirildi. Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

i) Kontrol (tedavisiz) LNCaP-HPR5M hücreleri, ii) 1,35 nM Cabazitaxel ile dozlanan LNCaP-HPR5M hücreleri, iii) 20 nM siRNA-RelA ile transfekte edilen hücreler, iv) 20 nM siRNA-negatif kontrol ile transfekte edilen hücreler, v) 20 nM siRNA-RelA ile transfekte edilip 1,35 nM Cabazitaxel dozlanan hücreler.

İnkübasyon süresinin sonunda, hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler soğuk PBS ile bir kez yıkanarak, hücre kazıyıcı (scraper) yardımıyla kaldırıldı ve 15 mL'lik falcon tüpler içinde PBS içerisinde süspanse edildi. Hücre süspanسیونları 0°C'de, 600 g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Elde edilen pelletler 1 mL PBS içerisinde tekrar süspanse edilerek 1,5 mL'lik Eppendorf tüplere alındı ve aynı koşullarda yeniden santrifüjlendi. Ardından, her hücre pelletinin üzerine, proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren önceden hazırlanmış RIPA lizis tamponu eklendi. Hücreler buzda 30 dakika inkübe edilmiş, bu süre zarfında her 5 dakikada bir güçlü vortex uygulandı.

Lizis işleminin ardından, tüpler 4°C'de 14.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi ve elde edilen berrak süpernatant (toplam protein ekstraktı) yeni 1,5 mL'lik tüplere aktarıldı. Yaklaşık 500 μ L hacmindeki protein ekstraktları -80 °C'de saklanarak Western blot analizleri için uygun şartlarda muhafaza edildi.

3.2.9.3. Protein miktarlarının tayini

Toplam protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla Qubit™ Protein Assay Kit (Invitrogen, ABD) kullanıldı. Her bir protein örneğinin ölçümü için, kit protokolüne uygun olarak, protein tamponu içerisine %0,5 (1:200 oranında) floresan protein reaktifi eklenerek çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu çalışma solüsyonu, standartlar için tüp başına 190 μ L, örnekler için ise 199 μ L olacak şekilde temiz 0,5 mL Qubit™ tüplerine dağıtıldı. Ardından her bir standarttan 10 μ L, her bir protein örneğinden ise 1

μ l ilgili tüplere eklendi ve tüpler kısa süreli vortekslenerek oda sıcaklığında, karanlık ortamda 15 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, üç farklı konsantrasyondaki standart solüsyonunun ölçümü Qubit 4.0 Fluorometre cihazı (Invitrogen, ABD) ile gerçekleştirilerek deneysel örneklerin ölçümleri sırasıyla yapıldı ve protein miktarları Qubit Fluorometre değerine (QF) göre μ g/mL cinsinden belirlendi.

3.2.9.4. Proteinlerin hazırlanması

Elektroforez öncesinde, her bir protein örneği, toplamda 100 μ g protein içerecek şekilde 20 μ L hacme tamamlanarak steril distile su ile seyreltildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Her bir örneğe 5 μ L indirgeyici özellikte, bromofenol mavisi içeren 2X protein yükleme tamponu (loading buffer) eklendi. Numuneler, proteinlerin denatürasyonu amacıyla 100 °C'de 5 dakika boyunca ısıtıldı. Isıl işlem sonunda tüpler 2 dakika süreyle buzda bekletildikten sonra elektroforez işlemine geçildi.

3.2.9.5. Jel elektroforezi

Proteinlerin ayrıştırılması amacıyla elektroforez aşamasında %4-15 gradient Mini-PROTEAN® TGX Stain- Free Precast protein jelleri (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Jel, distile su ile hazırlanmış 1X Tris/Glycine/SDS (TGS) tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir kuyucuk içerisine, toplam 20 μ l hacminde elektroforez için hazır hale getirilen protein örnekleri dikkatlice yüklendi. Moleküler ağırlık tayini için marker kuyucuğuna 3 μ l Prestained Protein Ladder (5- 245 kDa) yüklendi. Elektroforez işlemi, öncelikle proteinlerin kuyulara düzgün şekilde çökmesini sağlamak amacıyla oda sıcaklığında 100 V gerilim altında 7-8 dakika boyunca gerçekleştirildi. Ardından, proteinlerin jel içerisinde ayrışmasını sağlamak üzere Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell sistemi (Bio- Rad, ABD) kullanılarak +4°C'de, 100 V gerilim altında yaklaşık 1-2 saat süresince elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

3.2.9.6. Proteinlerin membrana transferi

Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından, jel içerisindeki proteinlerin membrana aktarılması amacıyla ıslak transfer yöntemi uygulandı. Bu işlemde, hazır olarak temin edilen 0,45 μ m gözenek çapına sahip 6×8 cm boyutlarında Nitrocellulose/ Filter Paper Sandwiches (Bio- Rad, ABD) kullanıldı. Jel, membran, filtre kağıtları ve

pedler, transfer öncesinde 1:2:7 oranında hazırlanmış 10X Tris/Glycine (TG), metanol ve distile su içeren soğuk transfer tamponunda 3-5 dakika boyunca ısıtıldı. Membranların kurumasına izin verilmeden, Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans- Blot® Module (Bio- Rad, ABD) sisteminde transfer sandviçi hazırlandı. Katot (-) ucundan anota (+) doğru sırasıyla transfer pedi, filtre kağıdı, jel, nitrosellüloz membran, filtre kağıdı ve ped olacak şekilde katmanlar dikkatlice yerleştirildi. Aktarım işlemi, 250 mA sabit akım altında, soğuk ortam koşullarında 2 saat gerçekleştirildi.

3.2.9.7. Bloklama aşaması

Transfer işleminin ardından, proteinlerin membrandaki varlığını ve transferin etkinliğini doğrulamak amacıyla membranlar Ponceau S solüsyonu ile boyandı. Boyama sonrasında, membranlar önce distile su ile 2 kez, ardından 1x Tris Buffered Saline with Tween 20 (Santa Cruz Biotechnology, ABD) (TBST) solüsyonu ile iki kez ve son olarak 1x TBST ile 45 rpm hızda çalkalamalı inkübasyon ile 5 dakika süre ile yıkanarak Ponceau S kalıntılarından arındırıldı. Bloklama aşamasında, fosfoproteinlerin saptanacağı membranlar için %5 BSA içeren bloklama tamponu hazırlandı (2,5 g BSA, 50 mL 1x TBST içerisinde homojen hale getirildi). Diğer tüm hedef proteinler için ise %5 yağsız kuru süt içeren bloklama tamponu kullanıldı (1 g nonfat dry milk, 20 mL 1x TBST içerisinde hazırlandı). Membranlara uygun bloklama çözeltisi içerisinde, oda sıcaklığında 35 rpm hızda çalkalamalı inkübasyon (Clever Scientific, Birleşik Krallık) ile 1 saat bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bloklama sonrasında membranlar, 1X TBST solüsyonu ile 45 rpm hızda çalkalanarak 10'ar dakikalık 3 ardışık yıkama adımı ile yıkandı.

3.2.9.8. Primer antikor ile muamele

Western blot analizinde kullanılan primer antikorların dilüsyonları, üretici firmaların teknik bilgi formlarında belirtilen öneriler doğrultusunda hazırlandı. Anti-NF- κ B p65 (ab76311) antikoruna %5 BSA içeren 1X TBST tamponunda 1:3000 oranında, fosforillenmiş formunu tanıyan anti-NF- κ B p65 (phospho S536) (ab86299) antikoruna ise aynı tamponda 1:5000 oranında seyreltilti. Benzer şekilde, I κ B α proteini için kullanılan anti-I κ B α (44D4) (Cell Signaling Technology, ABD; #4812) ve fosforillenmiş I κ B α proteini için kullanılan phospho-I κ B α (Ser32) (14D4) (Cell Signaling Technology, ABD; #2859) antikorları %5 BSA içeren 1X TBST

tamponunda 1:1000 oranında hazırlandı. Yükleme kontrolü olarak kullanılan anti- β -Aktin (ab228001) antikoru da yine aynı tampon içerisinde 1:10000 oranında seyreltilmiştir. Apoptoz belirteci olan kesilmiş kaspaz-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology, ABD; #9661) antikoru ise %5 yağsız kuru süt içeren 1X TBST tamponunda 1:1000 oranında hazırlandı. Her bir membran, uygun primer antikor çözeltisi ile 4°C’de, 35 rpm hızda gece boyunca çalkalamalı olarak inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından membranlar 1X TBST ile 45 rpm’de çalkalanarak üç kez, 5’er dakika yıkandı.

3.2.9.9. Sekonder antikor ile muamele

Western blot analizinde kullanılan Goat anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721) sekonder antikoru, üretici firma tarafından belirtilen teknik bilgi formundaki dilüsyon aralığına uygun olarak 1:5000 oranında seyreltildi ve %5 BSA içeren 1X TBST çözeltisi içerisinde hazırlandı. Primer antikor ile gerçekleştirilen inkübasyon ve ardından yapılan yıkama işlemlerinin tamamlanmasının ardından membranlar, oda sıcaklığında 1 saat boyunca 35 rpm’de çalkalamalı olarak sekonder antikor çözeltisi ile inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membranlar, 45 rpm’de çalkalamalı olarak üç kez 5’er dakika süreyle 1X TBST tamponu ile yıkandı.

3.2.9.10. Membrandaki proteinlerin görüntülenmesi

Sekonder antikor ile inkübasyon tamamlandıktan sonra, membranın kurumamasına özen gösterilerek ve proteinlerin bulunduğu yüzeye temas ettirilmeden membran temiz ve düz bir yüzeye alındı. SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, ABD) kiti içerisindeki SuperSignal™ West Pico Luminol/Enhancer ve SuperSignal™ West Pico Stable Peroxide solüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak elde edilen kemilüminesans substrat çözeltisi, temiz bir alanda membranın tüm yüzeyine homojen şekilde uygulandı. Ardından, kemilüminesans ajanının sekonder antikora bağlanması için membran oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 5 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membran üzerinde kalan fazla substratlar nazikçe peçeteye emdirildi ve membran C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR, ABD) cihazına yerleştirilerek protein bantlarının görüntülenmesi sağlandı. Elde edilen görüntüler ImageJ programı kullanılarak analiz edildi ve protein bantlarının yoğunlukları program yazılımı ile ölçülerek protein ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler belirlendi.

3.2.10. İstatistiksel analiz

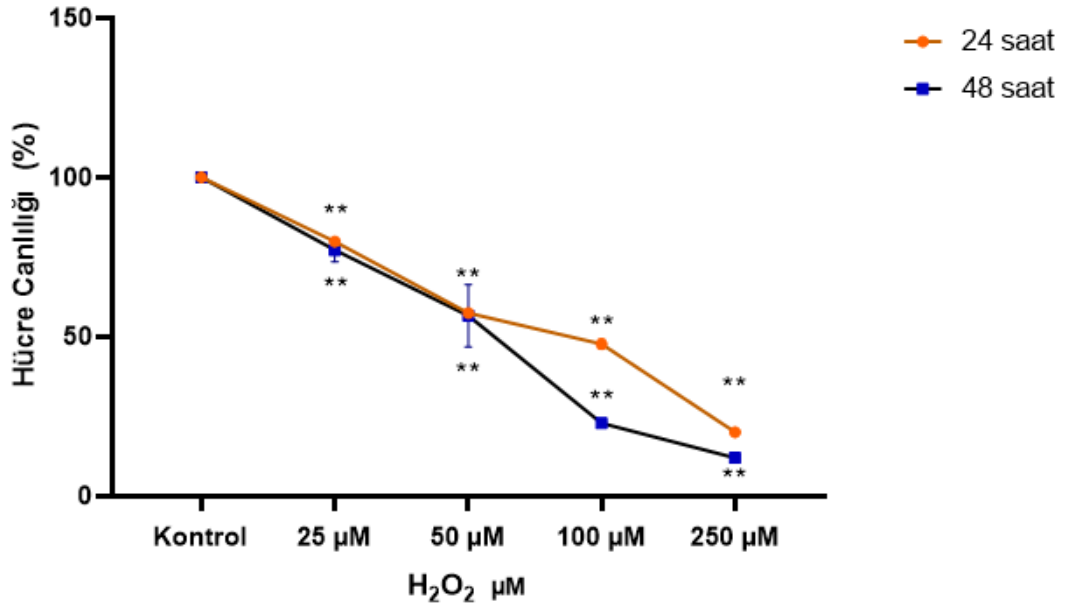
Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, ABD) ve SPSS versiyon 25.0 (IBM Corp., ABD) programları kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler yüzde (%) ve ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak tanımlandı. Gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) uygulandı; anlamlı farklılık saptanan durumlarda ise hangi grup ya da gruplar arasında anlamlılık bulunduğunu belirlemek amacıyla Post-hoc Tukey testi kullanıldı. Gen ekspresyon analizine ait veriler, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı ve istatistiksel değerlendirmesinde, Qiagen'in web tabanlı analiz aracı (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>) üzerinden bağımsız örneklem t-testi ile yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. LNCaP-HPR5M Hücre Hattının Eldesi ve Direnç Validasyonları

4.1.1. Sitotoksosite analizleri

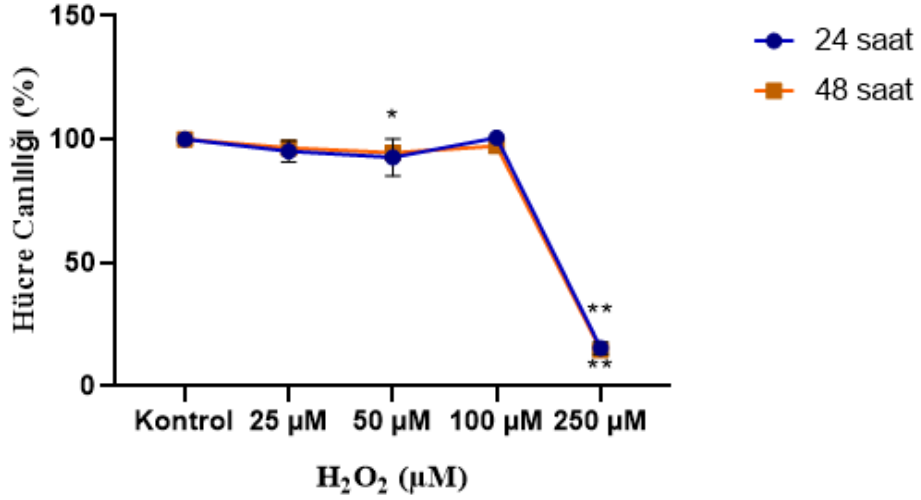
Parental LNCaP hücre hattına 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 250 μ M konsantrasyonlarında uygulanan H_2O_2 'nin, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında hücre canlılığı üzerinde doza bağımlı bir azalmaya yol açtığı gözlemlendi. 24 saatlik uygulama sonucunda hücre canlılığı sırasıyla %80,53, %57,42, %46,71 ve %19,95'e düşerken, 48 saatlik uygulama sonucunda ise canlılık oranları %77,21, %56,62, %22,93 ve %12,07 olarak belirlendi (tüm saat ve doz grupları için $p < 0,001$, Şekil 14). H_2O_2 'nin parental LNCaP hücre hattı üzerindeki yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değeri, CompuSyn yazılımı (ComboSyn Inc., ABD) kullanılarak yaklaşık 78,2 μ M olarak hesaplandı (X-intercept: 1,89313; Y-intercept: $-2,1688 \pm 0,11149$).



Şekil 14. Parental LNCaP hücre hattında H_2O_2 'ye bağlı hücre canlılığı değişimi. (** $p < 0,001$)

LNCaP hücre hattına 100 μ M H_2O_2 , 120 gün boyunca sürekli olarak 24 saat zaman diliminde uygulandıktan sonra adaptasyon gösteren yeni hücre hattı LNCaP-HPR5M olarak isimlendirildi. Sitotoksosite analizi sonuçlarına göre, LNCaP-HPR5M

hücrelerine 24 saat süre ile uygulanan 25 μM , 50 μM , 100 μM ve 250 μM H_2O_2 konsantrasyonları sonucunda hücre canlılığı sırasıyla %95,13, %92,65, %100,96 ve %15,38 olarak belirlendi ($p<0,001$). Aynı uygulamanın 48 saatlik süresinde ise canlılık oranları sırasıyla %96,95, %94,50, %97,36 ve %14,74 olarak ölçüldü (Şekil 15).



Şekil 15. LNCaP-HPR5M hücre hattında H_2O_2 'ye karşı hücre canlılığı değişimi. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

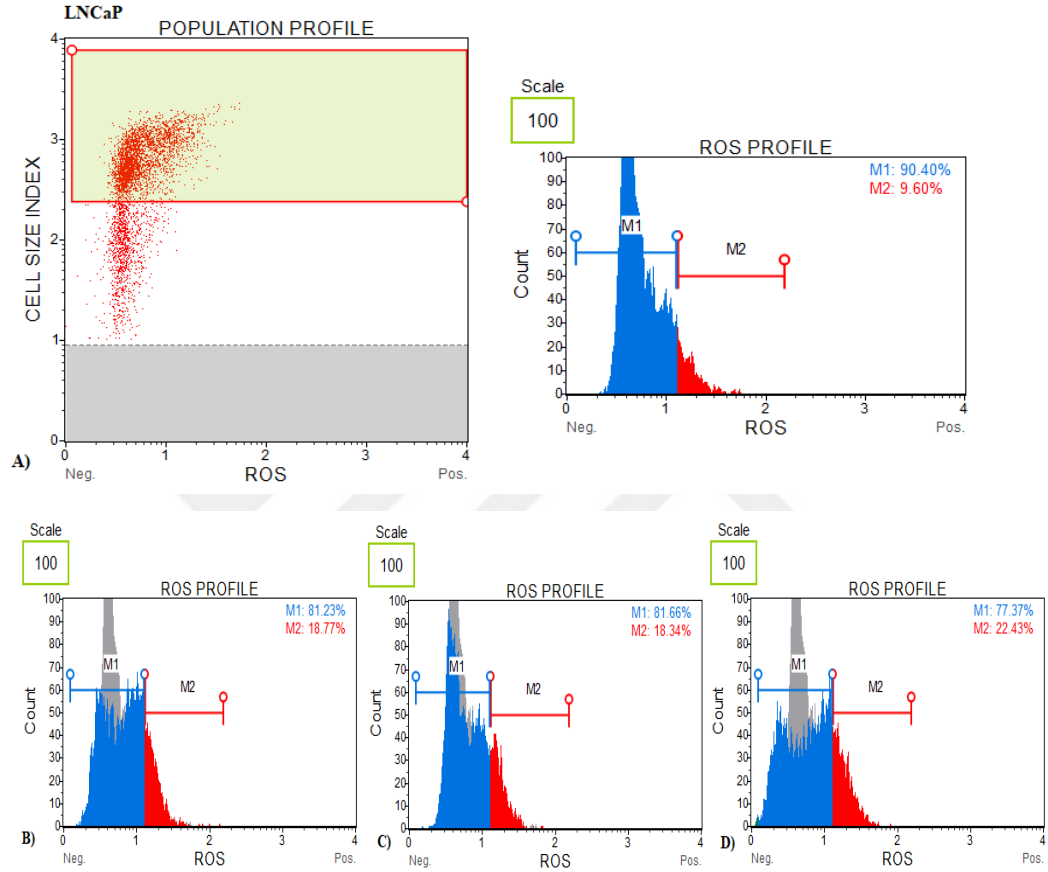
Sitotoksosite analizlerinden elde edilen bulgular doğrultusunda, 120 gün boyunca sürekli H_2O_2 uygulamasına maruz bırakılarak geliştirilen LNCaP-HPR5M hücre hattı için, H_2O_2 'nin 24 saatlik IC_{50} değeri CompuSyn yazılımı (ComboSyn Inc., ABD) kullanılarak yaklaşık 276,5 μM olarak hesaplandı. Bu değer, parental LNCaP hücre hattı için hesaplanan yaklaşık 78,2 μM 'lik IC_{50} değeriyle karşılaştırıldığında, LNCaP-HPR5M hattının H_2O_2 'ye karşı yaklaşık 3,53-kat direnç geliştirdiğini gösterdi. Bu sonuçlar, uzun süreli oksidatif stres altında kalan hücrelerin, H_2O_2 'ye karşı belirgin bir adaptif direnç geliştirdiğini ortaya koydu.

4.1.2. Oksidatif stres analizleri

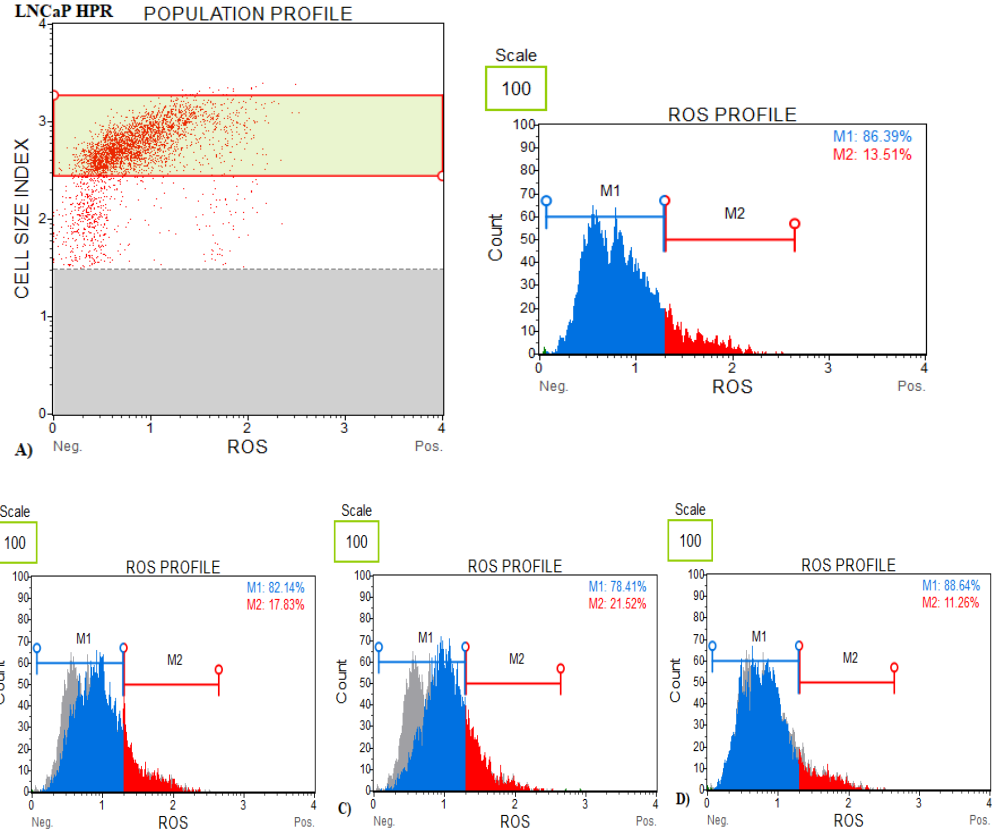
4.1.2.1. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücre hatlarında oksidatif stresin akış sitometrik analizi

Parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücre hatlarına 24 saat süreyle 25 μM , 50 μM ve 100 μM H_2O_2 uygulaması sonrasında gerçekleştirilen oksidatif stres analizine göre, parental LNCaP hücrelerinde ROS- pozitif hücre oranı doz artışına bağlı olarak sırasıyla %18,77, %18,34 ve %22,43 olarak belirlendi ($p<0.001$, Şekil 16). Aynı dozlarda LNCaP-HPR5M hücre hattında ise ROS-pozitiflik oranı sırasıyla %17,83,

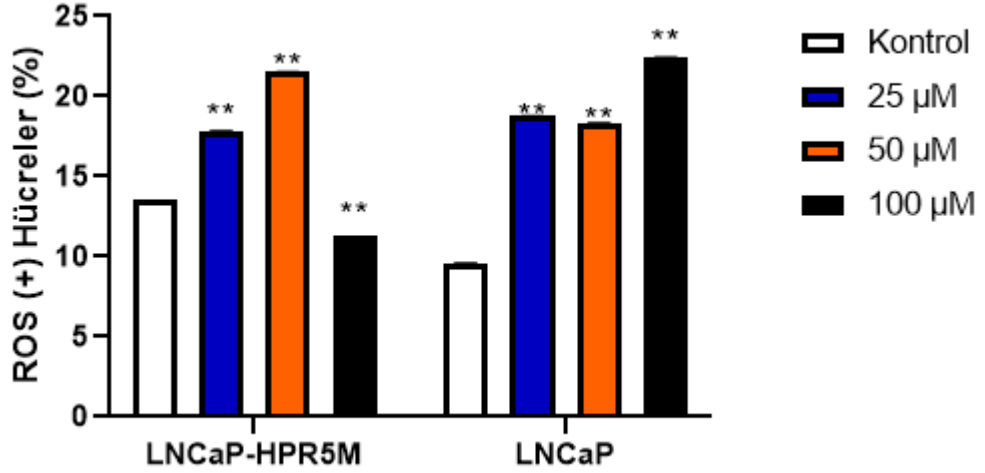
%21,52 ve %11,26 olarak saptandı ($p<0,001$, Şekil 17). Bu bulgular, uzun süreli H_2O_2 maruziyetiyle elde edilen LNCaP-HPR5M hücre hattının belirli dozlarda ROS birikimine karşı farklı düzeyde yanıt verdiğini ortaya koydu. H_2O_2 'nin her iki hücre hattındaki 24 saatlik ROS birikimine etkisinin istatistiksel karşılaştırması Şekil 18'de sunuldu.



Şekil 16. Parental LNCaP hücre hattında 24 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası reaktif oksijen türleri (ROS) pozitif hücre oranları. (A) kontrol (B), 25 µM, (C) 50 µM ve (D) 100 µM H_2O_2



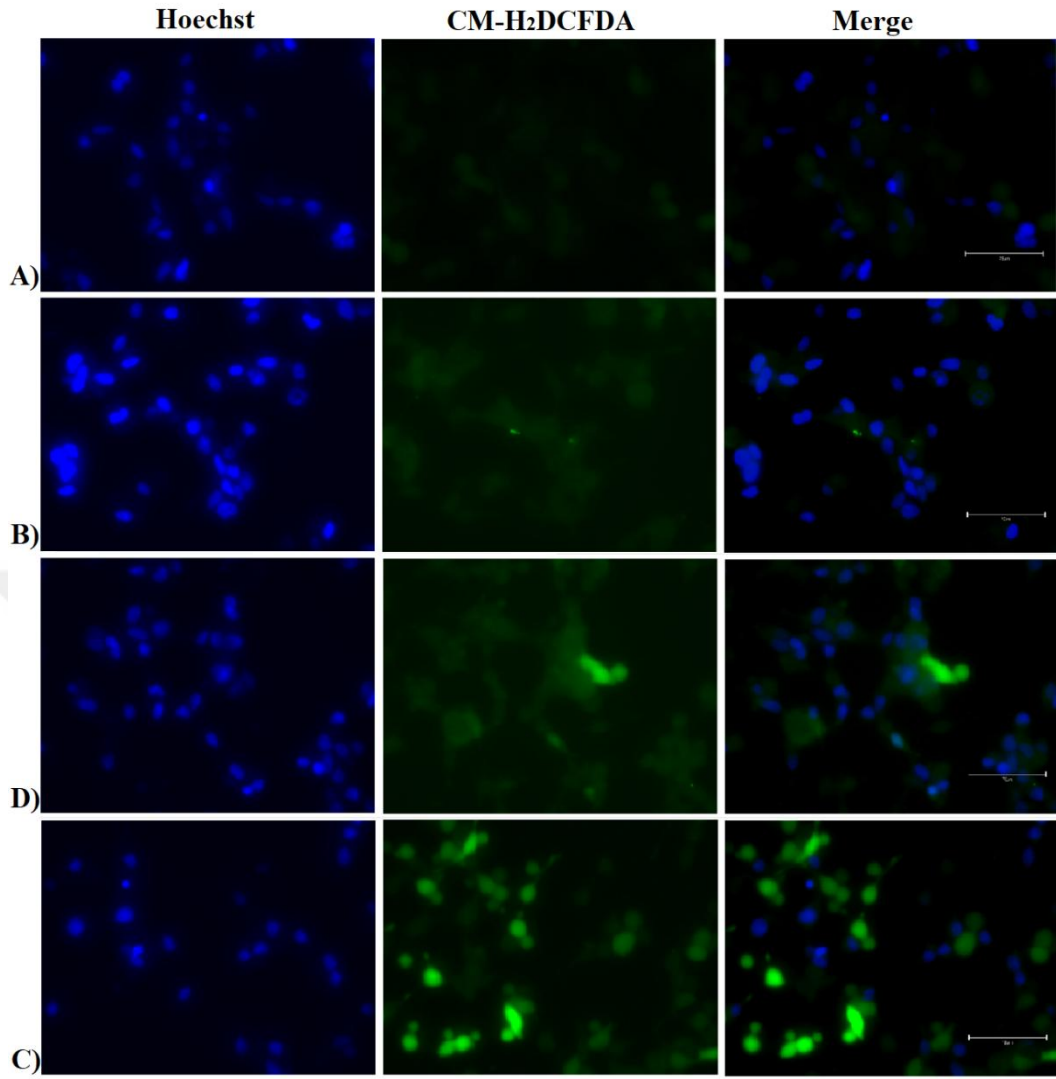
Şekil 17. Parental LNCaP-HPR5M hücre hattında 24 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası reaktif oksijen türleri (ROS) pozitif hücre oranları. (A) kontrol (B) 25 μM , (C) 50 μM ve (D) 100 μM H_2O_2



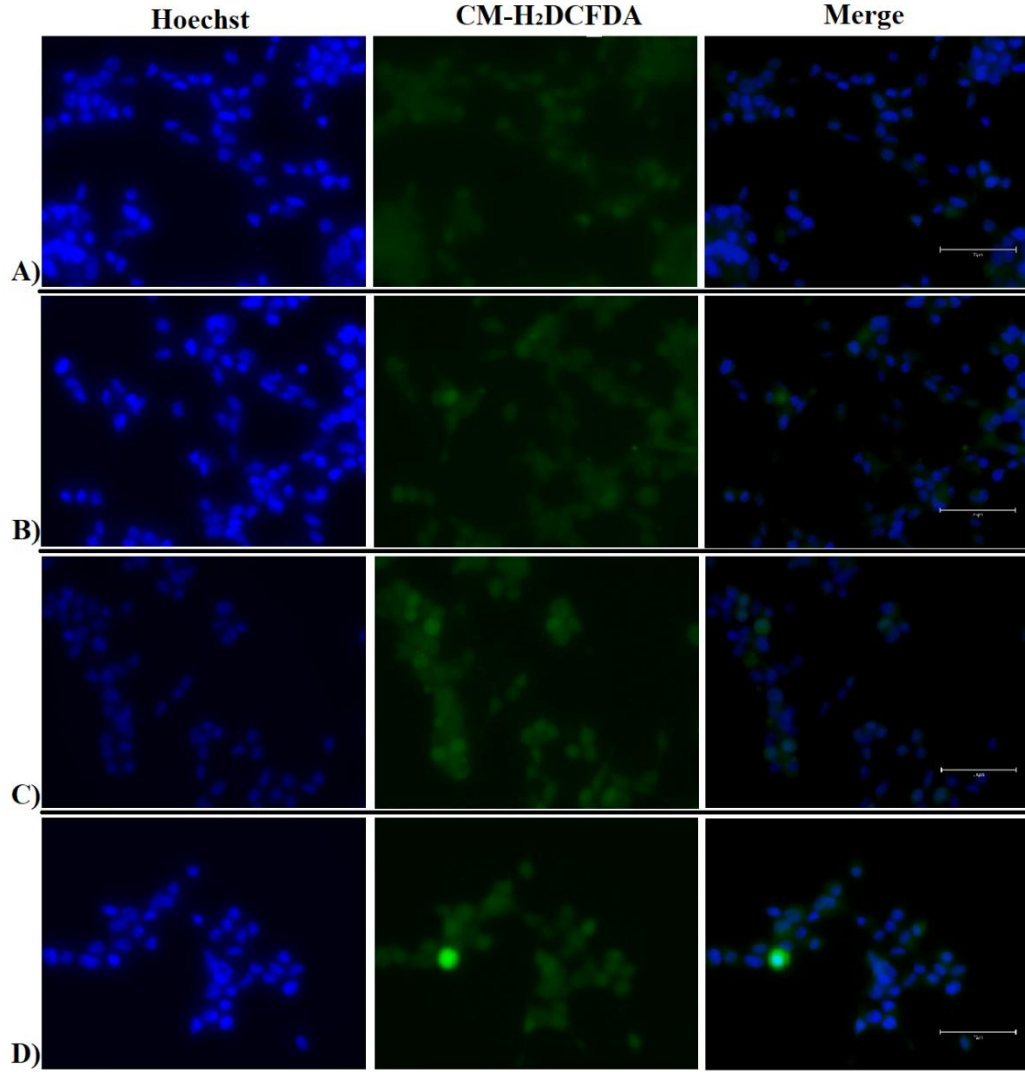
Şekil 18. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası reaktif oksijen türleri (ROS) pozitif hücre oranlarının karşılaştırılması. (** $p < 0,001$)

4.1.2.2. Parental LNCaP ve LNCaP- HPR5M hücre hatlarında intrasellüler reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin morfolojik olarak değerlendirilmesi

Parental LNCaP ve LNCaP- HPR5M hücre hatlarına 24 saat süreyle 25 μM , 50 μM ve 100 μM H_2O_2 uygulanmasının ardından intrasellüler ROS düzeyindeki değişimler floresan mikroskopisi ile değerlendirildi. Parental LNCaP hücre hattında, kontrol grubuna kıyasla H_2O_2 dozunun artmasına bağlı olarak, nükleus bütünlüğünü koruyan hücre popülasyonu içerisinde yeşil floresan ışımaya gösteren hücre oranında belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 19). Bu artış intrasellüler H_2O_2 birikimini ve buna bağlı oksidatif stres düzeyindeki artışı yansıtmaktaydı. Buna karşın, LNCaP- HPR5M hücre hattında aynı koşullarda yeşil floresan ışımaya yoğunluğundaki artışın daha sınırlı olduğu gözlemlendi (Şekil 20). Elde edilen bulgular, LNCaP- HPR5M hücrelerinin uzun süreli H_2O_2 maruziyeti sonrasında geliştirdiği adaptasyonun sonucu oksidatif strese daha dirençli hale geldiğini ve aynı dozlarda daha düşük ROS birikimi gösterdiğini ortaya koydu.

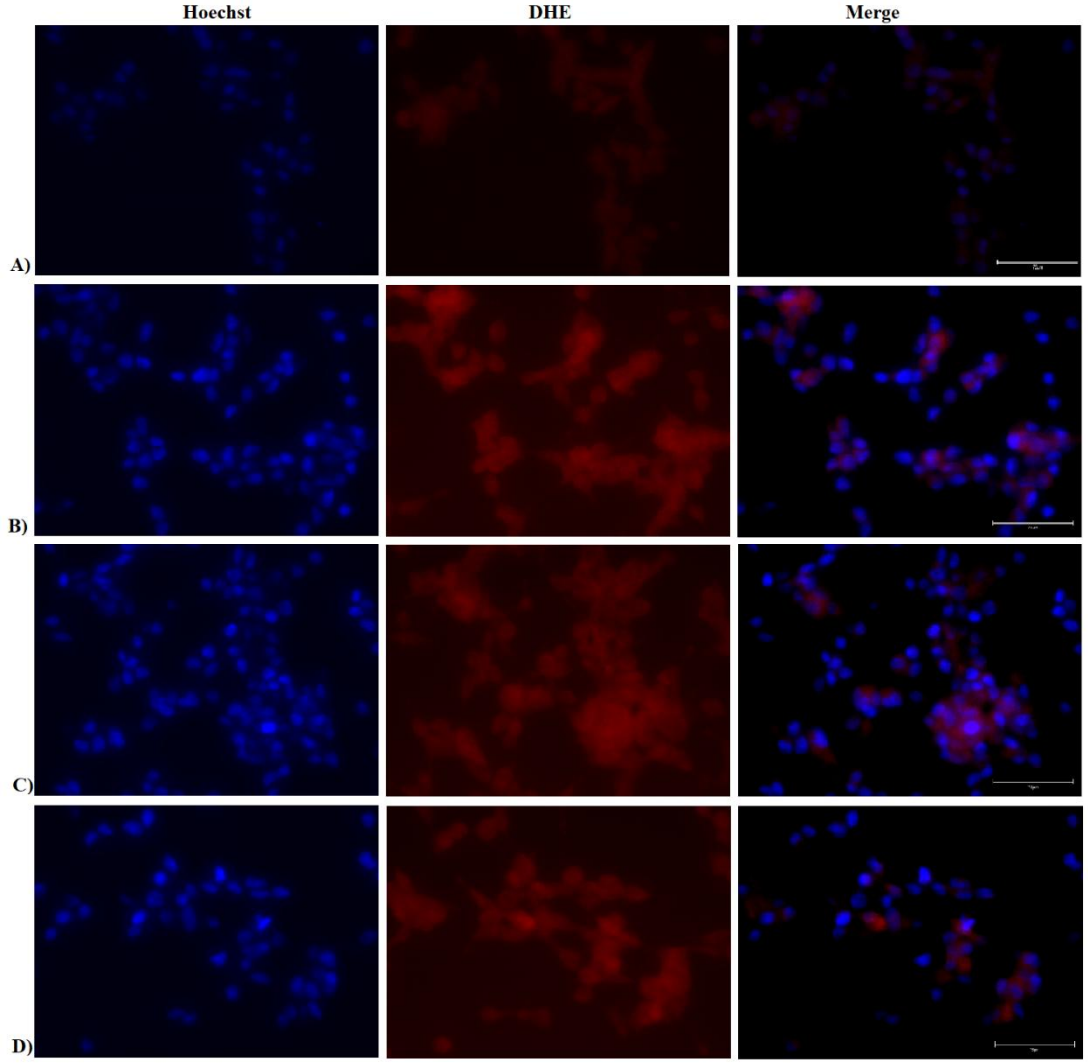


Şekil 19. Parental LNCaP hücre hattında 24 saatlik (A) kontrol (B) 25 μ M (C) 50 μ M ve (D) 100 μ M H₂O₂ uygulaması sonrası intrasellüler reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin CM-H₂DCFDA boyası ile floresan mikroskopi kullanılarak değerlendirilmesi.

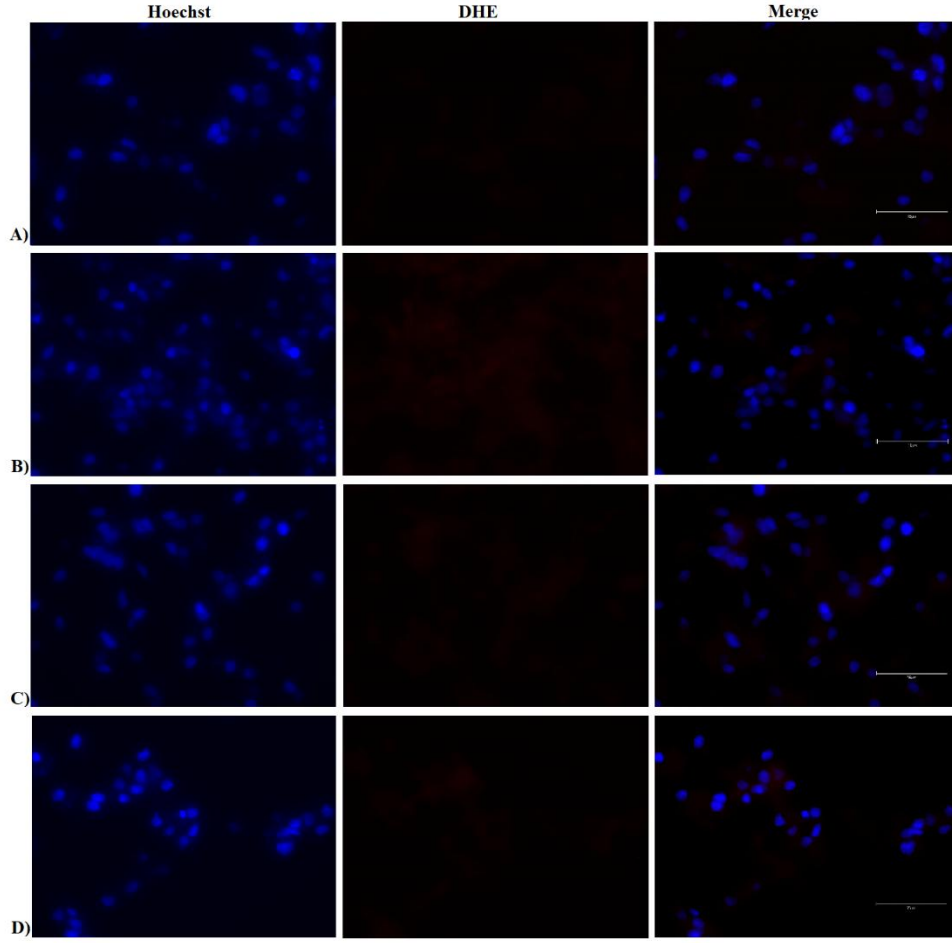


Şekil 20. LNCaP-HPR5M hücre hattında 24 saatlik (A) kontrol (B) 25 μ M (C) 50 μ M ve (D) 100 μ M H_2O_2 uygulaması sonrası intrasellüler reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin CM-H₂DCFDA boyası ile floresan mikroskopi kullanılarak değerlendirilmesi.

Hücrelerde intrasellüler süperoksit düzeyindeki değişimler incelendiğinde, hidrojen peroksit kaynaklı ROS birikimi ile benzer şekilde, parental LNCaP hücre hattında kırmızı floresan ışıma gösteren hücre oranının (Şekil 21) LNCaP-HPR5M hücre hattına (Şekil 22) kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgular, mikroskobik düzeyde elde edilen verilerin, akış sitometrisi ile belirlenen oksidatif stres düzeyleriyle uyumlu olduğunu ortaya koydu.



Şekil 21. Parental LNCaP hücre hatlarında 24 saatlik (A) kontrol (B) 25 μ M (C) 50 μ M ve (D) 100 μ M H_2O_2 uygulaması sonrası intrasellüler reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin DHE boyası ile floresan mikroskopi kullanılarak değerlendirilmesi.



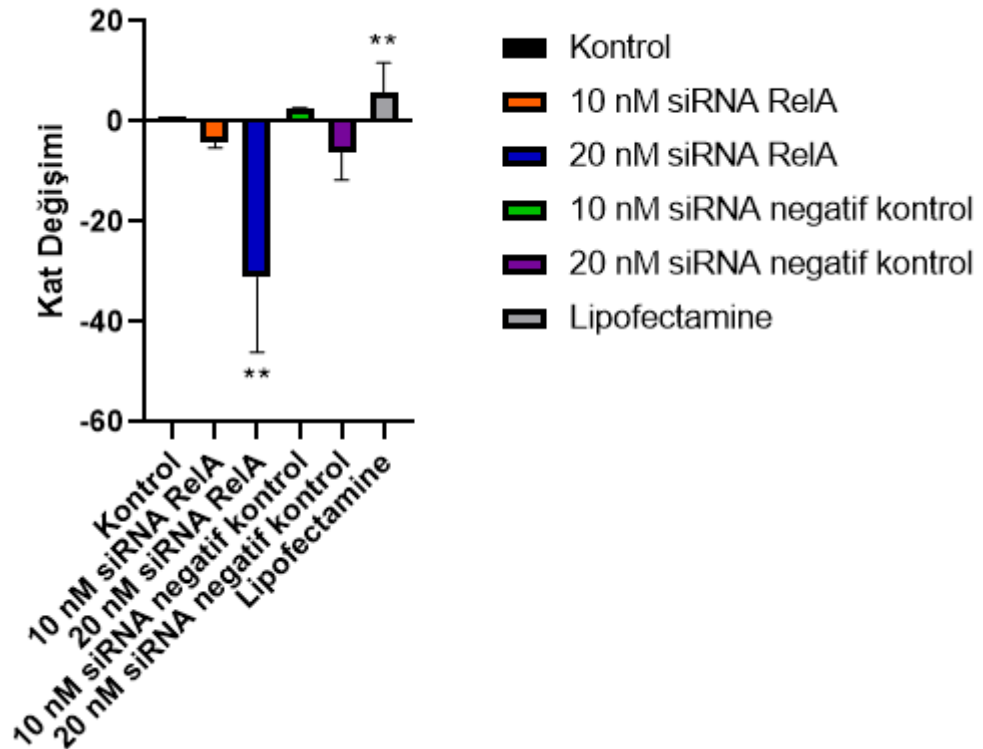
Şekil 22. LNCaP-HPR5M hücre hattında 24 saatlik (A) kontrol (B) 25 μ M (C) 50 μ M ve (D) 100 μ M H_2O_2 uygulaması sonrası intrasellüler reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin DHE boyası ile floresan mikroskopi kullanılarak değerlendirilmesi.

4.2. siRNA Transfeksiyonunun Optimizasyonu ve RelA Gen Sessizleştirme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

NF- κ B p-65 (RelA) siRNA doz optimizasyonunu sağlamak ve kullanılacak siRNA dozunu belirlemek amacıyla, kuyu başına $2,5 \times 10^5$ LNCaP-HPR5M hücresi olacak şekilde hücreler 6-kuyulu hücre kültürü plakalarına ekildi ve LipofectamineTM RNAiMAX ileri transfeksiyon protokolüne uygun olarak 10 nM ve 20 nM konsantrasyonlarında siRNA ile 9 μ L LipofectamineTM RNAiMAX kullanılarak 72 saatlik transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon etkinliği, RelA genine ait mRNA düzeyinin RT-qPCR ve Western Blot analizi aracılığıyla mRNA ve protein düzeyinde değerlendirildi.

4.2.1. siRNA transfeksiyonunun optimizasyonu ve RelA gen sessizleştirmesinin etkinliğinin RT-qPCR ile değerlendirilmesi

Transfeksiyonun optimizasyonu ve etkinliğinin mRNA düzeyinde değerlendirilmesi amacıyla RelA geni için gen ekspresyon değişimlerine ait log2 kat değişim (fold change) değerleri 10 nM siRNA RelA, 10 nM siRNA negatif kontrol, 20 nM siRNA RelA, 20 nM siRNA negatif kontrol (NK) ve lipofectamine için sırasıyla –4,04; 2,58; –28,84; –4,65 ve 4,20 (20 nM siRNA RelA ve siRNA negatif kontrol grupları için $p < 0,01$, Şekil 23) olarak bulundu. Analiz sonuçlarına göre, 20 nM siRNA-RelA grubunda hem kontrol hem de siRNA- negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde gen sessizleştirmesi gözlemlendi. Bu doz için sessizleştirme oranı %86,36 olarak hesaplandı. Buna karşın, 10 nM siRNA-RelA dozu ile anlamlı bir baskılama elde edilemedi. Bu bulgular doğrultusunda, 20 nM siRNA-RelA dozu, LNCaP-HPR hücrelerinde RelA gen ekspresyonunun etkin ve anlamlı şekilde baskılanması için optimal doz olarak seçildi.

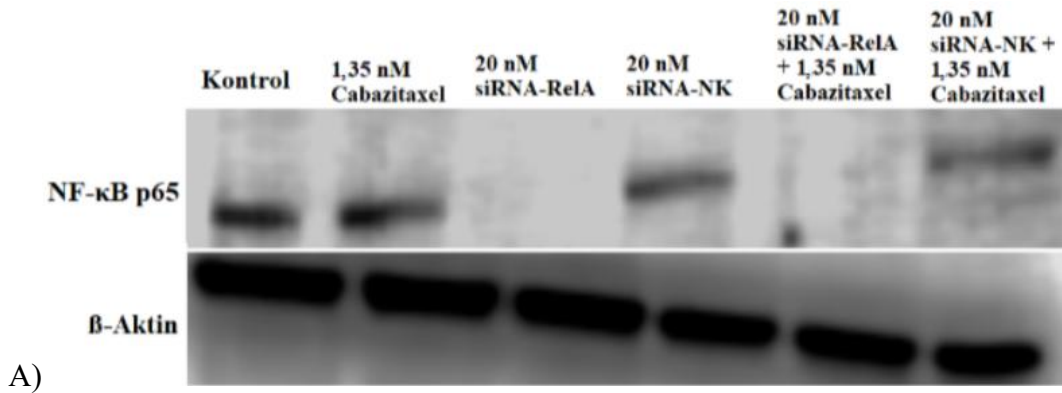


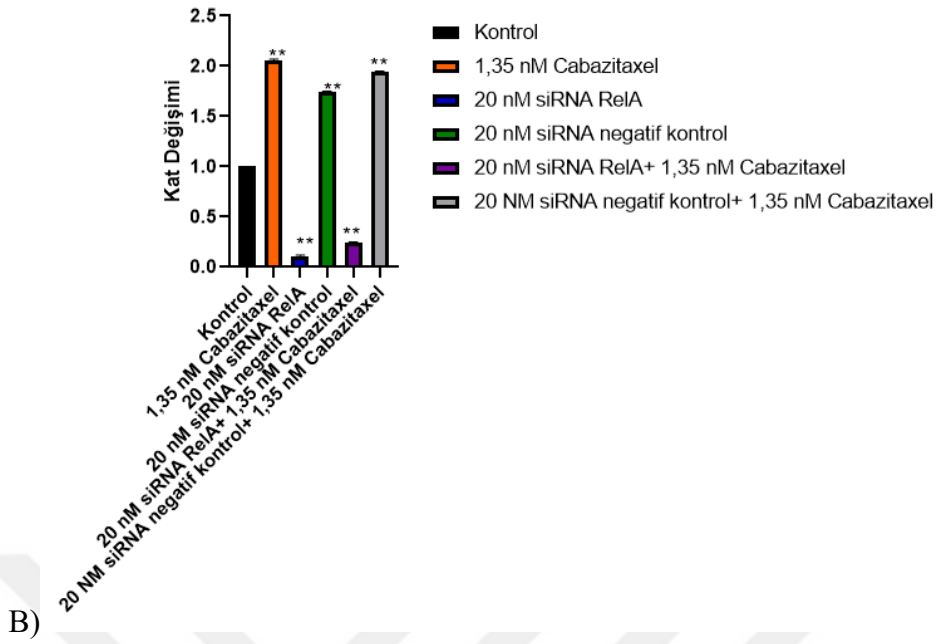
Şekil 23. SiRNA doz grupları için kat değişimi değerleri. (** $p < 0,01$)

4.2.2. siRNA transfeksiyonunun Western Blot yöntemi ile doğrulanması

LNCaP-HPR5M hücrelerinde NF- κ B p65 (RelA) alt biriminin siRNA ile sessizleştirilmesini doğrulamak amacıyla, 20 nM siRNA-RelA ve 20 nM siRNA-negatif kontrol ile transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücrelere 1,35 nM Cabazitaxel uygulandı. Transfeksiyon ve Cabazitaxel tedavisinin ardından 72. saatte protein izolasyonu gerçekleştirildi ve Western Blot analizi ile NF- κ B protein düzeyleri β - Aktin ile normalize edilerek kantitatif olarak değerlendirildi. Western Blot sonuçları, 20 nM siRNA RelA transfeksiyonu sonrasında NF- κ B protein ekspresyon düzeylerinin belirgin şekilde azaldığını, yani hedef genin başarılı bir şekilde sessizleştirildiğini gösterdi (Şekil 24A).

NF- κ B p65 protein ekspresyonları doz gruplarında incelendiğinde ise sırasıyla 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA- RelA, 20 nM siRNA- NK, 20nM siRNA- RelA + 1,35 nM Cabazitaxel ve 20 nM siRNA-NK+ 1,35 nM Cabazitaxel deney gruplarında NF- κ B p65 protein seviyelerinin sırasıyla 2,06-kat (artış), 0,11-kat (azalış), 1,74-kat (artış), 0,249-kat (azalış) ve 1,94- kat (artış) değiştiği ($p<0,001$) belirlendi. Sonuç olarak siRNA transfeksiyonu sonrası NF- κ B p65 protein ekspresyonu Cabazitaxel ve siRNA-NK ile tedavi edilen deney gruplarında artarken, tek başına siRNA-RelA ve siRNA-RelA+Cabazitaxel kombini ile tedavi edilen hücrelerde azaldı. 72 saat süren siRNA transfeksiyonu ve Cabazitaxel uygulaması sonrası LNCaP-HPR hücrelerinde gözlenen protein ekspresyon değişimlerinin istatistiksel analizi Şekil 24B’ de verilmektedir.



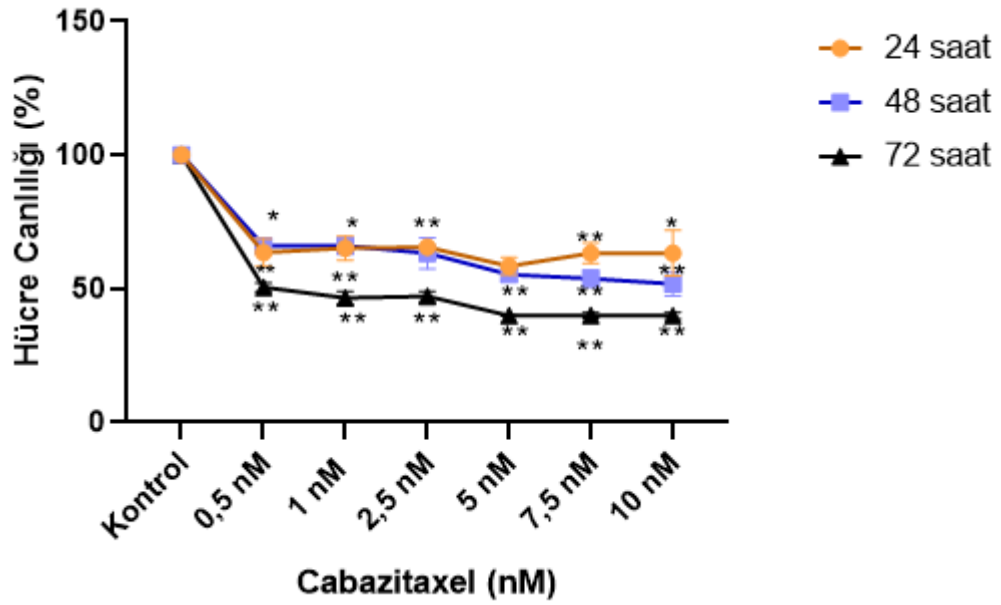


Şekil 24. LNCaP- HPR5M hücrelerinde NF- κB protein düzeylerinin siRNA RelA ve Cabazitaxel tedavisi sonrası A) Western Blot görüntüsü, B) kantitatif analizi ($p < 0,001$).

4.3. Sitotoksik Etkiler

4.3.1. Cabazitaxel'in parental LNCaP hücrelerinde sitotoksik etkisi

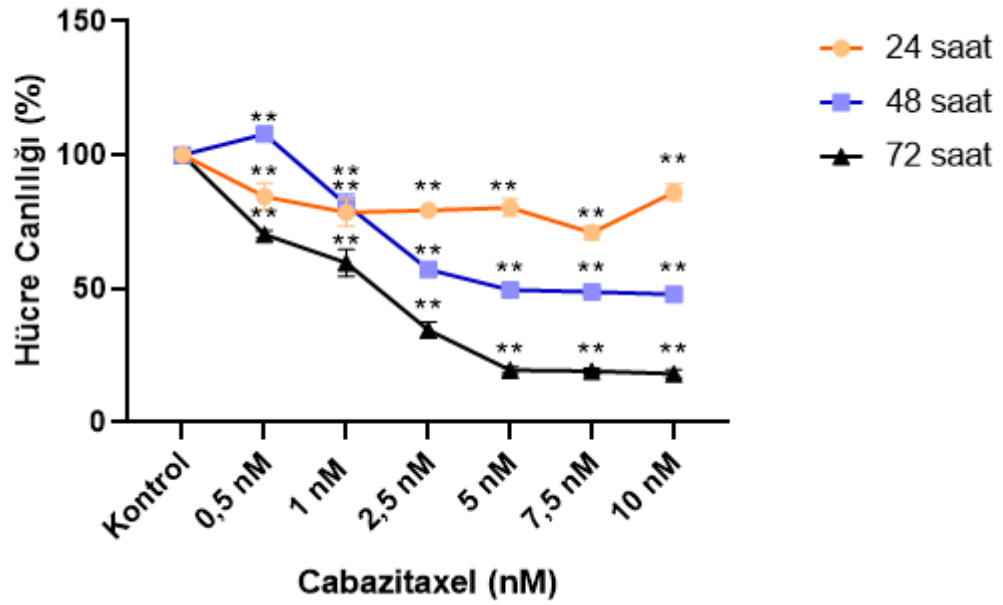
Cabazitaxel' in parental LNCaP hücre hattında 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 ve 10 nM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonrası sitotoksik etkiler WST1 hücre canlılığı analizi ile değerlendirildi. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı, 24 saat sonunda sırasıyla %65,26, %65,20, %65,52, %58,43, %63,33 ve %63,33'e ($p < 0,05$, $p < 0,01$), 48 saat sonunda sırasıyla %66,0, %66,0, %63,28, %55,28, %53,81 ve %51,76' ya ($p < 0,05$, $p < 0,01$) ve 72 saat sonunda ise sırasıyla %50,56, %46,61, %48,35, %39,91, %40,09 ve %39,97' ye ($p < 0,001$) azaldığı görüldü (Şekil 25). Cabazitaxel'in 72 saatlik uygulaması sonucunda parental LNCaP hücrelerindeki yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) değeri 0,57 nM olarak hesaplandı (X-int: -0,2377, Y-int: $0,03499 \pm 0,01349$).



Şekil 25. Parental LNCaP hücrelerinde Cabazitaxel' in 24,48 ve 72 saatlik sitotoksik etkileri (*p<0,05, **p<0,01).

4.3.2. Cabazitaxel' in LNCaP-HPR5M hücrelerinde sitotoksik etkisi

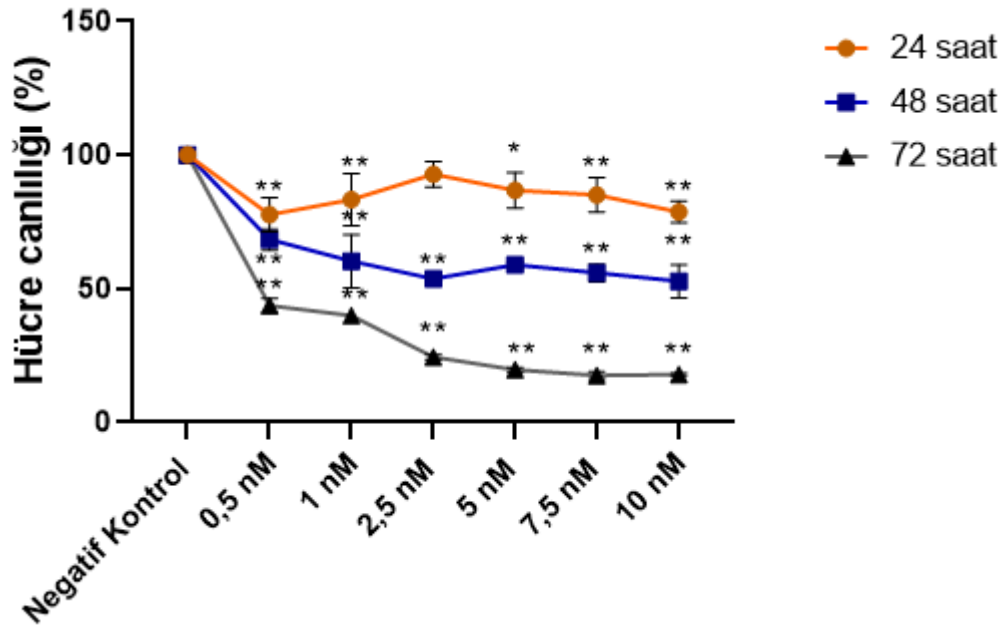
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücre hattında 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM ve 10 nM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonrasında sitotoksik etkileri WST1 hücre canlılığı analizi ile değerlendirildi. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saatlik uygulama sonucunda sırasıyla %84,46, %78,55, %79,33, %80,34, %70,90 ve %86,02'ye ($p<0,001$), 48 saatlik uygulama sonucunda sırasıyla, %107,85, %81,38, %57,17, %49,63, %48,3 ve %47,89'a ($p<0,001$) ve 72 saatlik uygulama sonucunda ise sırasıyla %70,37, %59,65, %34,53, %19,61, %19,16 ve %18,21'e ($p<0,001$) azaldığı görüldü (Şekil 26) Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücrelerinde 72 saatlik IC_{50} değeri 1,35 nM olarak hesaplandı (X-int: 0,12884, Y-int: -0,1110±0,04431).



Şekil 26. LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel' in 24,48 ve 72 saatlik sitotoksik etkileri (**p<0,01).

4.3.3. Cabazitaxel'in siRNA transfeksiyonu sonrasında LNCaP-HPR5M hücrelerinde sitotoksik etkisi

Cabazitaxel'in siRNA-RelA transfeksiyonu sonrasında LNCaP-HPR5M hücre hattındaki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla hücreler sabit dozda siRNA-RelA ile transfekte edildi ve 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM ve 10 nM dozlarda Cabazitaxel ile 24, 48 ve 72 saat sürelerde muamale edildi. Uygulama sonrasında sitotoksik etki WST-1 hücre canlılığı analizi ile değerlendirildi. Doz artışına bağlı olarak transfeksiyon uygulanmış LNCaP-HPR5M hücrelerinde 24 saatlik Cabazitaxel uygulaması sonucunda hücre canlılığı sırasıyla %77,65, %83,28, %92,77, %86,79, %85,10 ve %78,72'ye ($p<0,005$, $p<0,001$); 48 saatlik uygulama sonucunda %68,37, %60,26, %50,73, %58,89, %55,90 ve %52,75'e ($p<0,001$); 72 saatlik uygulama sonucunda ise %43,68, %39,88, %24,43, %19,64, %17,59 ve %17,95'e ($p<0,001$) azaldığı bulundu (Şekil 27). Cabazitaxel'in 20 nM siRNA-RelA ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücrelerinde 72 saatlik uygulaması sonucunda IC_{50} değeri 0,31 nM olarak hesaplandı (X-int: -0,5107, Y-int: 0,24315±0,01791).

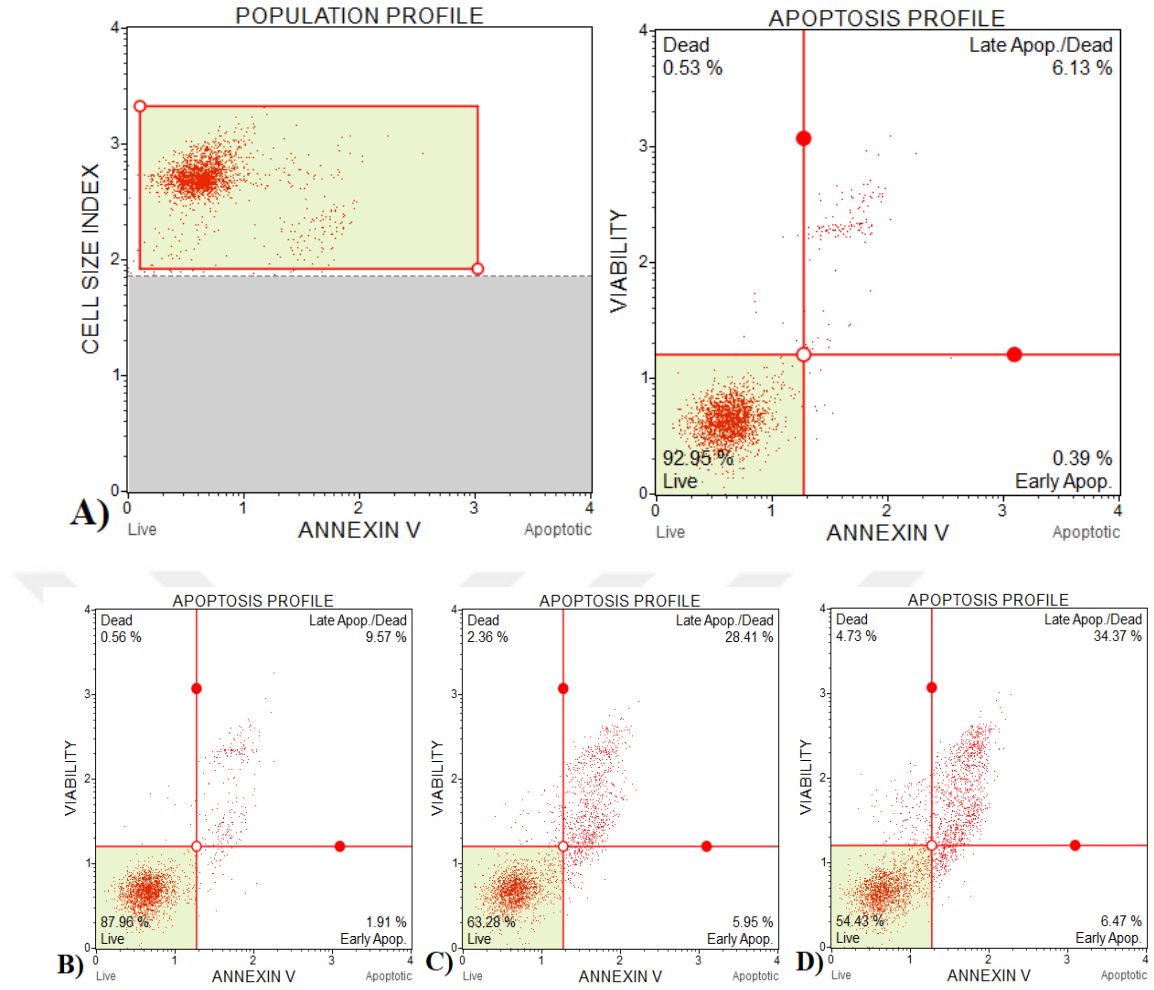


Şekil 27. SiRNA- RelA ile transfeksiyon sonrası LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel' in 24,48 ve 72 saatlik sitotoksik etkileri (*p<0,005, **p<0,001).

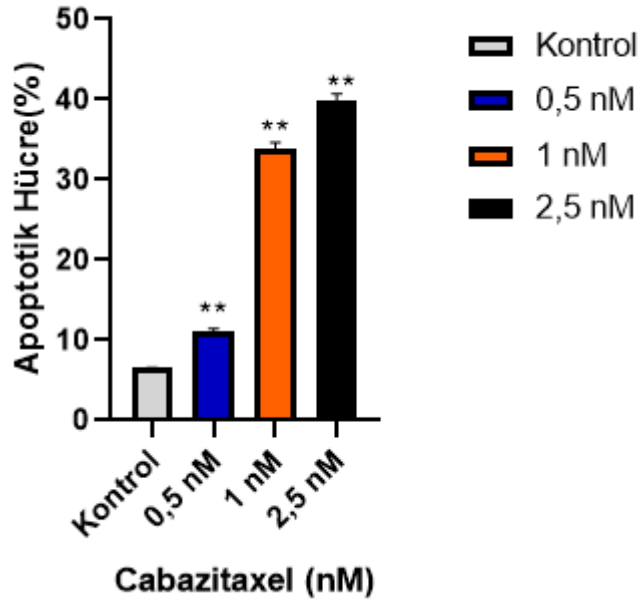
4.4. Apoptotik Etkiler

4.4.1. Parental LNCaP hücrelerinde Cabazitaxel'in apoptotik etkileri

Cabazitaxel'in parental LNCaP hücre hattında 0,5 nM, 1nM ve 2,5 nM konsantrasyonlarda 72 saatlik uygulaması sonucunda apoptotik etki doza bağımlı olarak artış gösterdi. Toplam apoptotik hücre oranları sırasıyla %11,48, %34,36 ve %40,84 olarak belirlendi (Şekil 28). Cabazitaxel tedavisinin, kontrol grubuyla kıyaslandığında 72 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) olduğu saptandı (Şekil 29).



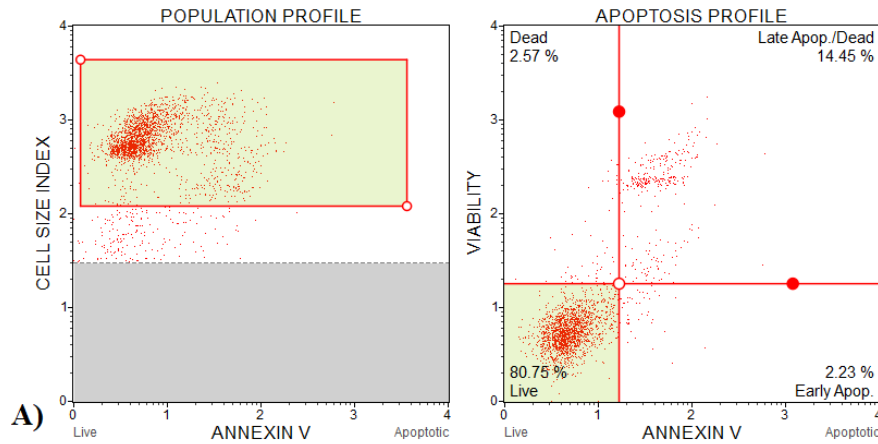
Şekil 28. Cabazitaxel'in parental LNCaP hücre hattında 72 saatlik apoptotik etkisi. (A) kontrol (B) 0,5 nM (C) 1 nM (D) 2,5 nM

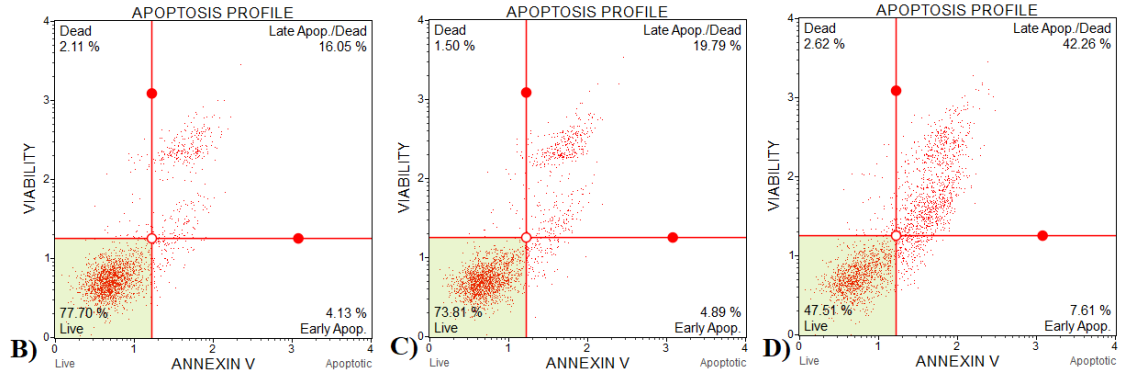


Şekil 29. Cabazitaxel'in parental LNCaP hücre hattında 72 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi. (**p<0,001)

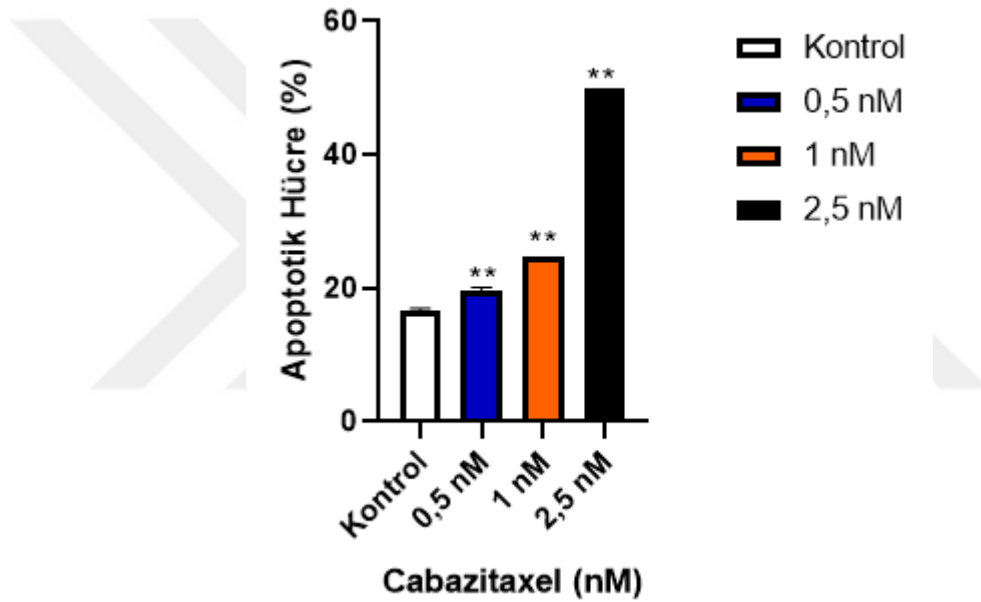
4.4.2. LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel'in apoptotik etkisi

Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücre hattında 0,5 nM, 1 nM ve 2,5 nM dozlarında 72 saatlik uygulaması sonucunda doz artışına bağlı olarak toplam apoptotik hücre oranları sırasıyla %20,18, %24,84 ve %49,87 olarak belirlendi (Şekil 30). Cabazitaxel tedavisinin LNCaP- HPR5M hücrelerinde 72 saatlik apoptotik etkisi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001) bulundu (Şekil 31).





Şekil 30. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücre hattında 72 saatlik apoptotik etkisi. (A) kontrol (B) 0,5 nM (C) 1 nM (D) 2,5 nM

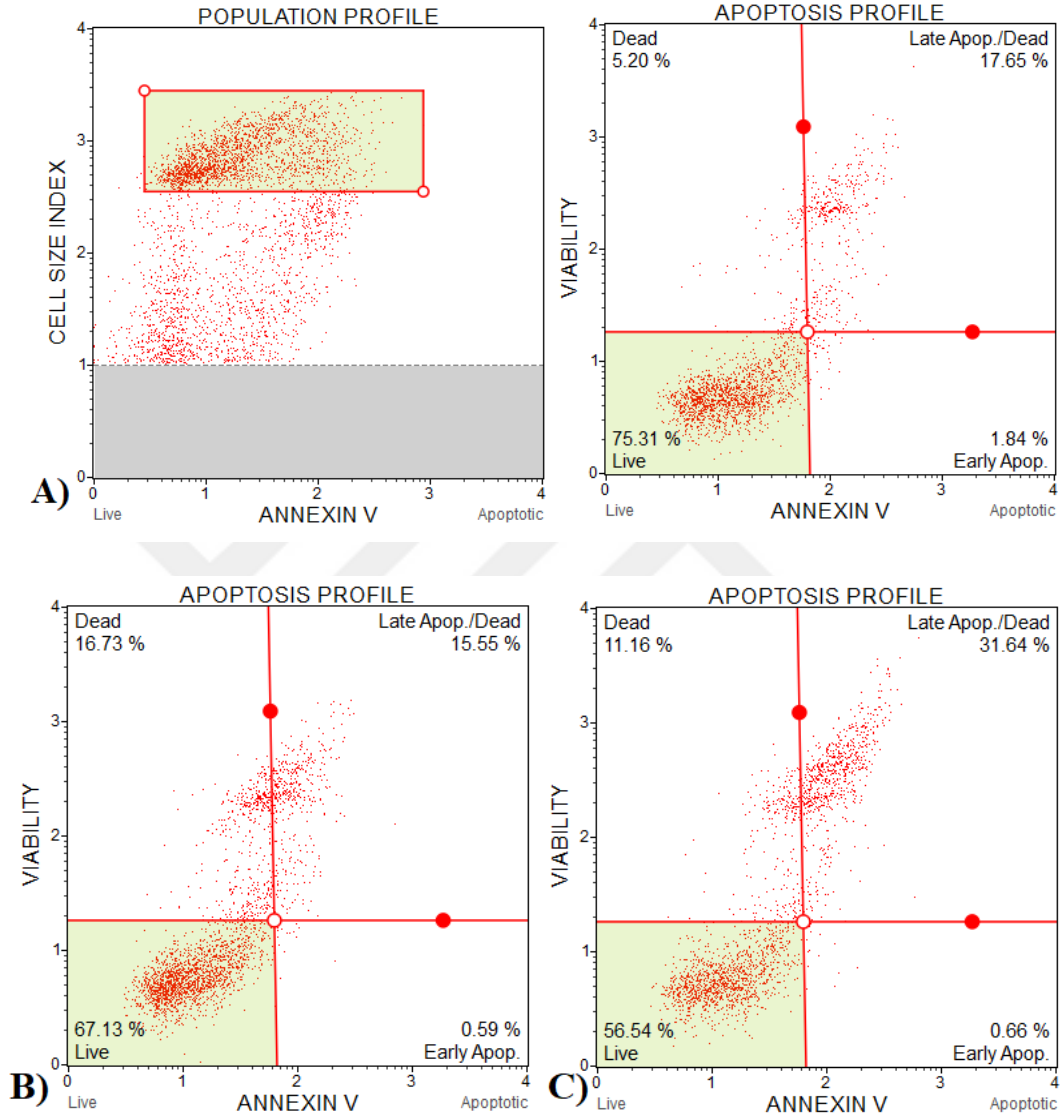


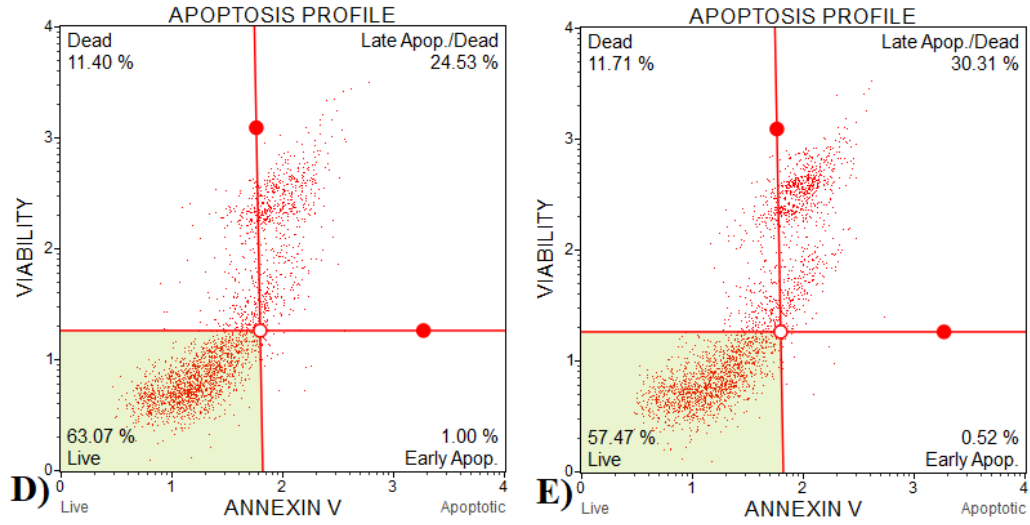
Şekil 31. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücre hattında apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (**p<0,001)

4.4.3. siRNA transfeksiyonu ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücrelerinde apoptotik etkisi

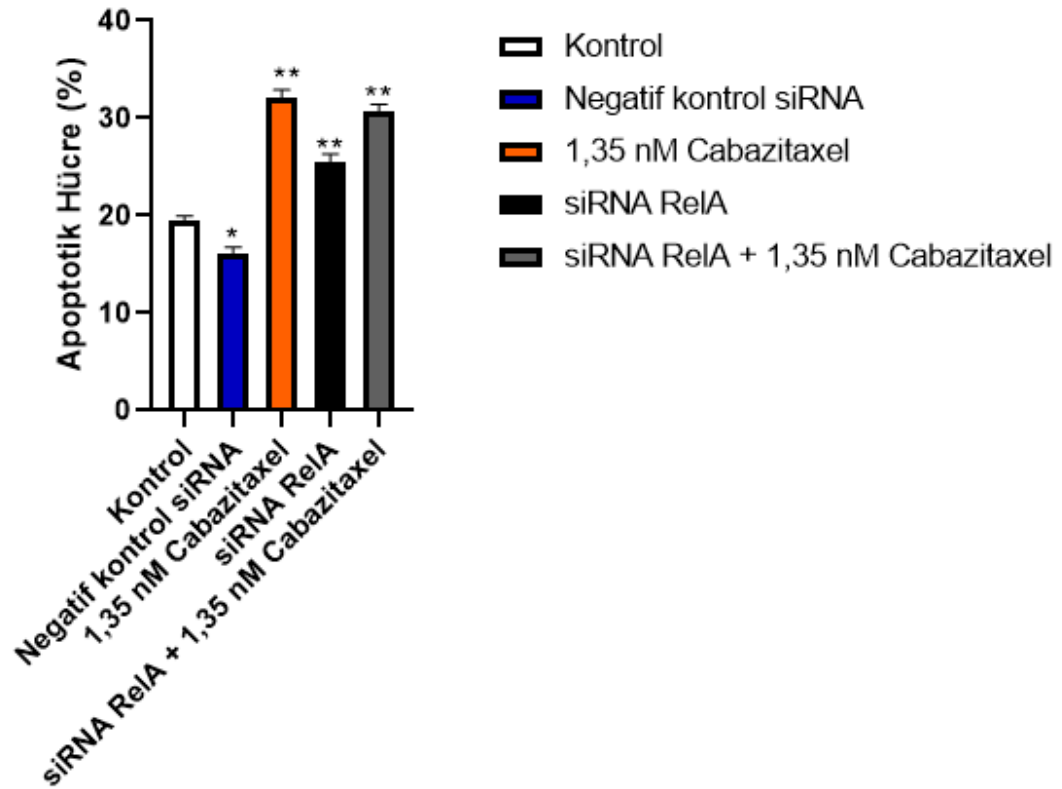
LNCaP-HPR5M hücre hattında siRNA-RelA transfeksiyonu ve Cabazitaxel'in 72 saatlik kombin tedavisinin apoptotik etkileri Annexin V analizi ile değerlendirildi. Hücrelere uygulanan 20 nM siRNA-negatif kontrol, 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA ve 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel tedavileri sonucunda toplam apoptotik hücre oranları sırasıyla %16,15, %32,30, %25,53 ve %30,38 olarak

belirlendi (Şekil 32). siRNA-RelA transfeksiyonu ile uygulanan Cabazitaxel kombinasyonunun LNCaP-HPR5M hücrelerinde oluşturduğu apoptotik etki, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 33).





Şekil 32. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-Rela ve Cabazitaxel kombin tedavisinin apoptotik etkileri (A) kontrol (B) 20 nM siRNA-negatif kontrol (C) 1,35 nM Cabazitaxel (D) 20 nM siRNA-Rela (E) 20 nM siRNA-Rela + 1,35 nM Cabazitaxel

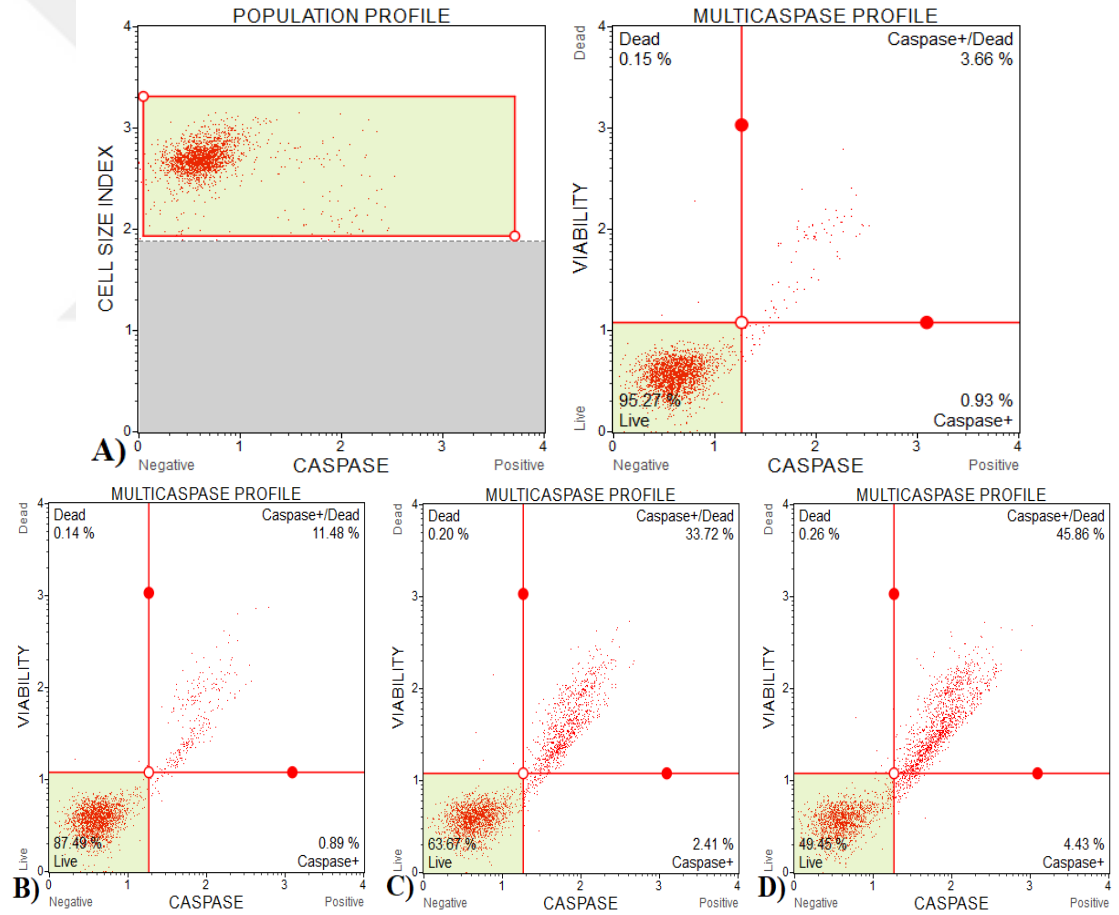


Şekil 33. SiRNA-Rela ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücre hattında apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (**p<0,001)

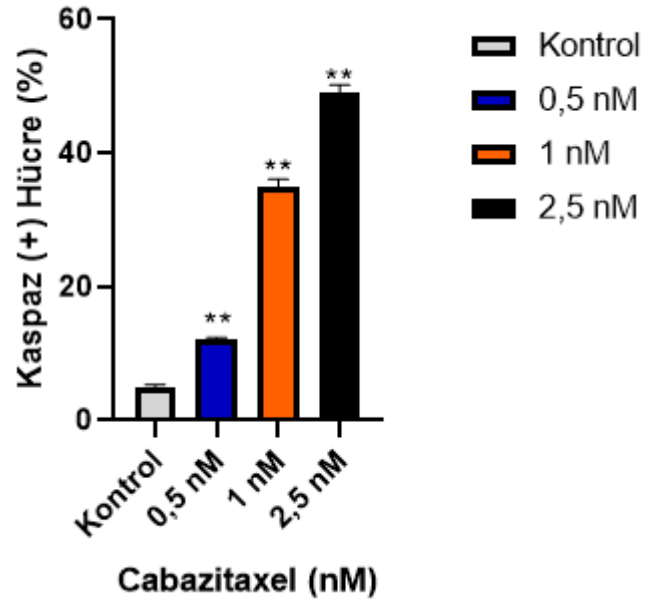
4.5. Hücrelerde Kaspaz Aktivasyonunun Akış Sitometrik Yöntem ile Değerlendirilmesi

4.5.1. Cabazitaxel' in LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkileri

LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonu 72 saatlik 0,5 nM, 1 nM ve 2,5 nM dozlarda Cabazitaxel uygulaması sonrasında Muse® Multicaspase analizi ile değerlendirildi. LNCaP hücrelerinde Cabazitaxel uygulaması sonucunda kaspaz pozitif hücre oranları sırasıyla %12,37, %36,13 ve %50,29 olarak belirlendi (Şekil 34). Cabazitaxel'in parental LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonu üzerindeki ekisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) bulundu (Şekil 35).



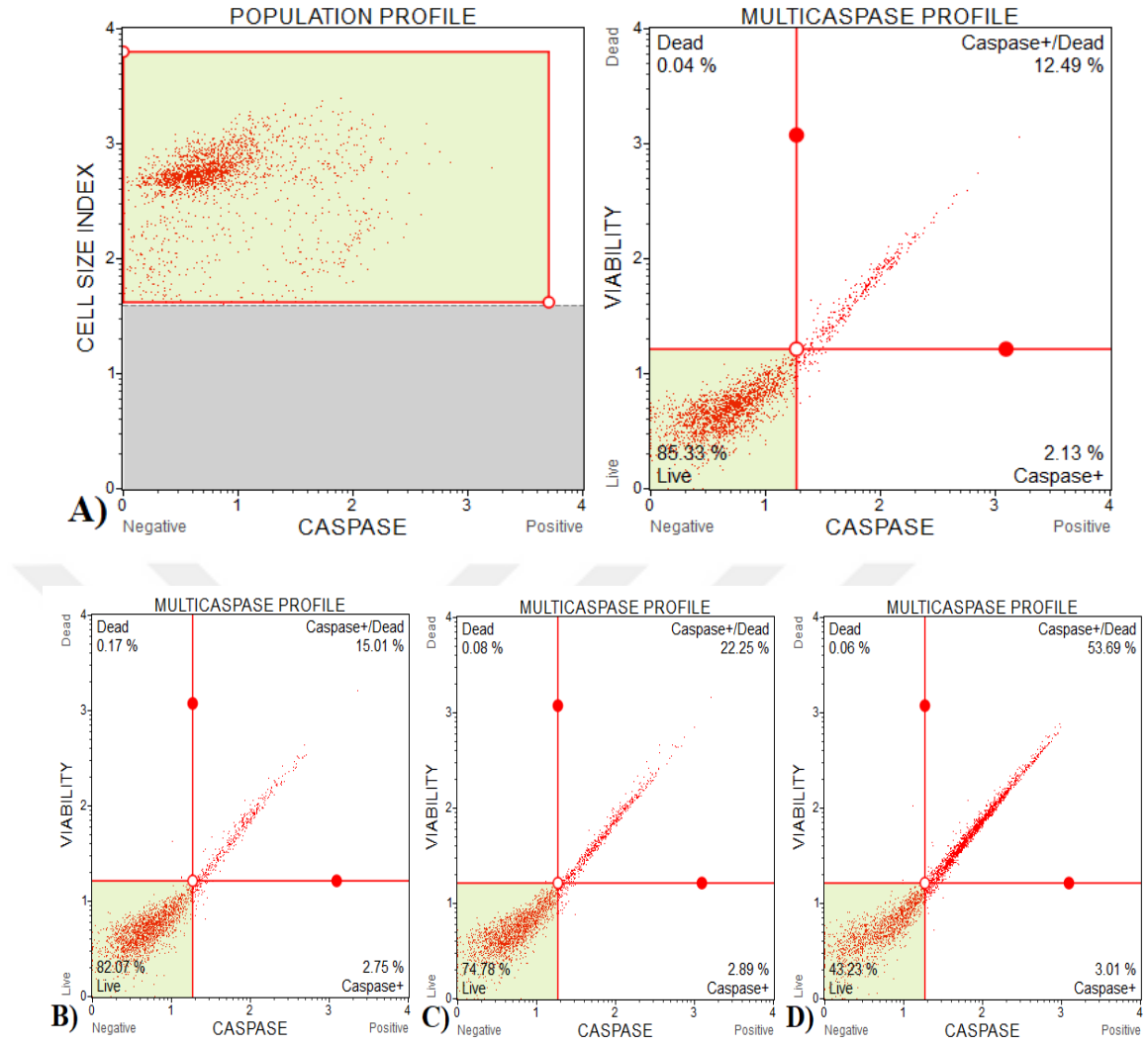
Şekil 34. Cabazitaxel'in parental LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkileri (A) kontrol (B) 0,5 nM (C) 1 nM (D) 2,5 nM



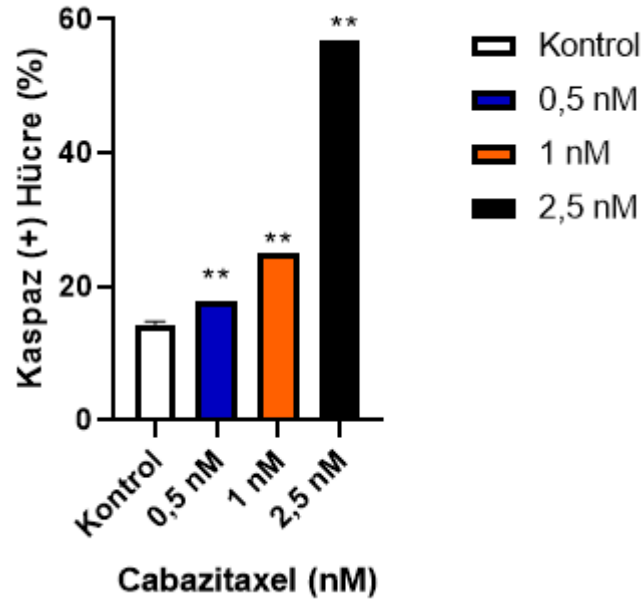
Şekil 35. Cabazitaxel'in parental LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0,001$).

4.5.2. Cabazitaxel' in LNCaP- HPR5M hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkileri

LNCaP- HPR5M hücrelerinde kaspaz aktivasyonu 72 saatlik 0,5 nM, 1 nM ve 2,5 nM dozlarda Cabazitaxel uygulaması sonrasında Muse®Multicaspase analizi ile değerlendirildi. LNCaP-HPR5M hücrelerinde Cabazitaxel uygulaması sonucunda kaspaz pozitif hücrelerin oranı sırasıyla %17,76, %25,14 ve %56,7 olarak bulundu (Şekil 36). Cabazitaxel'in LNCaP- HPR5M hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkisi kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) bulundu (Şekil 37).



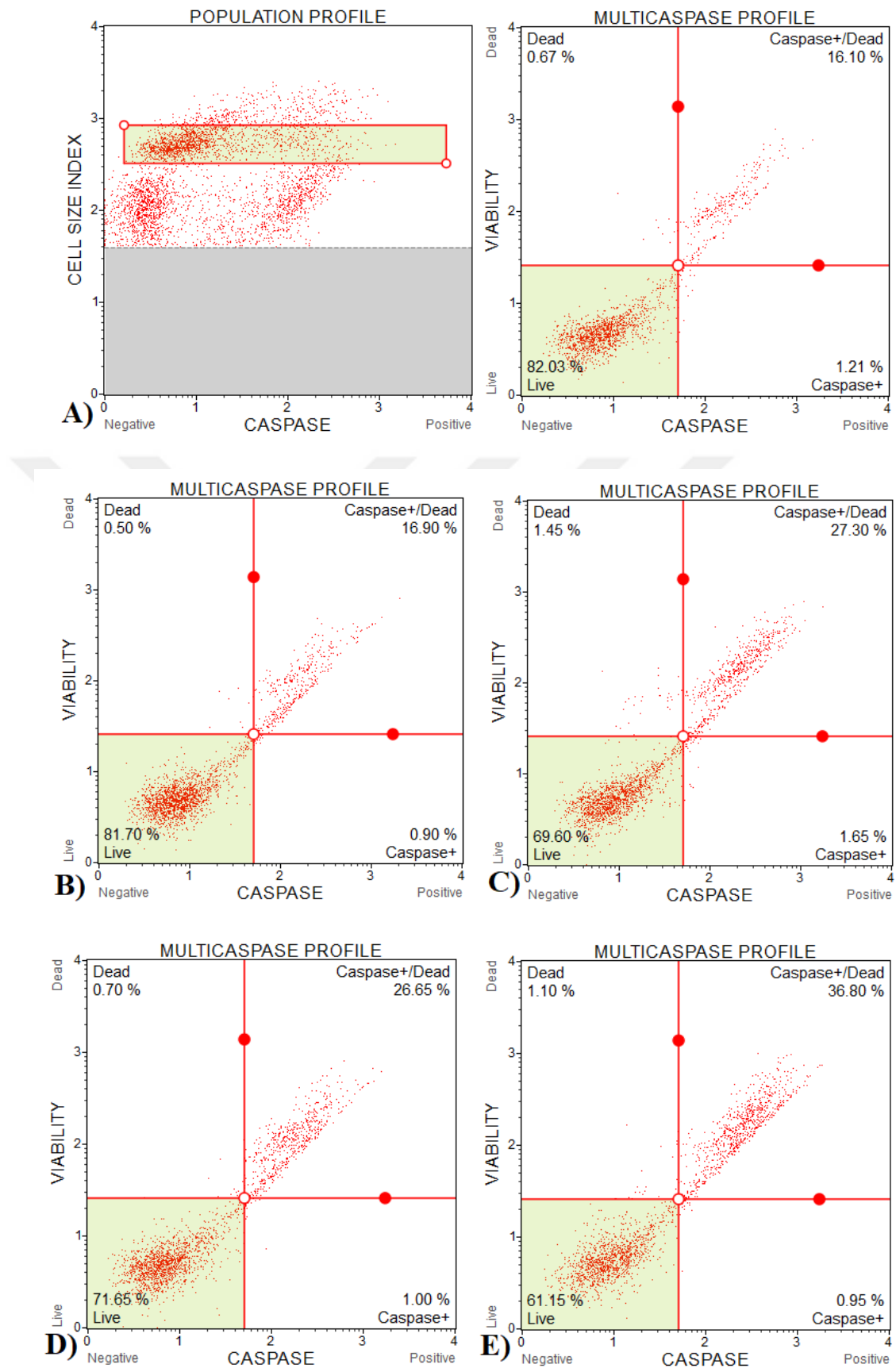
Şekil 36. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkisi (A) kontrol (B) 0,5 nM (C) 1 nM (D) 2,5 nM



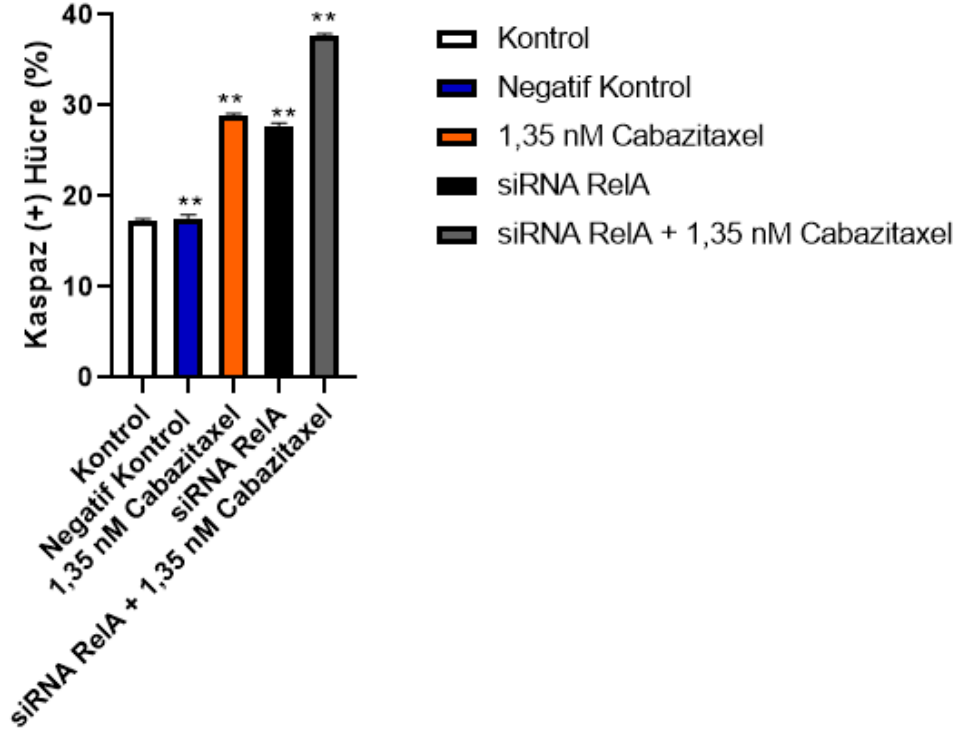
Şekil 37. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR5M hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0,001$)

4.5.3. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA transfeksiyonu ve Cabazitaxel kombin tedavisinin kaspaz aktivasyonuna etkisi

LNCaP-HPR5M hücre hattında siRNA-RelA transfeksiyonu ve Cabazitaxel'in 72 saatlik kombin tedavisinin hücrelerdeki kaspaz aktivasyonuna etkileri Muse®Multicaspase analizi ile değerlendirildi. Hücrelere uygulanan 20 nM siRNA-negatif kontrol, 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA ve 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel tedavileri sonucunda kaspaz pozitif hücre oranları sırasıyla %17,8, %28,95, %27,65 ve %37,55 olarak bulundu (Şekil 38). LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin kaspaz aktivasyonuna etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulundu (Şekil 39).



Şekil 38. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin hücrelerdeki kaspaz aktivasyonuna etkisi (A) kontrol (B) 20 nM siRNA-negatif kontrol (C) 1,35 nM Cabazitaxel (D) 20 nM siRNA-RelA (E) 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel

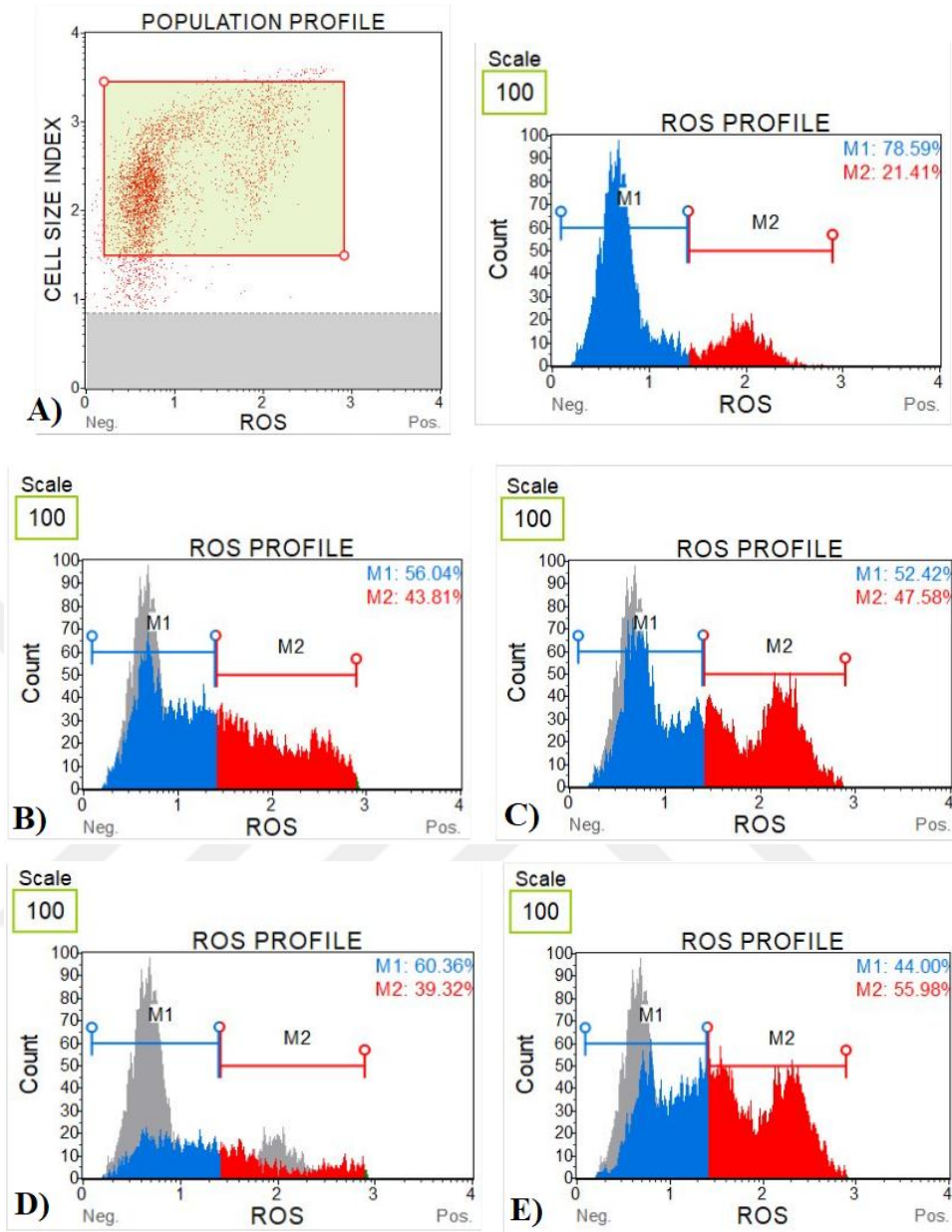


Şekil 39. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin kaspaz aktivasyonuna etkisinin istatistiksel analizi (**p<0,001).

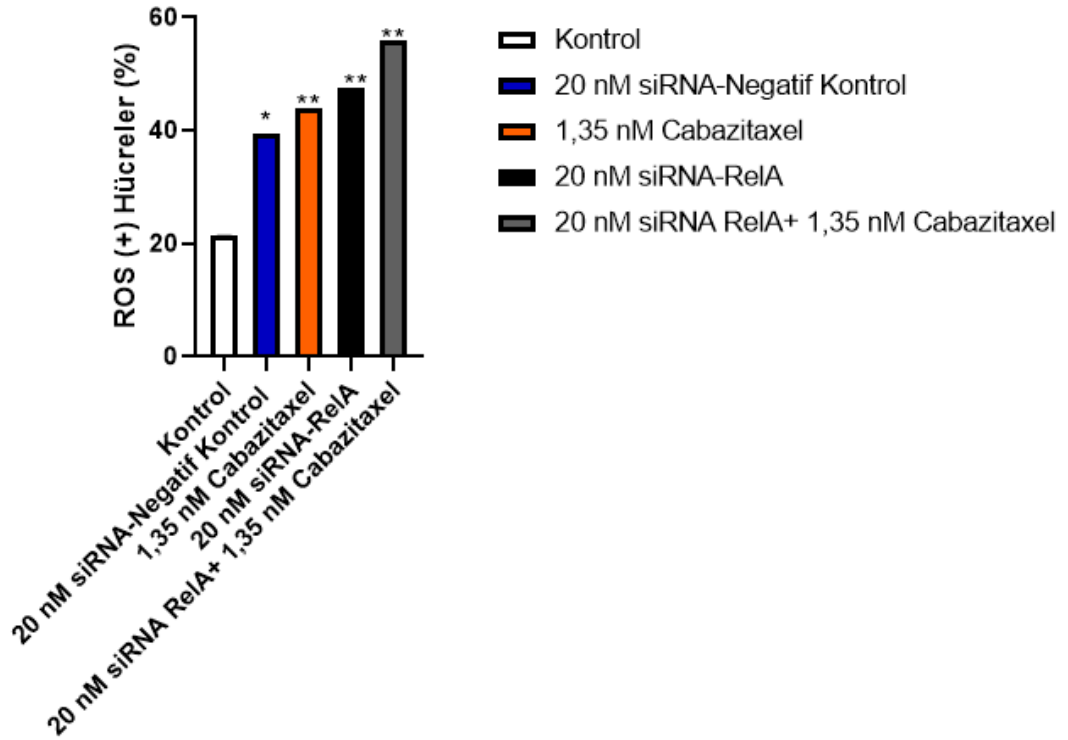
4.6.Oksidatif Stres Üzerine Etkiler

4.6.1. siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücre hattında oksidatif stres üzerine etkilerinin akış sitometrik analizi

LNCaP-HPR5M hücre hattında siRNA-RelA ve Cabazitaxel'in 72 saatlik tedavisinin hücrelerdeki oksidatif stres üzerine etkileri, Muse®Oxidative Stress analizi ile değerlendirildi. Hücrelere uygulanan 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA, 20 nM siRNA-negatif kontrol ve 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel tedavileri sonucunda ROS-pozitif hücre oranlarının kontrol grubundaki %21,41 seviyesinden sırasıyla %43,81, %47,58, %39,32 ve %55,98'e arttığı belirlendi (Şekil 40). LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin ROS pozitif hücre artışına etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05, p<0,001) bulundu (Şekil 41).



Şekil 40. SiRNA-RelA ve Cabazitaxel'in 72 saatlik tedavisinin LNCaP-HPR5M hücrelerinde oksidatif stres artışına etkilerinin akış sitometrik analizi (A) kontrol (B) 1,35 nM Cabazitaxel (C) 20 nM siRNA-RelA (D) 20 nM siRNA-negatif kontrol (E) 20 nM siRNA-RelA+ 1,35 nM Cabazitaxel



Şekil 41. SiRNA-RelA ve Cabazitaxel'in 72 saatlik tedavisinin LNCaP-HPR5M hücrelerinde oksidatif stres artışına etkilerinin istatistiksel analizi (*p<0,005, **p<0,001).

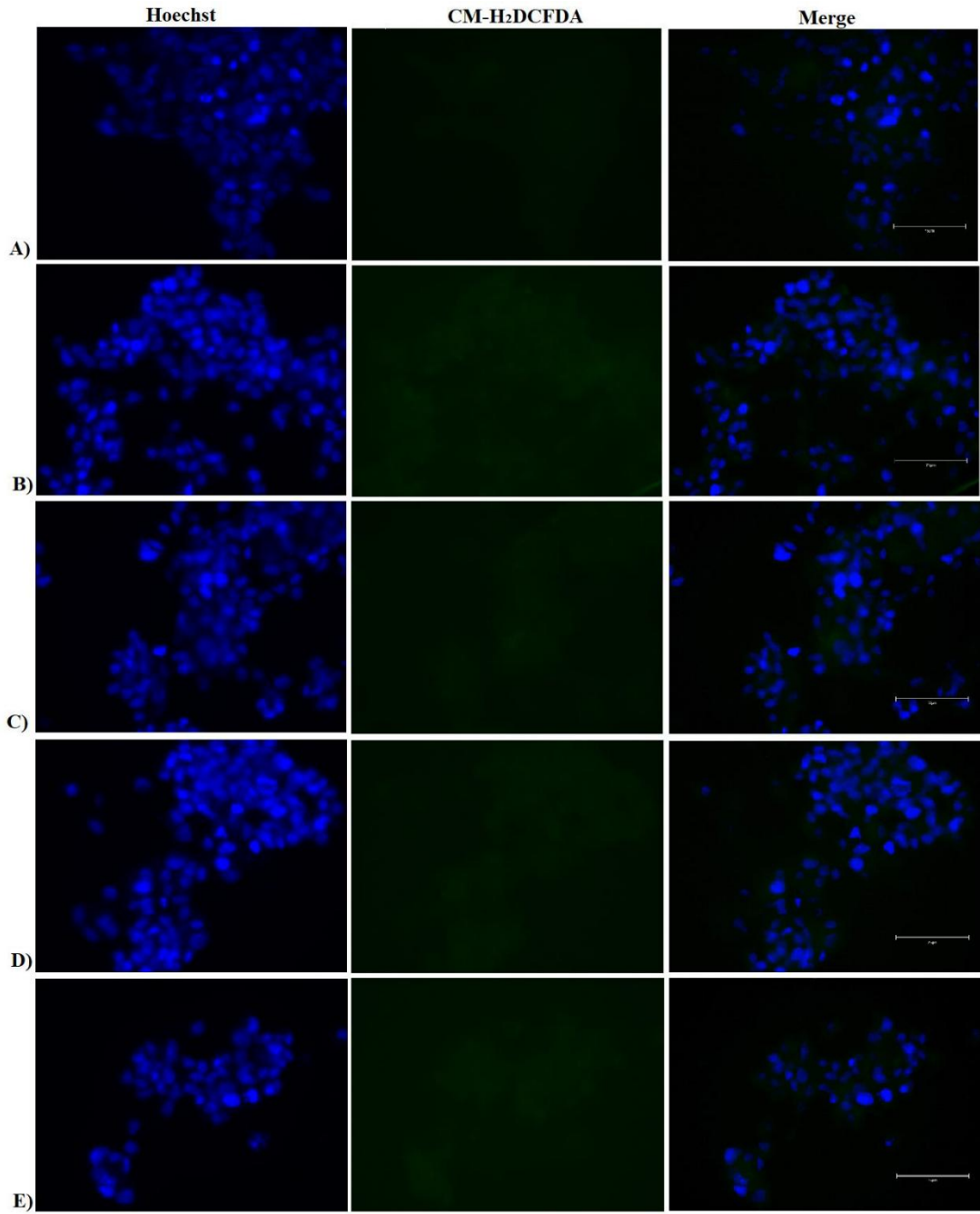
4.6.2. siRNA-RelA ve Cabazitaxel kombin tedavisinin LNCaP-HPR5M hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkilerinin mikroskopik analizi

LNCaP-HPR5M hücre hattında siRNA-RelA ve Cabazitaxel'in 72 saatlik tekli ve kombin tedavilerinin hücrelerdeki oksidatif stres üzerindeki etkileri mikroskopik olarak analiz edildi. Bu kapsamda, 72 saatlik 20 nM siRNA-negatif kontrol, 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA ve 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel tedavileri sonrasında hücrelerdeki intrasellüler hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu birikimleri floresan mikroskobu ile görüntülendi. Akış sitometrik oksidatif stres analizleri ile uyumlu şekilde, yeşil floresan artışı hücre içi hidrojen peroksit seviyelerindeki yükselme, kırmızı floresan artışı ise süperoksit anyonlarının birikimi olarak yorumlandı. Görüntülemeler, Hoechst ile boyanmış nükleusların çakışık görüntüleri ile birlikte, 75 µm ölçekte elde edildi.

4.6.2.1. Hidrojen peroksit birikiminin mikroskopik analizi

Şekil 42'de görüldüğü üzere, LNCaP-HPR5M hücre hattında 72 saatlik 20 nM siRNA-negatif kontrol, 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA ve 20 nM siRNA-RelA+ 1,35 nM Cabazitaxel tedavileri sonrasında intrasellüler hidrojen peroksit

birikiminin, doz artışına bağlı olarak özellikle kombin tedavi grubunda en belirgin şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 42). Nükleus morfolojisini koruyan hücre popülasyonu içerisinde hidrojen peroksit düzeylerinde belirgin bir artış meydana geldiği gözlenmiş olup bu durum yeşil floresan ışığa gösteren hücre yoğunluğundaki artışla da doğrulandı. Elde edilen mikroskobik bulgular, akış sitometrik oksidatif stres verileriyle tutarlılık göstermekte idi.

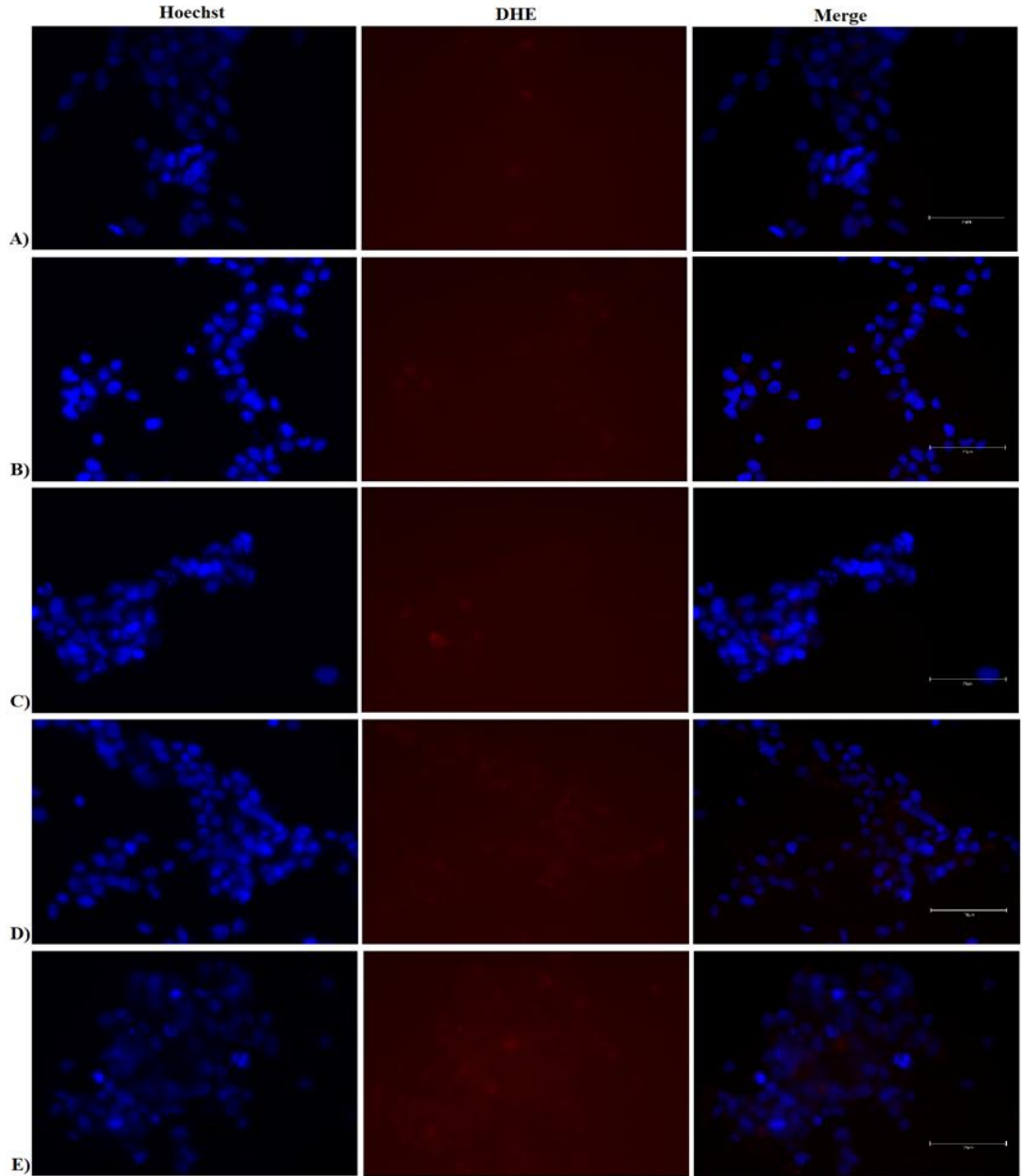


Şekil 42. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA ve Cabazitaxel tekli ve kombin tedavilerinin

intracellüler H_2O_2 birikimi üzerine etkisi. (A) kontrol (B) 20nM siRNA-negatif kontrol (C) 1,35 nM Cabazitaxel (D) 20 nM siRNA-RelA (E) 20 nM siRNA-RelA+ 1,35 nM Cabazitaxel (Bar uzunluğu 75 μ m)

4.6.2.2. Süperoksit anyonlarının birikiminin mikroskopik analizi

Şekil 43'te görüldüğü üzere, LNCaP-HPR5M hücre hattında 72 saatlik 20 nM siRNA-negatif kontrol, 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA ve 20 nM siRNA-RelA+ 1,35 nM Cabazitaxel tedavileri sonrasında intracellüler süperoksit anyonu birikiminin, doz artışına bağlı olarak özellikle kombin tedavi grubunda en belirgin şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 43). Nükleus morfolojisini koruyan hücre popülasyonu içerisinde süperoksit anyonu düzeylerinde belirgin bir artış meydana geldiği gözlemlenmiş olup bu durum kırmızı floresan ışığa gösteren hücre yoğunluğundaki artışla da doğrulandı. Elde edilen mikroskopik bulgular, akış sitometrik oksidatif stres verileriyle tutarlılık göstermekte idi.



Şekil 43. LNCaP-HPR5M hücrelerinde siRNA-RelA ve Cabazitaxel tekli ve kombin tedavilerinin intrasellüler süperoksit anyonu birikimi üzerine etkisi. (A) kontrol (B) 20nM siRNA-negatif kontrol (C) 1,35 nM Cabazitaxel (D) 20 nM siRNA-RelA (E) 20 nM siRNA-RelA+ 1,35 nM Cabazitaxel (Bar uzunluğu 75 μ m)

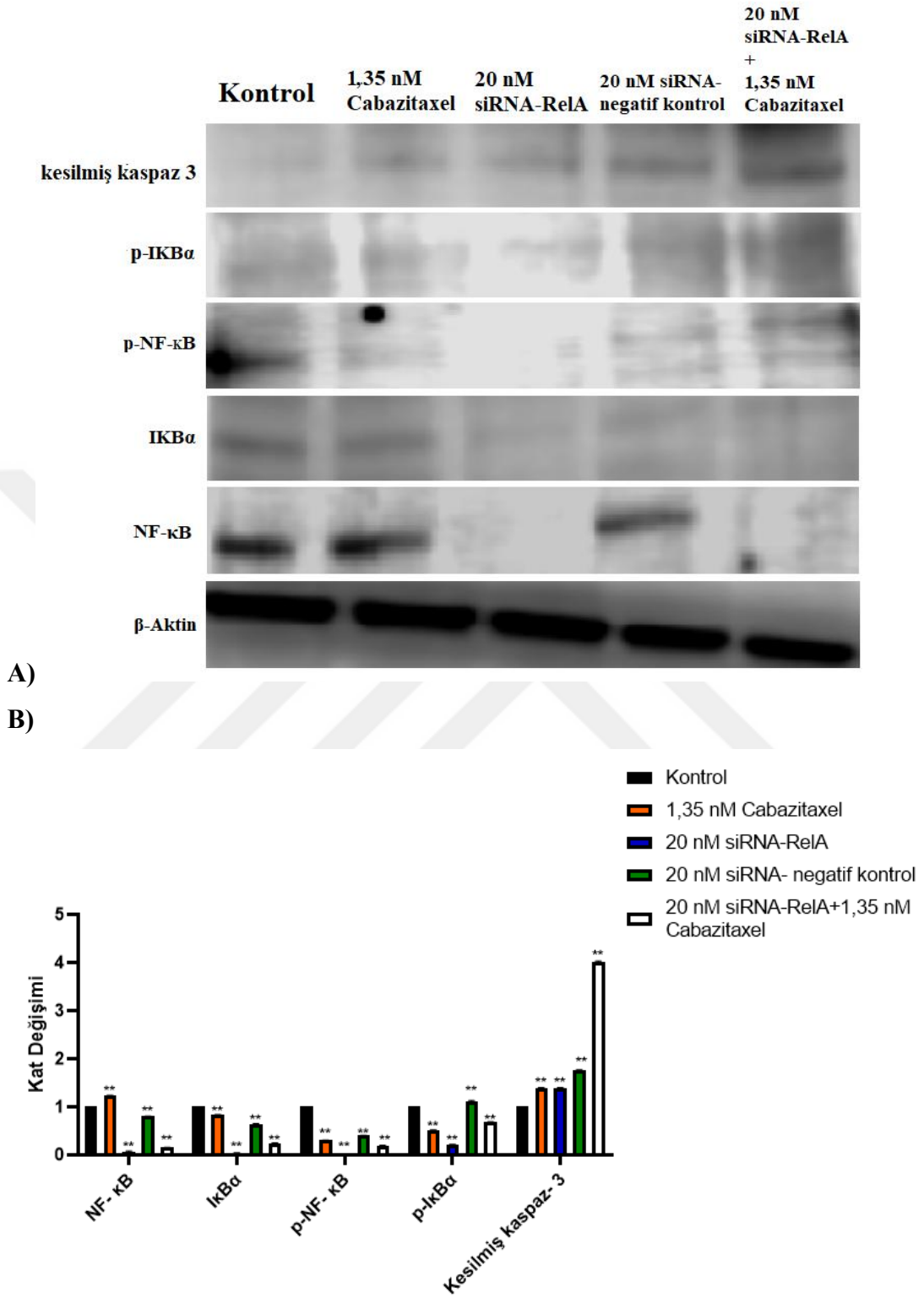
4.7. Protein Ekspresyonu Üzerine Etkiler

4.7.1. siRNA-RelA ve Cabazitaxel'in tekli ve kombin tedavilerinin LNCaP-HPR5M hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

SiRNA-RelA ve Cabazitaxel'in tekli ve kombin tedavilerinin LNCaP-HPR5M hücre hattında NF- κ B sinyal yolu ve apoptotik aktivasyon üzerindeki etkilerini analiz etmek amacıyla; Kontrol, 1,35 nM Cabazitaxel, 20 nM siRNA-RelA, 20 nM siRNA-

negatif kontrol ve 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel olmak üzere beş farklı deney grubu oluşturularak bu gruplarda total NF- κ B, total I κ B α , p-NF- κ B, p-I κ B α ve kesilmiş kaspaz-3 protein düzeyleri Western blot yöntemi ile analiz edildi. Referans protein olarak β -Aktin kullanıldı. Elde edilen protein bant yoğunluk değerleri β -aktin ile normalize edilerek her bir deney grubundaki değişim düzeyleri kontrol grubuna göre kat değişimi (fold change) üzerinden hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla 1,35 nM Cabazitaxel tedavisiyle NF- κ B protein düzeyi 1,23 kat (artış), p-NF- κ B düzeyi 0,30 kat (azalış), p-I κ B α düzeyi ise 0,51 kat (azalış) olarak belirlendi.

siRNA-RelA uygulamasıyla NF- κ B, I κ B α ve p-NF- κ B düzeyleri sırasıyla 0,07 (azalış); 0,043 (azalış) ve 0,022 kat (azalış) olarak saptandı ve bu da siRNA-RelA'nın hedef proteini etkin biçimde susturduğuna işaret etti. Aynı grupta kesilmiş kaspaz-3 düzeyi 1,39-kat ($p < 0,001$) arttı. SiRNA-negatif kontrol uygulanan grupta NF- κ B ve p-NF- κ B düzeyleri sırasıyla 0,80-kat (azalış) ve 0,40-kat (azalış), kesilmiş kaspaz-3 düzeyi ise 1,76-kat (artış) (tüm deney grupları için $p < 0,001$) olarak ölçüldü. Bu grup, transfeksiyon sürecinin kendisinin de hücre içi yanıtları etkileyebileceğini göstermekte idi. En dikkat çekici bulgu, 20 nM siRNA-RelA + 1,35 nM Cabazitaxel kombinasyonu ile elde edildi. Bu grupta NF- κ B ve p-NF- κ B düzeyleri sırasıyla 0,15 (azalış) ve 0,19 kata düşerken, kesilmiş kaspaz-3 düzeyi 4,02 kat arttı (Tüm deney grupları için $p < 0,001$, Şekil 44). Bu sonuçlar, RelA susturulmasının Cabazitaxel'in apoptotik etkisini anlamlı düzeyde arttırdığını göstermektedir.



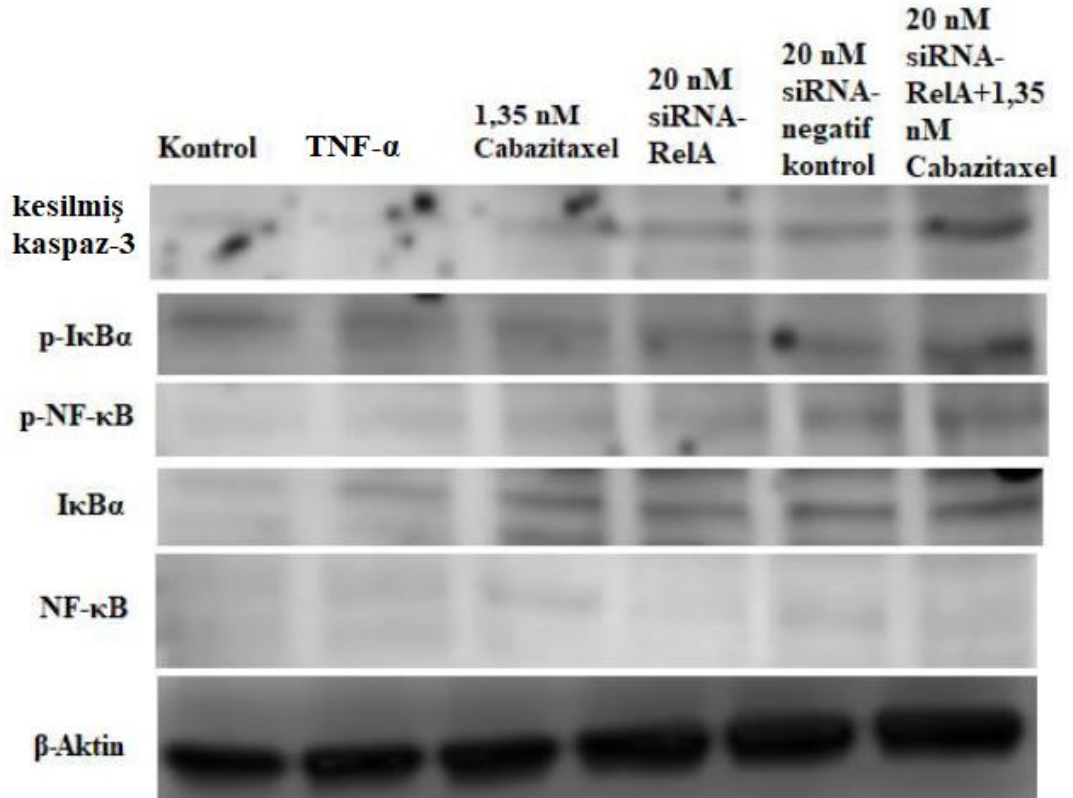
Şekil 44. LNCaP-HPR5M hücrelerinde farklı tedavilerin (Kontrol, Cabazitaxel, siRNA-RelA, siRNA-Negatif Kontrol ve siRNA-RelA + Cabazitaxel) NF- κ B sinyal yolu ve apoptozla ilişkili proteinler üzerindeki etkileri. (A) Western Blot görüntüsü (B) Kantitatif analiz ($p < 0,001$)

4.7.2. siRNA-RelA ve Cabazitaxel'in tekli ve kombin tedavilerinin TNF- α ile uyarılan

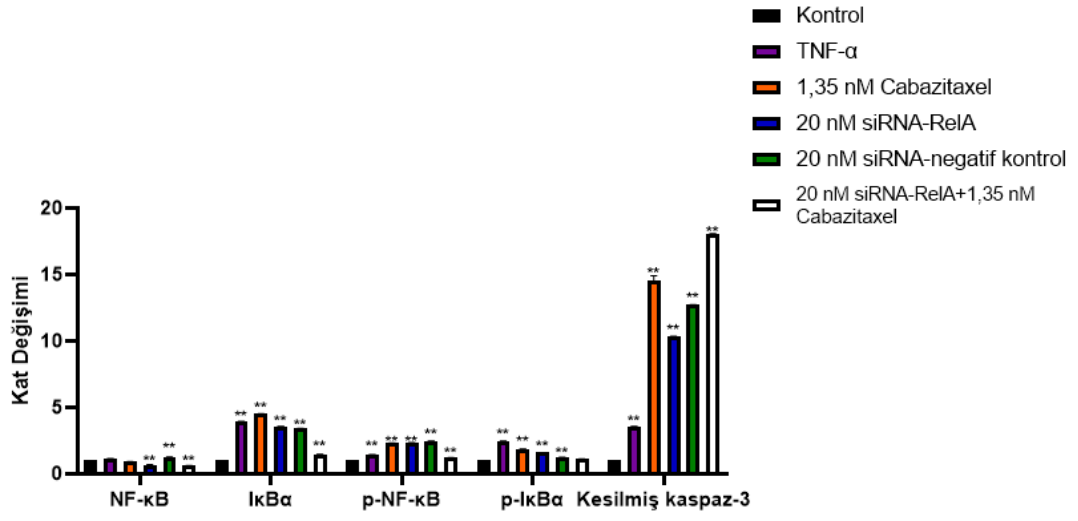
LNCaP-HPR5M hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

TNF- α uyarılmış LNCaP-HPR5M hücrelerinde yapılan Western blot analizleri sonucunda, Vehicle grupta NF- κ B, I κ B α , p-NF- κ B, p-I κ B α ve kesilmiş kaspaz-3 protein seviyeleri kontrole göre sırasıyla 1,14; 3,94; 1,43; 2,48 ve 3,57 kat artış ($p < 0,001$) gösterdi. 1,35 nM Cabazitaxel uygulaması ile NF- κ B 0,91 kat, I κ B α 4,52 kat, p-NF- κ B 2,34 kat, p-I κ B α 1,89 kat ve kesilmiş kaspaz-3 14,76 kat değişim gösterdi. 20 nM siRNA-RelA tedavisinde NF- κ B, I κ B α , p-NF- κ B, p-I κ B α ve kesilmiş kaspaz-3 protein düzeyleri sırasıyla 0,70 kat, 3,59 kat, 2,35 kat, 1,60 kat ve 10,33 kat değişim gösterdi. Negatif kontrol siRNA uygulamasında bu değerler NF- κ B için 1,27 kat, I κ B α 3,43 kat, p-NF- κ B 2,49 kat, p-I κ B α 1,24 kat ve kesilmiş kaspaz-3 12,73 kat olarak ölçüldü. Kombine siRNA-RelA ve Cabazitaxel tedavisinde ise NF- κ B 0,63 kat, I κ B α 1,48 kat, p-NF- κ B 1,22 kat, p-I κ B α 1,11 kat ve kesilmiş kaspaz-3 18,08 kat arttı (Şekil 45).

A)



B)



Şekil 45. TNF- α uyarılmış LNCaP-HPR5M hücrelerinde farklı tedavilerin (TNF- α , Cabazitaxel, siRNA-RelA, siRNA-Negatif Kontrol ve siRNA-RelA + Cabazitaxel) NF- κ B sinyal yolu ve apoptozla ilişkili proteinler üzerindeki etkileri. (A) Western Blot görüntüsü (B) Kantitatif analiz(**p<0,001)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser gelişiminin moleküler temelleri incelendiğinde, genetik ve epigenetik değişimlerin yanı sıra, hücre içi redoks dengesinin bozulmasının da kanserin ilerleyişinde belirleyici bir role sahip olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrelerde endojen düzeyde artışı, DNA’da çeşitli mutasyonlara ve epigenetik düzenlemelere neden olmakta ve genetik instabiliteyi tetiklemekte ve bu da hücrel transformasyonu ve tümör progresyonunu kolaylaştırmaktadır. Agresif tümör hücreleri normal hücrelere kıyasla daha yüksek bazal ROS düzeylerine sahiptir. Bu durum onların proliferatif, invaziv ve metastatik yetenekleri için gereklidir. Kanser hücrelerinde, normal hücrelerde yıkıcı olan bu yüksek oksidatif yükün yıkıcı olmaması redoks toleransı, diğer bir adıyla redoks adaptasyonu olarak isimlendirilen bir adaptasyon mekanizması tarafından sağlanmaktadır. Redoks adaptasyonu, kanser hücrelerinin oksidatif stres durumunda glutasyon ve süperoksit dismutaz gibi güçlü antioksidan sistemlerini aktif tutmalarını ve HIF-1 α , NF- κ B ve Nrf2 gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek hücre sağkalım yollarını yeniden yapılandırmasını içermektedir. Bununla birlikte, bu adaptif mekanizmalar yalnızca oksidatif strese toleransı sağlamamakta, aynı zamanda da tedaviye direnç, inflamasyonun devamlılığı ve metastatik potansiyelin artması gibi kanser gelişiminde rol oynayan birçok kritik sonuca da yol açmaktadır. Bu bağlamda, redoks dengesizliğinin moleküler temellerine yönelik derinlemesine araştırmalar hem kanserin biyokimyasal evrimini açıklamada hem de terapötik stratejilerin yeniden şekillendirmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır (Jorgenson, Zhang, & Oberley, 2013; Mortezaee, 2020).

Redoks adaptasyonunu hedef alan terapötik stratejiler, özellikle ilaç direncinin üstesinden gelme potansiyelleri nedeniyle son yıllarda yoğun ilgi görmektedir. Kanser hücreleri genellikle endojen oksidatif stres altında olmalarına rağmen, bu strese karşı gelişmiş antioksidan sistemleri sayesinde yüksek düzeyde ROS ile başa çıkabilmektedir ve bu da kanser hücrelerine hayatta kalma avantajı kazandırmaktadır. Bu adaptif yanıtın temelinde Nrf-2 ve NF- κ B gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır. *P53* mutasyonu bulunan kanser hücrelerinde Nrf2

aşırı aktive olarak ROS temizleyici sistemlerin aktivasyonuna neden olmakta ve hem kemoterapiye direnç gelişimini hem de tümör progresyonunu desteklemektedir. Benzer şekilde NF- κ B'nin sürekli aktivasyonu anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırmakla birlikte inflamatuvar süreçleri tetikleyerek tmör mikro-çevresinin korunmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, özellikle Nrf2 ve NF- κ B gibi redoks adaptasyon mekanizmalarının hedeflenmesi, kanser tedavisinde umut vaat eden bir strateji sunmaktadır (Trachootham, Alexandre, & Huang, 2009; Glorieux ve ark., 2024).

Erkeklerde dünya çapında en sık görülen PK tedavisinde son yirmi yılda kayda değer ilerlemeler kaydedilmiştir. 2004 yılında Docetaxel'in FDA tarafından onayı ile başlayan tedavi yelpazesi Cabazitaxel, Radyum-223 ve Sipuleucel-T gibi farklı moleküler mekanizmalara sahip ajanların geliştirilmesi ile genişlemiştir. Bu terapötik ajanlar mKDPK hastalarında genel sağkalımı anlamlı biçimde uzatmakta ve yaşam kalitesini önemli ölçüde iyileştirmektedir. Ancak, tümör heterojenitesi ve tedaviye kazanılmış direnç mekanizmaları nedeniyle tedavi büyük ölçüde kısıtlanmaktadır. mKDPK yönetiminde biyobelirteçlerin klinik uygulama ile entegrasyonu, hastaya özgü tedavi algoritmalarının geliştirilmesi ve tedavi başarısının artırılması açısından kritik önem taşımaktadır (Chen ve ark., 2022; Teo, Rathkopf, & Kantoff, 2019).

Son yıllarda küçük girişimci RNA (siRNA) tabanlı tedaviler, gen sessizleştirme yetenekleri sayesinde moleküler hedefli kanser tedavilerinde umut vaat eden bir yöntem olarak öne çıkmıştır. SiRNA'lar, diziye özgü bağlanma prensibiyle daha önce ilaçla hedeflenemeyen gen ürünlerini dahi susturabilme potansiyeli taşımaktadır. Bu potansiyelleri, özellikle kanser hücrelerinde aşırı ekspresyon gösteren veya mutasyona uğrayarak sürekli aktif hale gelen onkogenlerin hedeflenmesini mümkün kılmaktadır. FDA tarafından onaylanan ilk siRNA ilacı olan patisiran'ın ardından, klinik araştırmalarda birçok siRNA tabanlı ilaç genetik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser olmak üzere çok sayıda hastalıkta denenmektedir. Nükleik asit sentez teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, siRNA'lar daha hızlı, düşük maliyetli ve kişiselleştirilmiş tedaviye uygun şekilde üretilebilmektedir. Kanser tedavisinde ise siRNA teknolojisi, tümör hücrelerinde proliferasyonu baskılayan ve apoptozu indükleyen etkilere göstererek kemoterapiye dirençli hücre alt popülasyonlarının da hedeflenmesini sağlamaktadır. Ayrıca siRNA temelli yaklaşımlar, genetik taramayla

belirlenen hastaya özel mutasyonların hedeflenmesi sayesinde hassas tıbbın önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Tüm bu özellikleriyle siRNA terapötikleri, ileri evre veya tedaviye dirençli kanser türlerinde alternatif ve etkili bir tedavi seçeneği sunmaktadır (Mansoori ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2023).

Mevcut tez çalışmasında, oksidatif strese dirençli mPK hücrelerinde oksidatif strese direncin Cabazitaxel duyarlılığına etkileri önemli düzenleyicilerden biri olan NF- κ B sinyal yolunda yer alan p65 alt biriminin siRNA aracılığıyla sessizleştirilmesi yoluyla araştırılmıştır.

Eryılmaz ve ark. 2022 yılında yayınladığı bir çalışmada, oksidatif strese dirençli mPK hücre hattı olan LNCaP'ın Cabazitaxel'e yanıt açısından mKDPK hücreleri ile benzer bir yanıt profili gösterdiği ortaya konmuştur. Prostat kanserinin daha az agresif formu olarak bilinen mPK hücre hattı LNCaP'da oksidatif strese karşı direnç geliştikçe hücrel agresifliğin artabileceği bildirilmiştir (Eryılmaz ve ark., 2022).

Mevcut tez çalışması kapsamında, parental LNCaP hücre hattının hidrojen peroksit (H_2O_2) dirençli formu olan mPK hücre hattı geliştirilmiş ve böylece oksidatif stres adaptasyonuna daha yüksek bir direnç katsayısı ile sahip olan bir hücre fenotipi elde edilmiştir. Bu doğrultuda, parental LNCaP hücre hattında H_2O_2 direnci oluşturmak amacıyla, Eryılmaz ve arkadaşlarının 2022 yılında yayınladığı çalışma temel alınarak benzer bir direnç protokolü oluşturulmuştur (Eryılmaz ve ark., 2022). Ayrıca mevcut çalışmada, parental LNCaP hücrelerinin H_2O_2 'ye verdiği sitotoksik yanıt ile kronik maruziyet sonrasında geliştirdiği direnç fenotipindeki yanıt karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Parental LNCaP hücrelerine 25, 50, 100 ve 250 μ M konsantrasyonlarda uygulanan H_2O_2 , 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda hücre canlılığını doza bağımlı olarak azaltmıştır. 24 saatlik maruziyet sonrası, 25-250 μ M doz aralığında hücre canlılığı %80,53'ten %19,95'e düşerken, 48 saatlik maruziyet bu azalmayı %77,21'den %12,07'ye düşürerek daha belirgin hale getirmiştir. CompuSyn yazılımı ile hesaplanan H_2O_2 IC50 değeri parental hücreler için yaklaşık 78,2 μ M olarak bulunmuştur. Bu bulgular, parental LNCaP hücrelerinin H_2O_2 'ye karşı yüksek derecede duyarlı olduğunu ve oksidatif stres altında hücre canlılığının belirgin biçimde azaldığını göstermektedir. Bu veriler ışığında, parental LNCaP hücreleri 120 gün boyunca 24 saatlik 100 μ M H_2O_2 ile muamele edilerek oksidatif strese dirençli yeni

bir hücre hattı olan LNCaP-HPR5M hücre hattı geliştirilmiştir. LNCaP-HPR5M hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksikite analizleri, aynı H_2O_2 konsantrasyonlarında parental hücrelere kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek canlılık oranları göstermiştir. Özellikle 100 μM H_2O_2 maruziyetinde canlılık oranı %100,96 olarak ölçülmüş, parental hücrelerdeki %46,71 oranıyla kıyaslandığında belirgin bir direnç gelişimi ortaya koymuştur. Bununla birlikte, LNCaP-HPR5M hücre hattının IC_{50} değeri yaklaşık 276,5 olup, parental hücre hattına göre bu değer 3,53 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, kronik H_2O_2 maruziyeti ile LNCaP hücrelerinin oksidatif strese karşı belirgin adaptif direnç geliştirdiğini desteklemektedir.

Eryılmaz ve ark. (2022)'nin yaptıkları çalışma da benzer biçimde, parental LNCaP hücrelerinde 24 saatlik H_2O_2 maruziyeti sonrasında hücre canlılığında doza bağlı olarak 50 μM , 100 μM ve 250 μM için sırasıyla %72,1, %50,6 ve %43,2 olmak üzere azalma olduğu bildirilmiştir. Kronik maruziyetle geliştirilen LNCaP-HPR hücre hattında ise aynı dozlarda sırasıyla %125,5, %105,09 ve %49,6 olmak üzere hücre canlılık oranlarının arttığı ve özellikle 100 μM dozda 2,03-kat direnç gelişimi gözlemlendiği raporlanmıştır. Ayrıca, her 30 günlük süreçte direnç kazanımının kademeli olarak arttığı ve apoptoz seviyelerindeki azalışın direnç gelişiminin fonksiyonel bir göstergesi olduğu belirtilmiştir (Eryılmaz ve ark., 2022).

Benzer adaptasyon mekanizmaları Mahalingaiah ve ark. (2014)'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada da gözlenmiştir. Hücreler 24 saatlik akut ve 3 aylık kronik H_2O_2 maruziyetine tabi tutulmuş ve akut uygulamada 250 μM H_2O_2 büyümeyi %60,86 oranında azaltırken kronik maruziyet sonrası aynı dozda %92,85 oranda canlılık artışı kaydedilmiştir. MTT analizleri, kronik 25 μM H_2O_2 uygulamasında hücre canlılığının %34,65 oranında arttığını göstermiştir. Bu bulgular, uzun süreli H_2O_2 maruziyetinin MCF-7 hücrelerinde redoks dengesini destekleyen adaptif yanıtları aktive ettiğini işaret etmektedir (Mahalingaiah, & Singh, 2014).

Onul ve ark. (2012)'nin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine yaptığı çalışmada ise daha yüksek düzeyde H_2O_2 toleransı geliştirmiştir. Parental hücreler için letal olan 2,4 mM H_2O_2 , kademeli artan dozlarla gerçekleştirilen adaptasyon süreci sonunda hücrelerde kalıcı direnç ile sonuçlanmıştır. Geliştirilen A549-HHP hücre hattı, bu yüksek dozda bile proliferasyonu sürdürmüş ve direnç fenotipi en az 12 ay boyunca

korunmuştur (Onul ve ark., 2012).

Mevcut tez çalışmasında direnç geliştirme protokolü literatürdeki benzer çalışmalara paralel olarak ilerlemekle birlikte 5×10^6 sabit hücre sayısı ve 24 saatlik 100 μM sabit dozda ilerletilmiş ve 120 günlük kronik maruziyet modeli uygulanmıştır. Bu sabit doz protokolü, oksidatif stres altındaki hücrelerin belirli sınırlar içinde kendini yeniden yapılandırarak homeostatik dengeyi sağlayabildiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular literatürle tutarlılık göstermekte olup, LNCaP-HPR5M hücre hattı parental LNCaP hücre hattına kıyasla hem hücre canlılığı hem de IC_{50} değerleri açısından anlamlı farklılıklar sergilemiştir. Sonuç olarak, kronik H_2O_2 maruziyeti, hücrelerin redoks homeostazını yeniden düzenleyerek oksidatif hasara karşı dirençli fenotip geliştirmesine olanak sağlamaktadır.

Eryılmaz ve ark. (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, parental LNCaP hücre hattına uzun süreli H_2O_2 uygulanmasıyla elde edilen dirençli LNCaP-HPR hücre hattının validasyonu, literatürde ilk kez endojen ROS düzeyleri ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri temelinde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada, parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat uygulanan 50 μM ve 100 μM H_2O_2 sonrasında yapılan sitotoksosite ve apoptoz analizleri, dirençli hücre hattında anlamlı bir canlılık inhibisyonunun gerçekleşmediğini ortaya koymuştur. Aynı koşullarda gerçekleştirilen oksidatif stres analizleri ise, LNCaP-HPR5M hücrelerinin endojen ROS birikimine parental hücrelere kıyasla farklı düzeyde yanıt verdiğini göstermiştir. Özellikle 100 μM H_2O_2 uygulamasında, parental LNCaP hücrelerinde ROS-pozitiflik oranı %40 olarak belirlenirken, dirençli hücrelerde bu oran %17,8 olarak saptanmıştır. Morfolojik ROS analizleri de bu verileri desteklemiş; 50 μM ve 100 μM H_2O_2 uygulaması sonrası parental hücrelerde biriken hidrojen peroksit ve süperoksit düzeylerinin, dirençli hücrelere göre belirgin şekilde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Eryılmaz ve ark., 2022). Benzer şekilde, mevcut tez çalışmasında da parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücre hatlarına uygulanan H_2O_2 sonrasında yapılan sitotoksosite analizlerinde dirençli LNCaP-HPR5M hücrelerinde toksik doz olarak kabul edilen 250 μM doz grubu haricinde anlamlı bir canlılık kaybı gözlenmemiştir (Şekil 15). Ayrıca, mevcut tez çalışmasında LNCaP-HPR5M hücrelerinin validasyonu amacıyla gerçekleştirilen oksidatif stres analizleri de literatürle uyumlu bulunmuştur. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR5M hücre hatlarına

24 saat uygulanan 25µM, 50 µM ve 100µM H₂O₂ dozlarının ardından elde edilen verilere göre, özellikle 100 µM dozda parental hücrelerde %22,43 olan ROS pozitif hücre oranı, LNCaP- HPR5M hücrelerinde aynı doz için %11,26 olarak bulunmuştur (Şekil 17-18). Ayrıca yapılan mikroskopik ROS analizlerinde hem H₂O₂ hem de süperoksit olmak üzere hücre içi ROS miktarlarının da parental LNCaP hücrelerinde LNCaP-HPR5M hücrelerine kıysla daha yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur (Şekil 19-22). Elde edilen bu veriler, dirençli LNCaP-HPR5M hücrelerinin belirli dozlarda ROS birikimine karşı daha dengeli ve kontrollü bir yanıt verdiğini ortaya koymaktadır. Hem mevcut tez çalışması hem de literatürde yer alan benzer modeller, uzun süreli H₂O₂ maruziyetinin kanser hücrelerinde redoks metabolizmasını yeniden yapılandırarak, endojen ROS üretimini baskıladığını ve böylelikle oksidatif strese bağlı sitotoksik etkilere karşı direnç gelişimini desteklediğini göstermektedir. Bu bilgilerin ışığında, 120 gün boyunca 24 saatlik 100 µM H₂O₂ maruziyeti ile elde edilen LNCaP-HPR5M hücre hattı, mevcut tez çalışmasının amacı doğrultusunda oksidatif strese dirençli mPK hücre fenotipini temsil etmektedir.

Hücre içi ROS artışı, kanser hücrelerini apoptoz gibi ölüm sinyallerine açık hale getirirken, bu hücreler ayı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek hayatta kalma avantajı kazanmaktadır. Bu adaptif yanıt, redoks homeostazını yeniden düzenlemek üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesini içermektedir. NF-κB bu faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. NF-κB, hücrel stres koşullarında aktive olarak anti-apoptotik, proliferatif ve antioksidan genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu yönüyle hem tümör progresyonunda hem de kemoterapiye direnç gelişiminde önemli bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Literatürde yer alan çalışmalar, NF-κB' nin özellikle redoks adaptasyonu kazanmış kanser hücrelerinde daha stabil ve aktif formda bulunduğunu ve kemoterapötik ajanlara gelişen dirençte rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (White ve ark., 2020; Eryılmaz ve ark., 2024). Eryılmaz ve ark. (2024) yaptıkları çalışmada oksidatif strese dirençli LNCaP-HPR hücre hattında Cabazitaxel tedavisinin redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ve antioksidan sistemdeki etkilerini incelemiştir. Söz konusu çalışmada, parental LNCaP hücrelerinde Cabazitaxel tedavisi, özellikle p-Nrf2, p-NF-κB ve HIF-1α gibi redoks regülasyonunu sağlayan proteinlerin nükleer seviyelerinde anlamlı azalmaya sebep olurken, redoks adaptasyonu kazanmış LNCaP-HPR ve

mKDPK hücre hattı olan C4-2 hücrelerinde bu proteinlerden p-NF- κ B düzeyinde artış olduğu tespit edilmiştir. Cabazitaxel'in tedavisi sonrasında LNCaP-HPR hücrelerinde NF- κ B mRNA düzeyinde 2,15-kat, sitoplazmik p-NF- κ B düzeyinde ise 3,24 -kat artış rapor edilmiştir. Bu bulgular, redoks adaptasyonu ile uyumlu şekilde, NF- κ B' nın agresif fenotipteki hücrelerde pro-survival sinyalizasyonunu destekleyici bir role sahip olduğunu ve bu nedenle terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Nitekim çalışmada, redoks adaptasyonu gelişmiş hücrelerde artan p-NF- κ B düzeylerinin, Cabazitaxel'e gelişen hücresel toleransla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Eryılmaz ve ark., 2024). Bu nedenle, redoks adaptasyonu bağlamında NF- κ B'nın siRNA aracılı sessizleştirilmesi, Cabazitaxel'in apoptotik etkilerini yeniden ortaya çıkarma potansiyeline sahip olabileceği için mevcut tez çalışmasında hedef yolak olarak tercih edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında, siRNA ile gen sessizleştirme uygulamalarında yüksek verimlilik, düşük toksisite ve yüksek transfeksiyon etkinliği kritik öneme sahiptir. Bu doğrultuda, transfeksiyon reaktifi olarak Lipofectamine RNAiMAX® tercih edilmiştir. Han ve ark. (2015) nöron hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, Lipofectamine RNAiMAX® ile miR-21'in etkin şekilde hedef hücrelere iletilmesi sağlanmış ve farklı transfeksiyon oranları ile ortamların optimize edilmesi sonucunda, Lipofectamine RNAiMAX®'in yüksek verimli ve düşük hücre hasarı ile transfeksiyon gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu da Lipofectamine RNAiMAX®'in sinir sistemi hücrelerinde dahi başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir (Han ve ark., 2015). Carralot ve ark. (2009) ise farklı transfeksiyon reaktiflerinin transfekte edilmesi zor kabul edilen hücre hatlarındaki etkinliklerini karşılaştırmış ve Lipofectamine RNAiMAX® 'ın yüksek tekrarlanabilir gen susturma etkinliği ve düşük hücre toksisitesi sunduğunu raporlamıştır. Ayrıca transfeksiyon protokollerinin hazırlanmasında tampon seçiminin, Lipofectamine RNAiMAX® 'in hücre içine etkin şekilde siRNA taşınmasında kritik rolünün olduğunu ortaya koyarak, Lipofectamine RNAiMAX® 'in özellikle hücre içi hedeflere ulaşmada üstünlüğünü vurgulamışlardır (Carralot ve ark., 2009). Zhao ve ark. (2008)'nın insan embriyonik kök hücrelerde yaptıkları çalışmada ise Lipofectamine RNAiMAX®, Oligofectamine ve Lipofectamine 2000 ile karşılaştırılmış, Lipofectamine RNAiMAX®'in düşük siRNA konsantrasyonlarında dahi en yüksek gen sessileştirme etkinliğine sahip olduğu ve

belirgin sitotoksosite oluşturmadiğı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Lipofectamine RNAiMAX®'in pluripotent ve zor transfekte edilen hücre tiplerinde bile güvenilir ve etkili bir transfeksiyon reaktifi olduğunu göstermektedir (Zhao ve ark., 2008). Bu çalışmaların ışığında, Lipofectamine RNAiMAX®'in yüksek verimlilik, düşük sitotoksosite, farklı hücre tiplerinde başarılı transfeksiyon sağlama kapasitesi ve optimum siRNA iletimi özellikleri nedeniyle tercih edilmesi, mevcut tez çalışmasının hedefleri ile uyumludur. Özellikle LNCaP-HPR5M hücre hattı gibi farklılaşmış direnç profili gösteren hücrelerde, gen susturmanın yüksek etkinlikte ve hücre canlılığının korunarak yapılması önemli olduğundan, Lipofectamine RNAiMAX® en uygun transfeksiyon aracı olarak seçilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında, oksidatif strese dirençli LNCaP-HPR5M hücre hattında NK-κB p65 (RelA) alt biriminin Lipofectamine RNAiMAX® reaktifi kullanılarak siRNA aracılığıyla etkin biçimde susturulması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, transfeksiyonun optimizasyonu kapsamında 10 nM ve 20 nM siRNA dozları değerlendirilmiş, RT-qPCR analizleri sonucunda %86,36 transfeksiyon verimliliği ile 20 nM son siRNA dozunun NF-κB mRNA düzeylerinin baskılanmasında daha etkili olduğu belirlenmiştir. 10 nM siRNA dozu ile anlamlı bir gen sessizleştirilmesi sağlanamamıştır (Şekil 23). Bu sonuçlar, hedef gen ekspresyonunun etkin şekilde susturulabilmesi için 20 nM siRNA dozunun tercih edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Literatürde Shi ve ark. (2015)'nın HepG2 hücrelerinde gerçekleştirdiğı çalışmada siRNA transfeksiyonu sonrasında NF-κB p65 mRNA ve protein seviyelerinde yaklaşık %90 oranında anlamlı bir azalma olduğu rapor edilmiştir (Shi ve ark., 2015). Benzer şekilde Lee ve ark. (2008) tarafından romatoid artrit hastalarından izole edilen fibroblast benzeri sinoviyositlerde NF-κB p65 birimini sessizleştirmek için kullanılan REL1096 siRNA, NF- κB p65 mRNA seviyelerini yaklaşık %97 oranında azaltmış ve protein düzeyinde de neredeyse tamamen inhibisyon sağlamıştır. Bu çalışmalar transfeksiyonun etkinliğini göstermesi açısından bulgularımızla paralellik göstermektedir. Transfeksiyonun validasyonu aşamasında ise, 20 nM siRNA-RelA ile transfekte edilen LNCaP-HPR5M hücrelerinde 72 saat sonunda Western Blot analizleri ile NF-κB p65 protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. (Şekil 24). Özellikle siRNA uygulanan grupta NF- κB p65 protein ekspresyonu yaklaşık 0,11- kat seviyesine azalmıştır. Bu sonuçlar,

NF- κ B'nin hem mRNA hem de protein düzeyinde etkili şekilde susturulduğunu göstermekte ve transfeksiyon optimizasyonunun başarılı olduğunu doğrulamaktadır. Sonuç olarak, Lipofectamine RNAiMAX® kullanılarak optimize edilen 20 nM siRNA-RelA transfeksiyonu, LNCaP-HPR5M hücrelerinde NF- κ B p65 ekspresyonunun etkin bir biçimde baskılanmasını sağlamıştır. Mevcut tez çalışması, oksidatif strese dirençli LNCaP-HPR5M hücre hattında NF- κ B p65 hedefli siRNA uygulamasının etkinliği açısından önemli bir temel oluşmakta olup, ileri deneylerde bu baskılamanın hücrelerin kemoterapötik ajanlara karşı duyarlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için zemin hazırlamaktadır.

Mevcut tez çalışmasında, Cabazitaxel'in parental LNCaP, oksidatif strese dirençli LNCaP-HPR5M ve siRNA-ReLA ile NF- κ B p65 alt birimi sessizleştirilen LNCaP-HPR5M hücrelerinde doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Parental LNCaP hücre hattında 72 saatlik Cabazitaxel uygulaması sonucunda IC₅₀ değeri 0,57 nM olarak belirlenmiş ve hücre canlılığında önemli azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 25). Buna karşın, redoks adaptasyonu kazanmış LNCaP-HPR5M hücrelerinde aynı doz ve zaman aralığında IC₅₀ değerinin 1,35 nM'a yükselmesi, hücrelerin oksidatif strese karşı geliştirdiği adaptasyonun Cabazitaxel'e karşı da direnç mekanizması geliştirdiğini düşündürmektedir. NF- κ B p65 alt biriminin siRNA aracılı sessizleştirilmesi sonucunda, LNCaP-HPR5M hücre hattında Cabazitaxel'in IC₅₀ değerini 0,31 nM'a düşmesi, NF- κ B proteininin Cabazitaxel'e karşı gelişen bu dirençte kritik bir role sahip olduğunu güçlü şekilde desteklemektedir. Bu sonuçlar, NF- κ B'nin hücrelerin hayatta kalma sinyallerini düzenleyerek Cabazitaxel'in sitotoksik etkisini azaltan önemli bir moleküler hedef olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde Eryılmaz ve arkadaşlarının 2022 ve 2024 yıllarında yaptıkları iki ayrı çalışmada da benzer şekilde parental LNCaP hücrelerinde Cabazitaxel'in doz ve süre bağımlı güçlü sitotoksik etkisi, LNCaP-HPR ve mKDPK hücre hattı olan C4-2 hücre hatlarında ise parental LNCaP hücrelerine kıyasla direnç gelişimi rapor edilmiştir. Bu veriler, redoks adaptasyonunun kemoterapiye karşı dirençte belirleyici bir faktör olduğunu göstermektedir (Eryılmaz ve ark., 2022; Eryılmaz ve ark., 2024). Bununla birlikte, Shaikh ve ark. (2008) dokosaheksaenoik asit (DHA) ve Docetaxel kombinasyonunun NF- κ B yolunu inhibe ederek apoptozu arttırdığı ve Docetaxel'in IC₅₀ değerini anlamlı biçimde azalttığı belirlenmiştir. Bu

bulgu, NF- κ B'nin inhibisyonunun taksan bazlı kemoterapötiklerin etkinliğini arttırmakta önemli bir rolü olduğunu vurgulamaktadır (Shaikh ve ark., 2008). Kojima ve ark. (2018) ise Docetaxel'in NF- κ B ekspresyonunu tek başına indüklerken, manyetik nanopartiküllerle kombinasyonunun NF- κ B aktivitesini baskılayarak ROS üretimini arttırdığını ve böylelikle apoptoz ile otofajik hücre ölümünü tetikleyip tedavi etkinliğini yükselttiğini göstermiştir. Söz konusu çalışma, ROS ve NF- κ B sinyal yolunun taksan temelli tedavilere direnç mekanizmalarının başlıca bileşenleri olduğunu ortaya koymaktadır (Kojima ve ark., 2008). Ayrıca, Li ve ark., (2020) tarafından yapılan çalışmada, NF- κ B p65'in aşırı ifade edilmesinin Cabazitaxel'in sitotoksik etkini zayıflattığı ve NF- κ B inhibitörü CAPE'nin Cabazitaxel ile kombinasyonunun hücre proliferasyonunu anlamlı derecede azalttığı ve apoptozu arttırdığı bildirilmiştir. Bu da NF- κ B yolunun Cabazitaxel direncinde merkezi bir hedef olabileceğini doğrulamaktadır. Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasından elde edilen bulgular ve literatürdeki veriler, Cabazitaxel'in etkin sitotoksik etkisinin hücrelerin redoks durumu ve NF- κ B aktivasyon seviyesi ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Redoks adaptasyonu kazanmış hücrelerin Cabazitaxel'e karşı direncinin, hücresel savunma sistemlerinin yanı sıra NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu ile sağlanabileceği anlaşılmaktadır. NF- κ B yolunun baskılanması, Cabazitaxel'in sitotoksik potansiyelini arttırmakta ve direnç gelişimini engellemekte kritik bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca ROS üretimini arttıran ve NF- κ B aktivasyonunu engelleyen kombinasyon tedavileri, Cabazitaxel'in etkinliğini arttırmak için yeni ve etkili yaklaşımlar olarak değerlendirilmelidir.

Mevcut tez çalışmasında, Cabazitaxel'in prostat kanseri hücre hatlarında indüklediği apoptoz, 0,5 nM, 1 nM ve 2,5 nM dozlarda değerlendirilmiş, Annexin V ve kaspaz aktivasyonu analizleri ile desteklenmiştir. Elde edilen bulgular, Cabazitaxel'in apoptotik etkisinin doza bağımlı olarak arttığını ve bu etkinin hücrelerin redoks durumu ile NF- κ B aktivitesi tarafından modüle edildiğini göstermektedir. Parental LNCaP hücre hattında 72 saatlik 1 nM Cabazitaxel uygulaması, toplam apoptotik hücre oranını %34,36'ya ve kaspaz aktivitesini %36,13'e yükseltilmiştir. 2,5 nM dozda ise bu oranlar sırasıyla %40,84 ve %50,29'a ulaşarak Cabazitaxel'in kaspaz aktivasyonuna dayalı programlı hücre ölümünü de güçlü şekilde uyardığını ortaya koymuştur. Apoptoz oranlarındaki bu artış, literatürde

Eryılmaz ve ark. (2024) tarafından 48 saatlik Cabazitaxel tedavisi sonrası LNCaP hücrelerinde %31,1 ve %41,3 olarak bildirilmiş olup, mevcut tez çalışmasındaki 72 saatlik verilerle uyum göstermektedir. Redoks adaptasyonu geliştirmiş LNCaP- HPR5M hücrelerinde ise 1 nM Cabazitaxel uygulaması sonucu apoptoz oranı %24,84 ve kaspaz aktivitesi %25,14 olarak tespit edilmiştir. Bu hücrelerde 2,5 nM doz uygulandığında ise apoptotik oran %49,87' ye ve kaspaz aktivitesi %56,7'ye ulaşmıştır. Bu sonuçlar, düşük dozda redoks adaptasyonuna bağlı gelişen dirençli fenotipi yansıtırken yüksek dozda bu direncin aşılabildiğini göstermektedir. Eryılmaz ve ark. (2024) çalışmasında benzer şekilde, LNCaP-HPR hücrelerinde apoptozun parental LNCaP'a göre daha düşük düzeyde olduğu ve bu hücrelerin mKDPK hücre hattı olan C4-2 gibi daha agresif fenotiplere ilaç yanıtı açısından benzer özellik gösterdiği belirtilmiştir.

NF- κ B sinyal yolunun Cabazitaxel etkisi üzerindeki rolü değerlendirilmek amacıyla yapılan siRNA-RelA uygulaması sonrası, LNCaP-HPR5M hücrelerine 1,35 nM (IC₅₀) Cabazitaxel uygulanmış ve total apoptotik hücre oranı %30,38, kaspaz aktivitesi ise %37,55 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, NF- κ B'nin anti-apoptotik etkisinin baskılanmasının, redoks adaptasyonuna sahip hücrelerde bile Cabazitaxel'in etkinliğini arttırdığını göstermektedir. Elde edilen bu bulgu, Li ve ark. (2020)'nin çalışmasında Cabazitaxel ile NF- κ B inhibitörü CAPE' nin kombinasyonunun tek başına Cabazitaxel'e göre apoptozu daha fazla indüklediği bulgusuyla örtüşmektedir. Ayrıca Shaik ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, NF- κ B'nin DHA ile inhibisyonu sonrası Docetaxel'e karşı hücrelerin duyarlılığı artmış, IC₅₀ değeri anlamlı şekilde düşmüş ve apoptozda artış gözlenmiştir. Benzer şekilde, Kojima ve ark. (2018), Docetaxel'in NF- κ B ekspresyonunu arttırdığını ancak ROS üretimini arttıran nanoparçacıklarla birlikte bu yolun baskılanması sayesinde apoptozun ve otofajinin uyarıldığını göstermiştir. Bu bulgular, siRNA-RelA ile NF- κ B'nin baskılandığı hücrelerde gözlenen artmış apoptotik etkiyle paralellik göstermektedir. Sonuç olarak, elde edilen veriler, Cabazitaxel'in IC₅₀'ye yakın dozlarda dahi anlamlı apoptotik etki oluşturduğunu ve bu etkinin hem doz artışıyla hem de NF- κ B'nin inhibisyonu yoluyla güçlendirilebildiğini ortaya koymaktadır. Redoks adaptasyonu kazanmış hücrelerdeki görece düşük yanıtın, NF- κ B aracılı sağkalım sinyallerinin varlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak bu yolun hedeflemesiyle, Cabazitaxel'in apoptoz indükleyici

etkisi yeniden aktive edilebilmektedir. Bu bulgular, prostat kanseri tedavisinde redoks durumu ve NF- κ B aktivitesi göz önünde bulundurularak tasarlanacak kombinasyon tedavilerinin potansiyel etkinliğine işaret etmektedir.

Mevcut tez çalışmasında, redoks adaptasyonu kazanmış LNCaP-HPR5M hücre hattında Cabazitaxel'in tek başına ve NF- κ B p65 alt birimini hedefleyen siRNA-RelA ile kombinasyonunun endojen ROS üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. 72 saatlik tedavi sonrasında, Cabazitaxel ve siRNA-RelA'nın tekli uygulamaları sırasıyla %43,81 ve %47,58 oranında ROS-pozitif hücre artışına neden olurken, bu etkinin kombin tedavide %55,96'ya kadar çıktığı tespit edilmiştir. Akış sitometrik analizlerle elde edilen bu bulgular, floresan mikroskop görüntülemeleriyle de desteklenmiş, intrasellüler hidrojen peroksit ve süperoksit birikiminin, özellikle kombinasyon tedavi grubunda en yüksek seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, Eryılmaz ve ark. (2024) tarafından gerçekleştirilen çalışmayla benzerlik göstermektedir. Bahsi geçen çalışmada, redoks adaptasyonu gösteren LNCaP-HPR hücrelerinde 24 saatlik Cabazitaxel uygulaması sonrası ROS-pozitif hücre oranlarının anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, redoks adaptif LNCaP-HPR hücrelerinin ROS üretim profilinin mKDPK hücre hattı C4-2 hücreleriyle benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Mevcut tez çalışmasında ise, NF- κ B'nın siRNA-RelA ile hedeflenmesi, bu redoks adaptif yapıyı bozarak ROS birikimini önemli ölçüde arttırmıştır. Bu durum NF- κ B'nın anti-oksidan yanıtın düzenlenmesinde kritik bir rol oynayabileceğini destekler niteliktedir. Benzer şekilde, Kojima ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, Docetaxel ile ROS üreten manyetik nanopartiküllerin kombinasyon sonucunda hem ROS seviyelerinde artış hem de NF- κ B ekspresyonunda baskılama gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ROS üretimi ile NF- κ B aktivitesi arasında çift yönlü bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Mevcut tez çalışmasından elde edilen verilerde de NF- κ B'nın inhibisyonu, Cabazitaxel 'in ROS indükleyici etkisini arttırmış ve bu durum özellikle kombin tedavi grubunda ROS pozitif hücre oranlarındaki artışla doğrulanmıştır. Mevcut veriler, prostat kanserinde redoks adaptasyonuna sahip hücre alt tiplerinin hedeflenmesi amacıyla, Cabazitaxel'in NF- κ B yolağını hedefleyen ajanlarla kombinasyon halinde kullanımının terapötik potansiyel taşıdığını göstermektedir.

Mevcut tez çalışmasında, Cabazitaxel'in ve NF- κ B p65 alt birimini hedefleyen

siRNA-RelA'nın hem tekli hem de kombin tedavilerinin LNCaP-HPR5M hücre hattında NF- κ B sinyal yolu ve apoptoz ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri Western Blot analizi ile değerlendirilmiştir. Analizler NF- κ B yolağı ile ilişkili total NF- κ B, p- NF- κ B, I κ B α , p-I κ B α proteinleri ile apoptoz belirteci olan kesilmiş kaspaz-3 protein düzeylerine odaklanmıştır. Tüm protein düzeyleri β -aktin ile normalize edilerek kontrol grubuna göre kat değişimi üzerinden hesaplanmıştır. NF- κ B ve p-NF- κ B düzeyleri, Cabazitaxel uygulamasıyla sırasıyla 1,23- ve 0,30- kata değişmiş, p-I κ B α düzeyi ise 0,51 kata azalmıştır. Bu durum Cabazitaxel'in NF- κ B sinyal yolunu fosforilasyon düzeyinde düşük miktarda baskıladığını göstermektedir. SiRNA-RelA tedavisi ile NF- κ B protein ekspresyonunun 0,07 kata kadar azalması ve p-NF- κ B düzeyinin de yalnızca 0,024 kat olması, hedef protein olan NF- κ B p65'in etkili bir şekilde baskılandığını göstermektedir. Bu deney grubunda kesilmiş kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyinin 1,39 kata artışı bu baskılanmanın apoptotik yanıtla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. En yüksek apoptotik yanıt ise, kesilmiş kaspaz-3 düzeyinin 4,02-kata yükseldiği siRNA-RelA+Cabazitaxel kombin tedavisinin uygulandığı grupta gözlenmiştir. Tüm bu veriler, NF- κ B sinyal yolunun baskılanmasının Cabazitaxel'in apoptotik etkisini anlamlı şekilde arttırdığını göstermektedir.

TNF- α ile uyarılmış LNCaP-HPR5M hücrelerinden elde edilen veriler de bu bulguları destekler niteliktedir. TNF- α grubunda NF- κ B ve p- κ B düzeylerinde artış gözlenmiş ve bu da klasik olarak TNF- α 'nın NF- κ B sinyalini aktive ettiğini göstermiştir. Cabazitaxel uygulaması, TNF- α 'ya rağmen NF- κ B düzeyini 0,91 kata azaltırken, kesilmiş kaspaz-3 seviyesini 14,76-kata kadar çıkarmıştır. NF- κ B p65 alt biriminin sessizleştirildiği siRNA-RelA grubunda ise NF- κ B seviyesi 0,70 kata azalmış ve buna paralel olarak kesilmiş kaspaz-3 protein seviyesi 10,33-kata ulaşmıştır. En dikkat çekici veri ise TNF- α uyarımı ile siRNA-RelA+ Cabazitaxel kombin tedavisinin uygulandığı deney grubunda gözlenmiş ve kesilmiş kaspaz-3 protein seviyesinin bu grupta 18,08-kata yükseldiği görülmüştür. Bu sonuçlar, NF- κ B'nın sağkalım üzerindeki rolü baskılandığında Cabazitaxel'in apoptozu indükleyici etkisinin TNF- α gibi NF- κ B yolunu uyarıcı pro-inflamatuar sitokinlerin varlığında bile güçlendiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, literatürde bildirilen veriler ile örtüşmektedir. Li ve ark. (2020), NF- κ B p65'in aşırı ifadesinin Cabazitaxel'in

sitotoksik etkisini zayıflattığını ve bu sinyal yolunun farmakolojik ya da genetik yollarla inhibisyonunun apoptozu arttırdığını raporlamıştır. Benzer şekilde, Kojima ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada docetaxel ve ROS üreten nanoparçacıkların kombinasyonunun NF- κ B aktivitesini baskılayarak apoptozu ve hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. Mevcut tez çalışmasında da siRNA-RelA ile NF- κ B sessizleştirildiğinde, Cabazitaxel'in apoptozu artırıcı etkisi belirgin şekilde güçlenmiş, bu da NF- κ B'nin redoks ve sağkalım sinyallemedeki rolünü desteklemiştir. Ayrıca Shaikh ve ark. (2008), DHA'nın NF- κ B yolağını inhibe ederek Docetaxel'in apoptotik etkisini sinerjistik şekilde arttırdığını, apoptotik marker düzeylerinde belirgin bir artış oluşturduğunu bildirmiştir. Mevcut tez çalışmasında elde edilen verilerde gözlenen kesilmiş kaspaz-3 artışları, bu tip sinerjistik etkinin Cabazitaxel ve siRNA-RelA kombin tedavisinde de geçerli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak mevcut tez çalışmasında elde edilen veriler, NF- κ B yolağının sessizleştirilmesinin Cabazitaxel tedavisinin etkisini belirgin biçimde arttırdığını, bu etkinin apoptotik yanıtlarla ve literatürde belirtilen mekanizmalarla uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, özellikle NF- κ B'nin yüksek seviyelerde aktif olduğu veya redoks adaptasyonu kazanmış prostat kanseri alt tiplerinde Cabazitaxel'in NF- κ B hedefli stratejilerle kombin olarak kullanımının terapötik potansiyeli olduğunu göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- A. Baudino, T. (2015). Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current drug discovery technologies*, 12(1), 3-20.
- Addabbo, F., Montagnani, M., & Goligorsky, M. S. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53(6), 885-892.
- Ahmad, F., Cherukuri, M. K., & Choyke, P. L. (2021). Metabolic reprogramming in prostate cancer. *British journal of cancer*, 125(9), 1185-1196.
- Aigner, A. (2006). Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of biotechnology*, 124(1), 12-25.
- Ak, P., & Levine, A. J. (2010). p53 and NF- κ B: different strategies for responding stress lead to a functional antagonism. *The FASEB Journal*, 24(10), 3643-3652.
- Alexandrov, L. B., Ju, Y. S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., Campbell, P. J., Vineis, P., Phillips, D. H., & Stratton, M. R. (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6312), 618–622. <https://doi.org/10.1126/science.aag0299>
- Al-Ostoot, F. H., Salah, S., Khamees, H. A., & Khanum, S. A. (2021). Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. *Cancer treatment and research communications*, 28, 100422.
- Amin, M., Khalid, A., Tazeen, N., & Yasoob, M. (2010). Zonal anatomy of prostate. *Annals of King Edward Medical University*, 16(3), 138-138.
- Arora, K., & Barbieri, C. E. (2018). Molecular subtypes of prostate cancer. *Current Oncology Reports*, 20, 1-9.
- Ataei, M., & Abdollahi, M. (2022). A systematic review of mechanistic studies on the relationship between pesticide exposure and cancer induction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 456, 116280.
- Attard, G., Parker, C., Eeles, R. A., Schröder, F., Tomlins, S. A., Tannock, I., Drake, C. G., & de Bono, J. S. (2016). Prostate cancer. *Lancet (London, England)*, 387(10013), 70–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4)
- Balaji, S., Ahmed, M., Lorence, E., Yan, F., Nomie, K., & Wang, M. (2018). NF- κ B signaling and its relevance to the treatment of mantle cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology*, 11, 1-11.
- Bartos, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. *Biochemical pharmacology*, 77(8), 1303-1315.
- Belkahla, S., Nahvi, I., Biswas, S., Nahvi, I., & Ben Amor, N. (2022). Advances and development of prostate cancer, treatment, and strategies: A systemic review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 991330.
- Bergengren, O., Pekala, K. R., Matsoukas, K., Fainberg, J., Mungovan, S. F., Bratt, O., Bray, F., Brawley, O., Luckenbaugh, A. N., Mucci, L., Morgan, T. M., & Carlsson,

S. V. (2023). 2022 Update on Prostate Cancer

Bergengren, O., Pekala, K. R., Matsoukas, K., Fainberg, J., Mungovan, S. F., Bratt, O., ... & Carlsson, S. V. (2023). 2022 update on prostate cancer epidemiology and risk factors—a systematic review. *European urology*, 84(2), 191-206.

Bhat, G. R., Sethi, I., Sadida, H. Q., Rah, B., Mir, R., Algehainy, N., ... & Bhat, A. A. (2024). Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 43(1), 197-228.

Bhattacharjee, R., Das, S. S., Biswal, S. S., Nath, A., Das, D., Basu, A., ... & Kesari, K. K. (2022). Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical reviews in oncology/hematology*, 174, 103675.

Bhattarai, K. R., Riaz, T. A., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2021). The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling. *Experimental & molecular medicine*, 53(2), 151-167.

Bobbin, M. L., & Rossi, J. J. (2016). RNA interference (RNAi)-based therapeutics: delivering on the promise?. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56(1), 103-122.

Boccellino, M., Alaia, C., Misso, G., Cossu, A. M., Facchini, G., Piscitelli, R., ... & Caraglia, M. (2015). Gene interference strategies as a new tool for the treatment of prostate cancer. *Endocrine*, 49, 588-605.

Bockwoldt, B., Sugiyama, H., Tsai, K., Bhatti, P., Brenner, A. V., Hu, A., ... & Phipps, A. I. (2021). Gastrointestinal Cancer Survival and Radiation Exposure among Atomic Bomb Survivors: The Life Span Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 30(2), 412-418.

Bortolotti, M., Polito, L., Battelli, M. G., & Bolognesi, A. (2021). Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox biology*, 41, 101882.

Botezatu, A., Iancu, I. V., Popa, O., Plesa, A., Manda, D., Huica, I., ... & Badiu, C. (2016). Mechanisms of oncogene activation. In *New aspects in molecular and cellular mechanisms of human carcinogenesis*. IntechOpen.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.

Brook, M. N., Raghallaigh, H. N., Govindasami, K., Dadaev, T., Rageevakumar, R., Keating, D., ... & UKGPCS Collaborators. (2023). Family history of prostate cancer and survival outcomes in the UK genetic prostate cancer study. *European Urology*, 83(3), 257-266.

Brown, G. C., & Borutaite, V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion*, 12(1), 1-4.

Byrne, S., Boyle, T., Ahmed, M., Lee, S. H., Benyamin, B., & Hyppönen, E. (2023). Lifestyle, genetic risk and incidence of cancer: a prospective cohort study of 13 cancer types. *International Journal of Epidemiology*, 52(3), 817-826.

- Caliri, A. W., Tommasi, S., & Besaratinia, A. (2021). Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 787, 108365. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108365>
- Calvert, C. M., Toomey, T., & Jones-Webb, R. (2021). Are people aware of the link between alcohol and different types of Cancer?. *BMC public health*, 21(1), 734. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10780-2>
- Campbell, K. J., & Leung, H. Y. (2021). Evasion of cell death: A contributory factor in prostate cancer development and treatment resistance. *Cancer Letters*, 520, 213-221.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2015). The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, 163(4), 1011–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025>
- Canesin, G. (2021). The prostate cancer stem cell niche: Genetic drivers and therapeutic approaches. In *Advances in Stem Cells and their Niches* (Vol. 5, pp. 137-175). Elsevier.
- Caplen, N. J., & Mousses, S. (2003). Short Interfering RNA (siRNA)—Mediated RNA Interference (RNAi) in Human Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1002(1), 56-62.
- Carralot, J. P., Kim, T. K., Lenseigne, B., Boese, A. S., Sommer, P., Genovesio, A., & Brodin, P. (2009). Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: a case study for optimization procedure. *Journal of biomolecular screening*, 14(2), 151-160.
- Chang, M. S., Hartman, R. I., Trepanowski, N., Giovannucci, E. L., Nan, H., & Li, X. (2022). Cumulative Erythral Ultraviolet Radiation and Risk of Cancer in 3 Large US Prospective Cohorts. *American journal of epidemiology*, 191(10), 1742–1752. <https://doi.org/10.1093/aje/kwac101>
- Chen, B., Zhang, J., & Ma, Q. (2021). The relationship between the simultaneity present of cagA and hopQI genes in *Helicobacter pylori* and the risk of gastric cancer. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 67(2), 121–126. <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.2.18>
- Chen, M., Linstra, R., & van Vugt, M. A. (2022). Genomic instability, inflammatory signaling and response to cancer immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1877(1), 188661.
- Chen, Y., Huang, Y., Li, Q., Luo, Z., Zhang, Z., Huang, H., ... & Li, S. (2023). Targeting Xkr8 via nanoparticle-mediated in situ co-delivery of siRNA and chemotherapy drugs for cancer immunochemotherapy. *Nature nanotechnology*, 18(2), 193-204.
- Chen, Y., Zhou, Q., Hankey, W., Fang, X., & Yuan, F. (2022). Second generation androgen receptor antagonists and challenges in prostate cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 13(7), 632.
- Claude, E., & Decottignies, A. (2020). Telomere maintenance mechanisms in cancer: telomerase, ALT or lack thereof. *Current Opinion in Genetics & Development*, 60, 1-8.
- Cohen, J. (2024). Cancer Biology. *The Washington Manual Hematology and*

Oncology Subspecialty Consult, 9.

Cox, A. D., & Der, C. J. (2010). Ras history: The saga continues. *Small GTPases*, 1(1), 2-27.

de Almeida, A. J. P. O., de Oliveira, J. C. P. L., da Silva Pontes, L. V., de Souza Júnior, J. F., Gonçalves, T. A. F., Dantas, S. H., ... & de Medeiros, I. A. (2022). ROS: Basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022(1), 1225578.

Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., ... & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 20503121211034366.

DeBlasi, J. M., & DeNicola, G. M. (2020). Dissecting the crosstalk between NRF2 signaling and metabolic processes in cancer. *Cancers*, 12(10), 3023.

Desai, K., McManus, J. M., & Sharifi, N. (2021). Hormonal therapy for prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 42(3), 354–373.

Diepstraten, S. T., Anderson, M. A., Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2022). The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. *Nature Reviews Cancer*, 22(1), 45-64.

Domen, A., Deben, C., Verswyvel, J., Flieswasser, T., Prenen, H., Peeters, M., ... & Wouters, A. (2022). Cellular senescence in cancer: clinical detection and prognostic implications. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 360.

Done, A. J., & Traustadóttir, T. (2016). Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox biology*, 10, 191-199.

Duan, Y., Tian, X., Liu, Q., Jin, J., Shi, J., & Hou, Y. (2021). Role of autophagy on cancer immune escape. *Cell Communication and Signaling*, 19, 1-12.

Dumitrescu, R. G. (2018). Alcohol-induced epigenetic changes in cancer. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine: Methods and Protocols*, 157-172.

Duxbury, M. S., & Whang, E. E. (2004). RNA interference: a practical approach. *Journal of Surgical Research*, 117(2), 339-344.

Dzhalilova, D. S., & Makarova, O. V. (2021). HIF-dependent mechanisms of relationship between hypoxia tolerance and tumor development. *Biochemistry (Moscow)*, 86, 1163-1180.

Efanov, A. A., Brenner, A. V., Bogdanova, T. I., Kelly, L. M., Liu, P., Little, M. P., Wald, A. I., Hatch, M., Zurnadzy, L. Y., Nikiforova, M. N., Drozdovitch, V., Leeman-Neill, R., Mabuchi, K., Tronko, M. D., Chanock, S. J., & Nikiforov, Y. E. (2018). Investigation of the Relationship Between Radiation Dose and Gene Mutations and Fusions in Post-Chernobyl Thyroid Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 110(4), 371–378. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx209>

El-Tanani, M., Nsairat, H., Matalka, I. I., Lee, Y. F., Rizzo, M., Aljabali, A. A., Mishra, V., Mishra, Y., Hromić-Jahjefendić, A., & Tambuwala, M. M. (2024). The impact of the BCR-ABL oncogene in the pathology and treatment of chronic myeloid leukemia. *Pathology, research and practice*, 254, 155161. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155161>

Endo, S., Kawai, M., Hoshi, M., Segawa, J., Fujita, M., Matsukawa, T., ... Ikari, A. (2021). Targeting Nrf2-antioxidant signalling reverses acquired cabazitaxel resistance in prostate cancer cells. *Journal of Biochemistry*, 170(1), 89–96.

- Epstein, J. I., Zelefsky, M. J., Sjoberg, D. D., Nelson, J. B., Egevad, L., Magi-Galluzzi, C., Vickers, A. J., Parwani, A. V., Reuter, V. E., Fine, S. W., Eastham, J. A., Wiklund, P., Han, M., Reddy, C. A., Ciezki, J. P., Nyberg, T., & Klein, E. A. (2016). A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European urology*, 69(3), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.046>
- Eryilmaz, I. E., Egeli, U., & Cecener, G. (2022). An in vitro redox adaptation model for metastatic prostate cancer: Establishing, characterizing and Cabazitaxel response evaluating. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 49(10), 1094–1104.
- Eryilmaz, I. E., Egeli, U., & Cecener, G. (2024). Association between the apoptotic effect of Cabazitaxel and its pro-oxidant efficacy on the redox adaptation mechanisms in prostate cancer cells with different resistance phenotypes. *Cancer biology & therapy*, 25(1), 2329368. <https://doi.org/10.1080/15384047.2024.2329368>
- Esteller, M., & Herman, J. G. (2004). Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene*, 23(1), 1–8.
- Eyvazi, S., Vostakolaei, M. A., Dilmaghani, A., Borumandi, O., Hejazi, M. S., Kahroba, H., & Tarhriz, V. (2020). The oncogenic roles of bacterial infections in development of cancer. *Microbial pathogenesis*, 141, 104019.
- Faget, D. V., Ren, Q., & Stewart, S. A. (2019). Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 19(8), 439–453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>
- Feng, E., Rydzewski, N. R., Zhang, M., Lundberg, A., Bootsma, M., Helzer, K. T., ... & Zhao, S. G. (2022). Intrinsic molecular subtypes of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 28(24), 5396–5404.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., ... & Bray, F. (2020). Global cancer observatory: cancer today. *Lyon: International agency for research on cancer*, 20182020.
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- Fernández-Martínez, N. F., Ching-Lopez, A., de Labry Lima, A. O., Salamanca-Fernandez, E., Perez-Gomez, B., Jiménez-Moleón, J. J., ... & Rodriguez-Barranco, M. (2020). Relationship between exposure to mixtures of persistent, bioaccumulative, and toxic chemicals and cancer risk: A systematic review. *Environmental research*, 188, 109787.
- Floud, S., Hermon, C., Simpson, R. F., & Reeves, G. K. (2023). Alcohol consumption and cancer incidence in women: interaction with smoking, body mass index and menopausal hormone therapy. *BMC cancer*, 23(1), 758. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11184-8>
- Forman, H. J., Torres, M., & Fukuto, J. (2002). Redox signaling. *Molecular and cellular biochemistry*, 234, 49–62.
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016–1036.
- Friedman-Jimenez, G., Kato, I., Factor-Litvak, P., & Shore, R. (2022). Low-dose

ionizing radiation and cancer mortality among enlisted men stationed on nuclear-powered submarines in the United States Navy. *International Journal of Radiation Biology*, 98(10), 1542-1550.

Friedrich, M., & Aigner, A. (2022). Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 36(5), 549–571. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00549-3>

Fu, Y., Maccioni, L., Wang, X. W., Greten, T. F., & Gao, B. (2024). Alcohol-associated liver cancer. *Hepatology*, 80(6), 1462-1479.

Gaillard, H., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(5), 276-289.

Gala, K., & Khattar, E. (2021). Long non-coding RNAs at work on telomeres: Functions and implications in cancer therapy. *Cancer letters*, 502, 120-132.

Galsky, M. D., Dritselis, A., Kirkpatrick, P., & Oh, W. K. (2010). Cabazitaxel. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(9), 677-678.

Gandaglia, G., Leni, R., Bray, F., Fleshner, N., Freedland, S. J., Kibel, A., ... & La Vecchia, C. (2021). Epidemiology and prevention of prostate cancer. *European urology oncology*, 4(6), 877-892.

Gauntner, T. D., & Prins, G. S. (2018). Prostate—cell biology and secretion. *Encyclopedia of Reproduction*, 325-333.

Gharbieh, S., Mullin, J., Jaffer, A., Chia, D., & Challacombe, B. (2025). Epidemiology, diagnosis and treatment of anterior prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 1-8.

Ghorani, E., Swanton, C., & Quezada, S. A. (2023). Cancer cell-intrinsic mechanisms driving acquired immune tolerance. *Immunity*, 56(10), 2270-2295.

Gillessen, S., Bossi, A., Davis, I. D., de Bono, J., Fizazi, K., James, N. D., ... & Omlin, A. (2023). Management of patients with advanced prostate cancer—metastatic and/or castration-resistant prostate cancer: report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2022. *European journal of cancer*, 185, 178-215.

Glorieux, C., Liu, S., Trachootham, D., & Huang, P. (2024). Targeting ROS in cancer: rationale and strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(8), 583-606.

Greathouse, K. L., Wyatt, M., Johnson, A. J., Toy, E. P., Khan, J. M., Dunn, K., ... & Reddy, S. (2022). Diet-microbiome interactions in cancer treatment: Opportunities and challenges for precision nutrition in cancer. *Neoplasia (New York, NY)*, 29, 100800.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

Guerby, P., Tasta, O., Swiader, A., Pont, F., Bujold, E., Parant, O., ... & Negre-Salvayre, A. (2021). Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. *Redox biology*, 40, 101861.

Guerra, A., Flor-de-Lima, B., Freire, G., Lopes, A., & Cassis, J. (2023). Radiologic-pathologic correlation of prostatic cancer extracapsular extension (ECE). *Insights into Imaging*, 14(1), 88.

Han, Z., Ge, X., Tan, J., Chen, F., Gao, H., Lei, P., & Zhang, J. (2015). Establishment of lipofection protocol for efficient miR-21 transfection into cortical neurons in vitro. *DNA and Cell Biology*, 34(12), 703-709.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1),

31-46.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Hatano, K., & Nonomura, N. (2021). Genomic profiling of prostate cancer: an updated review. *The world journal of men's health*, 40(3), 368.

Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, 38(2), 167-197.

He, J., Zhu, X., Xu, K., Li, Y., & Zhou, J. (2024). Network toxicological and molecular docking to investigate the mechanisms of toxicity of agricultural chemical Thiabendazole. *Chemosphere*, 363, 142711.

Hou, J., Karin, M., & Sun, B. (2021). Targeting cancer-promoting inflammation—have anti-inflammatory therapies come of age?. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(5), 261-279.

Huang, B., Hu, G., Zong, X., Yang, S., He, D., Gao, X., & Liu, D. (2023). α -Cyperone protects dopaminergic neurons and inhibits neuroinflammation in LPS-induced Parkinson's disease rat model via activating Nrf2/HO-1 and suppressing NF- κ B signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 115, 109698.

Huang, R., & Zhou, P. K. (2021). DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 254. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00648-7>

Hussain, M. R., Hoessli, D. C., & Fang, M. (2016). N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget*, 7(33), 54067–54081. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10042>

Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341-354.

Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341-354.

Jehanno, C., Vulin, M., Richina, V., Richina, F., & Bentires-Alj, M. (2022). Phenotypic plasticity during metastatic colonization. *Trends in Cell Biology*, 32(10), 854-867.

Jhunjhunwala, S., Hammer, C., & Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nature Reviews Cancer*, 21(5), 298-312.

Jia, P., & Zhao, Z. (2019). Characterization of tumor-suppressor gene inactivation events in 33 cancer types. *Cell reports*, 26(2), 496-506.

Jin, P., Duan, X., Li, L., Zhou, P., Zou, C. G., & Xie, K. (2024). Cellular senescence in cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *MedComm*, 5(5), e542.

Jorgenson, T. C., Zhong, W., & Oberley, T. D. (2013). Redox imbalance and biochemical changes in cancer. *Cancer research*, 73(20), 6118-6123.

Karavasilis, A., Karkalousos, P., Trapali, M., Fountzoula, C., & Karikas, G. A. (2023). Destabilization of HIF-1 α by Diabetes, Oxidative Stress, Obesity and Other Related Disorders. *Journal of Diabetes Mellitus*, 13(2), 142-162.

Keivanlou, M. H., Amini-Salehi, E., Joukar, F., Letafatkar, N., Habibi, A., Norouzi,

- N., ... & Hassanipour, S. (2023). Family history of cancer as a potential risk factor for colorectal cancer in EMRO countries: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 13(1), 17457.
- Key, T. J., Bradbury, K. E., Perez-Cornago, A., Sinha, R., Tsilidis, K. K., & Tsugane, S. (2020). Diet, nutrition, and cancer risk: what do we know and what is the way forward?. *Bmj*, 368.
- Khusnurrokhman, G., & Wati, F. F. (2022). Tumor-promoting inflammation in lung cancer: A literature review. *Annals of Medicine and Surgery*, 79.
- Klaunig, J. E. (2018). Oxidative stress and cancer. *Current pharmaceutical design*, 24(40), 4771-4778.
- Ko, H., Chang, Y., Kim, H. N., Kang, J. H., Shin, H., Sung, E., & Ryu, S. (2021). Low-level alcohol consumption and cancer mortality. *Scientific reports*, 11(1), 4585. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84181-1>
- Kojima, K., Takahashi, S., Saito, S., Nittami, T., Usugi, E., Ishii, K., ... & Watanabe, M. (2018). Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel via ROS generation and NF-KB signaling. *Cancer Research*, 78(13_Supplement), 4827-4827.
- Komura, K., Sweeney, C. J., Inamoto, T., Ibuki, N., Azuma, H., & Kantoff, P. W. (2018). Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *International Journal of Urology*, 25(3), 220-231.
- Kong, D. P., Chen, R., Zhang, C. L., Zhang, W., Xiao, G. A., Wang, F. B., Ta, N., Gao, X., & Sun, Y. H. (2020). Prevalence and clinical application of TMPRSS2-ERG fusion in Asian prostate cancer patients: a large-sample study in Chinese people and a systematic review. *Asian journal of andrology*, 22(2), 200–207. https://doi.org/10.4103/aja.aja_45_19
- Kroon, J., Kooijman, S., Cho, N. J., Storm, G., & van der Pluijm, G. (2016). Improving taxane-based chemotherapy in castration-resistant prostate cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(6), 451–462.
- Krumova, K., & Cosa, G. (2016). Overview of reactive oxygen species.
- Kulac, I., Roudier, M. P., & Haffner, M. C. (2021). Molecular pathology of prostate cancer. *Surgical Pathology Clinics*, 14(3), 387-401.
- Labrecque, M. P., Coleman, I. M., Brown, L. G., True, L. D., Kollath, L., Lakely, B., ... Morrissey, C. (2019). Molecular profiling stratifies diverse phenotypes of treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4492–4505.
- Lambeth, J. D., Kawahara, T., & Diebold, B. (2007). Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(3), 319-331.
- Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., & Kirschenbaum, A. (2011). Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 40(3), 565-575.
- Lee, S., & Schmitt, C. A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature cell biology*, 21(1), 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>
- Lee, U. J., Choung, S. R., Prakash, K. B., Lee, E. J., Lee, M. Y., Kim, Y. J., ... & Choi, Y. C. (2008). Dual knockdown of p65 and p50 subunits of NF-kappaB by siRNA

inhibits the induction of inflammatory cytokines and significantly enhance apoptosis in human primary synoviocytes treated with tumor necrosis factor- α . *Molecular Biology Reports*, 35, 291-298.

Lennicke, C., & Cochemé, H. M. (2021). Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Molecular cell*, 81(18), 3691-3707.

Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Strykowska-Góra, A., & Rudzki, S. (2022). Risk factors for the diagnosis of colorectal cancer. *Cancer control*, 29, 10732748211056692.

Li, D., Hong, X., Zhao, F., Ci, X., & Zhang, S. (2021). Targeting Nrf2 may reverse the drug resistance in ovarian cancer. *Cancer Cell International*, 21, 1-10.

Li, F., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., ... & Sethi, G. (2015). NF- κ B in cancer therapy. *Archives of toxicology*, 89, 711-731.

Li, H., Zimmerman, S. E., & Weyemi, U. (2021). Genomic instability and metabolism in cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 364, 241-265.

Li, Y., & Hecht, S. S. (2022). Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 165, 113179. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113179>

Li, Z., Sun, C., & Qin, Z. (2021). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts and its effect on cancer cell reprogramming. *Theranostics*, 11(17), 8322–8336. <https://doi.org/10.7150/thno.62378>

Li, Z., Xuan, Z., Chen, J., Song, W., Zhang, S., Jin, C., ... & Song, P. (2020). Inhibiting the NF- κ B pathway enhances the antitumor effect of cabazitaxel by downregulating Bcl-2 in pancreatic cancer. *International journal of oncology*, 57(1), 161-170.

Lin, K., Song, L. J., Ma, J., Zhang, T. S., You, D. Y., & He, Y. W. (2020). Identification of cancer hallmark-associated gene and lncRNA cooperative regulation pairs and dictate lncRNA roles in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(9), 5213-5223.

Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. *Jama*, 317(24), 2532-2542.

Liu, L., Hao, X., Song, Z., Zhi, X., Zhang, S., & Zhang, J. (2021). Correlation between family history and characteristics of breast cancer. *Scientific reports*, 11(1), 6360.

Liu, Z. L., Chen, H. H., Zheng, L. L., Sun, L. P., & Shi, L. (2023). Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>

Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 73, 3221-3247.

Lockwood, W. W., Chari, R., Coe, B. P., Girard, L., Macaulay, C., Lam, S., ... & Lam, W. L. (2008). DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers. *Oncogene*, 27(33), 4615-4624.

Loose, D., & Van de Wiele, C. (2009). The immune system and cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 24(3), 369-376.

Lopez, A., Reyna, D. E., Gitego, N., Kopp, F., Zhou, H., Miranda-Roman, M. A., ...

& Gavathiotis, E. (2022). Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. *Nature communications*, 13(1), 1199.

Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(9), 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>

Ma, M., Shi, F., Zhai, R., Wang, H., Li, K., Xu, C... Zhou, F. (2021). TGF- β promote epithelial-mesenchymal transition via NF- κ B/NOX4/ROS signal pathway in lung cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2365–2375.

MacGrogan, D., & Bookstein, R. (1997, February). Tumour suppressor genes in prostate cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 8, No. 1, pp. 11-19). Academic Press.

Maciejowski, J., & de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(3), 175-186.

Mahalingaiah, P. K. S., & Singh, K. P. (2014). Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PloS one*, 9(1), e87371.

Majidpoor, J., & Mortezaee, K. (2021). Steps in metastasis: an updated review. *Medical Oncology*, 38(1), 3.

Mansoori, B., Shotorbani, S. S., & Baradaran, B. (2014). RNA interference and its role in cancer therapy. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(4), 313.

Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A. L., Colla, R., Ciucis, C. D., Marinari, U. M., ... & Domenicotti, C. (2016). Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(1), 6235641.

Marotta, V., Malandrino, P., Russo, M., Panariello, I., Ionna, F., Chiofalo, M. G., & Pezzullo, L. (2020). Fathoming the link between anthropogenic chemical contamination and thyroid cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 150, 102950.

Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., & Kurokawa, M. (2016). Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *International review of cell and molecular biology*, 327, 43–87. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006>

Mauro, C., Leow, S. C., Anso, E., Rocha, S., Thotakura, A. K., Tornatore, L., ... & Franzoso, G. (2011). NF- κ B controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. *Nature cell biology*, 13(10), 1272-1279.

McNeal J. E. (1988). Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*, 12(8), 619–633. <https://doi.org/10.1097/00000478-198808000-00003>

Merseburger, A. S., Waldron, N., Ribal, M. J., Heidenreich, A., Perner, S., Fizazi, K., ... & Chowdhury, S. (2021). Genomic testing in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a pragmatic guide for clinicians. *European Urology*, 79(4), 519-529.

Michielsen, D. P., Braeckman, J. G., & Denis, L. (2011). Cabazitaxel for the treatment of prostate cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 12(6), 977–982. <https://doi.org/10.1517/14656566.2011.567268>

Mishra, A., Sobha, D., Patel, D., & Suresh, P. S. (2024). Intermittent fasting in health

and disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 130(6), 755-767.

Mitchell, T., & Neal, D. E. (2015). The genomic evolution of human prostate cancer. *British journal of cancer*, 113(2), 193-198.

Modica, R., Benevento, E., & Colao, A. (2023). Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) and cancer: new perspectives on an old relationship. *Journal of Endocrinological Investigation*, 46(4), 667-677.

Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 50–64.

Mortezaee, K. (2021). Redox tolerance and metabolic reprogramming in solid tumors. *Cell Biology International*, 45(2), 273-286.

Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *Journal of cellular biochemistry*, 116(5), 696-703.

Mukama, T., Kharazmi, E., Sundquist, K., Sundquist, J., & Fallah, M. (2021). Risk-adapted starting age of breast cancer screening in women with a family history of ovarian or other cancers: A nationwide cohort study. *Cancer*, 127(12), 2091-2098.

Nahand, J. S., Rabiei, N., Fathazam, R., Taghizadieh, M., Ebrahimi, M. S., Mahjoubin-Tehran, M., ... & Mirzaei, H. (2021). Oncogenic viruses and chemoresistance: What do we know?. *Pharmacological Research*, 170, 105730.

Nencioni, A., Caffa, I., Cortellino, S., & Longo, V. D. (2018). Fasting and cancer: molecular mechanisms and clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 18(11), 707-719.

Nong, S., Han, X., Xiang, Y., Qian, Y., Wei, Y., Zhang, T., ... & Ma, X. (2023). Metabolic reprogramming in cancer: Mechanisms and therapeutics. *MedComm*, 4(2), e218.

Onul, A., Elseth, K. M., De Vitto, H., Paradise, W. A., Vesper, B. J., Tarjan, G., ... & Radosevich, J. A. (2012). Long-term adaptation of the human lung tumor cell line A549 to increasing concentrations of hydrogen peroxide. *Tumor Biology*, 33, 739-748.

Ou, J. Y., Kirchhoff, A. C., & Hanson, H. A. (2020). Air Pollution across the Cancer Continuum: Extending Our Understanding of the Relationship between Environmental Exposures and Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 29(10), 1876–1879. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1588>

Paller, C. J., & Antonarakis, E. S. (2011). Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug design, development and therapy*, 5, 117–124. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S13029>

Papadimitriou, N., Markozannes, G., Kannellopoulou, A., Critselis, E., Alhardan, S., Karafousia, V., ... & Tsilidis, K. K. (2021). An umbrella review of the evidence associating diet and cancer risk at 11 anatomical sites. *Nature communications*, 12(1), 4579.

Paul, P., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2019). The significance of gene mutations across eight major cancer types. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 88-99.

Peltomäki, P. (2012). Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Experimental*

cell research, 318(4), 299-310.

- Pickering, A. M., Linder, R. A., Zhang, H., Forman, H. J., & Davies, K. J. (2012). Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10021-10031.
- Piva, R., Belardo, G., & Santoro, M. G. (2006). NF- κ B: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxidants & redox signaling*, 8(3-4), 478-486.
- Pobel, C., Auclin, E., Procureur, A., Clément-Zhao, A., Simonaggio, A., Delanoy, N., ... Oudard, S. (2021). Cabazitaxel schedules in metastatic castration-resistant prostate cancer: A review. *Future Oncology*, 17(1), 91–102.
- Prestwich, R. J., Errington, F., Hatfield, P., Merrick, A. E., Ilett, E. J., Selby, P. J., & Melcher, A. A. (2008). The immune system—is it relevant to cancer development, progression and treatment?. *Clinical oncology*, 20(2), 101-112.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine*, 16(3), 107-121.
- Price, J. D., Vizeacoumar, F. S., Abuhussein, O., Maranda, V., Zhang, Y., Adachi, H., ... & Vizeacoumar, F. J. (2025). Epigenetic Control of TERRA by FTSJ3 is Critical for Telomerase-Driven Cancers. *bioRxiv*, 2025-01.
- Purdy, J. G., & Luftig, M. A. (2019). Reprogramming of cellular metabolic pathways by human oncogenic viruses. *Current opinion in virology*, 39, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.11.002>
- Qazi, A. S., Rahman, U. U., Ahmad, B., Safdar, W., Ahmad, S., & Mumtaz, S. (2024). Diet, Gut Microbes, and Cancer. *Nutrition and Dietary Interventions in Cancer*, 163-190.
- Quigley, D. A., Dang, H. X., Zhao, S. G., Lloyd, P., Aggarwal, R., Alumkal, J. J., ... & Feng, F. Y. (2018). Genomic hallmarks and structural variation in metastatic prostate cancer. *Cell*, 174(3), 758-769.
- Rabbani, Z. N., Mi, J., Zhang, Y., Delong, M., Jackson, I. L., Fleckenstein, K., ... & Vujaskovic, Z. (2010). Hypoxia inducible factor 1 α signaling in fractionated radiation-induced lung injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia. *Radiation research*, 173(2), 165-174.
- Ragone, C., Cavalluzzo, B., Mauriello, A., Tagliamonte, M., & Buonaguro, L. (2024). Lack of shared neoantigens in prevalent mutations in cancer. *Journal of translational medicine*, 22(1), 344. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05110-0>
- Ramalingam, S., Ramamurthy, V. P., & Njar, V. C. (2017). Dissecting major signaling pathways in prostate cancer development and progression: Mechanisms and novel therapeutic targets. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 166, 16-27.
- Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A., & Pelkonen, O. (1995). Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review. *Gene*, 159(1), 113-121.
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E...Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), Article 9.
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current opinion in cell biology*, 33, 8-13.

Reis, A. H., Vargas, F. R., & Lemos, B. (2016). Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics. *Tumor Biology*, 37(10), 13029-13038.

Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., ... & Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215-1228.

Roskoski R., Jr (2022). Targeting BCR-Abl in the treatment of Philadelphia-chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Pharmacological research*, 178, 106156. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106156>

Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Oxford University Press.

Ruhland, M. K., Loza, A. J., Capietto, A. H., Luo, X., Knolhoff, B. L., Flanagan, K. C., Belt, B. A., Alspach, E., Leahy, K., Luo, J., Schaffer, A., Edwards, J. R., Longmore, G., Faccio, R., DeNardo, D. G., & Stewart, S. A. (2016). Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nature communications*, 7, 11762. <https://doi.org/10.1038/ncomms11762>

Sabol, R. A., Ledet, E. M., Jaeger, E., Hatton, W., Moses, M., Lankford, A., ... & Sartor, O. (2021). Family history and pathogenic/likely pathogenic germline variants in prostate cancer patients. *The Prostate*, 81(7), 427-432.

Sasco, A. J., Secretan, M. B., & Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung cancer*, 45, S3-S9.

Schafer, E. J., Laversanne, M., Sung, H., Soerjomataram, I., Briganti, A., Dahut, W., ... & Jemal, A. (2025). Recent patterns and trends in global prostate cancer incidence and mortality: an update. *European Urology*, 87(3), 302-313.

Schwartz, S. M. (2024). Epidemiology of cancer. *Clinical chemistry*, 70(1), 140-149.

Sehn J. K. (2018). Prostate Cancer Pathology: Recent Updates and Controversies. *Missouri medicine*, 115(2), 151–155.

Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual review of physiology*, 76(1), 39-56.

Sezavar, A. H., Rastegar-Pouyani, N., Rahimi Kakavandi, N., Fakhari, F., Jafarzadeh, E., Aliebrahimi, S., & Ostad, S. N. (2024). Examining the relationship between per- and polyfluoroalkyl substances and breast, colorectal, prostate, and ovarian cancers: a meta-analysis. *Critical Reviews in Toxicology*, 54(10), 981-995.

Shaikh, I. A., Brown, I., Schofield, A. C., Wahle, K. W., & Heys, S. D. (2008). Docosahexaenoic acid enhances the efficacy of docetaxel in prostate cancer cells by modulation of apoptosis: The role of genes associated with the NF- κ B pathway. *The Prostate*, 68(15), 1635-1646.

Sharp, P. A., & Zamore, P. D. (2000). RNA interference. *Science*, 287(5462), 2431-2433.

Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2), 235-246.

Shi, Y., Wang, S. Y., Yao, M., Sai, W. L., Wu, W., Yang, J. L., Cai, Y., Zheng, W. J., & Yao, D. F. (2015). Chemosensitization of HepG2 cells by suppression of NF- κ B/p65 gene transcription with specific-siRNA. *World journal of gastroenterology*, 21(45), 12814–12821. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i45.12814>

Shi, Z. D., Pang, K., Wu, Z. X., Dong, Y., Hao, L., Qin, J. X., ... & Han, C. H. (2023). Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 113.

- Slika, H., Mansour, H., Wehbe, N., Nasser, S. A., Iratni, R., Nasrallah, G., ... Eid, A. H. (2022). Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112442.
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 6175804.
- Staudt, L. M. (2010). Cold Spring Harbor Perspect. *Biol*, 2, a000109.
- Stopsack, K. H., Su, X. A., Vasselkiv, J. B., Graff, R. E., Ebot, E. M., Pettersson, A., Lis, R. T., Fiorentino, M., Loda, M., Penney, K. L., Lotan, T. L., & Mucci, L. A. (2023). Transcriptomes of Prostate Cancer with TMPRSS2:ERG and Other ETS Fusions. *Molecular cancer research : MCR*, 21(1), 14–23. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-22-0446>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Swami, U., McFarland, T. R., Nussenzeig, R., & Agarwal, N. (2020). Advanced prostate cancer: treatment advances and future directions. *Trends in cancer*, 6(8), 702-715.
- Taheri, M., Ghafouri-Fard, S., Najafi, S., Kallenbach, J., Keramatfar, E., Atri Roozbahani, G., ... & Baniahmad, A. (2022). Hormonal regulation of telomerase activity and hTERT expression in steroid-regulated tissues and cancer. *Cancer cell international*, 22(1), 258.
- Takeshita, F., & Ochiya, T. (2006). Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer science*, 97(8), 689-696.
- Teo, M. Y., Rathkopf, D. E., & Kantoff, P. (2019). Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual review of medicine*, 70, 479–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051517-011947>
- Thakur, N., Sorrentino, A., Heldin, C. H., & Landström, M. (2009). TGF- β uses the E3-ligase TRAF6 to turn on the kinase TAK1 to kill prostate cancer cells. *Future Oncology*, 5(1), 1-3.
- Tong, D. (2021). Unravelling the molecular mechanisms of prostate cancer evolution from genotype to phenotype. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 163, 103370.
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature reviews Drug discovery*, 8(7), 579-591.
- Tran, N., Garcia, T., Aniq, M., Ali, S., Ally, A., & Nauli, S. M. (2022). Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *American journal of biomedical science & research*, 15(2), 153–177.
- Tuli, H. S., Kaur, J., Vashishth, K., Sak, K., Sharma, U., Choudhary, R., ... Sethi, G. (2023). Molecular mechanisms behind ROS regulation in cancer: A balancing act between augmented tumorigenesis and cell apoptosis. *Archives of Toxicology*, 97(1), 103–120.
- Upadhyay, A., Pal, D., & Kumar, A. (2023). Substantial relation between the bacterial

biofilm and oncogenesis progression in host. *Microbial Pathogenesis*, 175, 105966.

Ursini, F., Maiorino, M., & Forman, H. J. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox biology*, 8, 205-215.

Vaccarella, S., Li, M., Bray, F., Kvale, R., Serraino, D., Lorenzoni, V., ... & Dal Maso, L. (2024). Prostate cancer incidence and mortality in Europe and implications for screening activities: population based study. *bmj*, 386.

Van der Eecken, K., Vanwelkenhuyzen, J., Deek, M. P., Tran, P. T., Warner, E., Wyatt, A. W., ... & Ost, P. (2021). Tissue-and blood-derived genomic biomarkers for metastatic hormone-sensitive prostate cancer: a systematic review. *European urology oncology*, 4(6), 914-923.

Viliers, A., Steg, A., & Boccon-Gibod, L. (1991). Anatomy of the prostate: review of the different models. *European urology*, 20(4), 261-268.

Vo, T. T., & Letai, A. (2010). BH3-only proteins and their effects on cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 687, 49–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6706-0_3

von Amsberg, G., & Merseburger, A. S. (2020). Therapie des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms [Treatment of metastatic, castration-resistant prostate cancer]. *Der Urologe. Ausg. A*, 59(6), 673–679.

Wang, B., Kohli, J., & Demaria, M. (2020). Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?. *Trends in cancer*, 6(10), 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>

Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2019). Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647-2693.

Wannenes, F., Ciafré, S. A., Niola, F., Frajese, G., & Farace, M. G. (2005). Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-A significantly limits vascularization and growth of prostate cancer in vivo. *Cancer Gene Therapy*, 12(12), 926-934.

Weeden, C. E., Hill, W., Lim, E. L., Grönroos, E., & Swanton, C. (2023). Impact of risk factors on early cancer evolution. *Cell*, 186(8), 1541-1563.

White, E. Z., Pennant, N. M., Carter, J. R., Hawsawi, O., Odero-Marah, V., & Hinton, C. V. (2020). Serum deprivation initiates adaptation and survival to oxidative stress in prostate cancer cells. *Scientific reports*, 10(1), 12505.

White, M. C., Wu, X., & Damania, B. (2022). Oncogenic viruses, cancer biology, and innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 78, 102253.

Wilt, T. J., Ullman, K. E., Linskens, E. J., MacDonald, R., Brasure, M., Ester, E., ... Dahm, P. (2021). Therapies for clinically localized prostate cancer: A comparative effectiveness review. *The Journal of Urology*, 205(4), 967–976.

Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*, 4(5), 278-286.

Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Han, Y., Wu, N., ... & Liao, Q. (2021). The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Molecular cancer*, 20, 1-21.

Xu, H., Zhang, Y., Li, L., Ren, Y., Qian, F., Wang, L., ... Yu, R. (2023). The nanoprodrug of polytemozolomide combines with MGMT siRNA to enhance the effect of temozolomide in glioma. *Drug Delivery*, 30(1), 1–13.

- Yamada, Y., & Beltran, H. (2021). The treatment landscape of metastatic prostate cancer. *Cancer Letters*, 519, 20–29.
- Yap, T. A., Pezaro, C. J., & De Bono, J. S. (2012). Cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 12(9), 1129-1136.
- Yenmis, G., Sarac, E. Y., Besli, N., Soydas, T., Tastan, C., Kancagi, D. D., ... & Sultuybek, G. K. (2021). Anti-cancer effect of metformin on the metastasis and invasion of primary breast cancer cells through mediating NF-kB activity. *Acta histochemica*, 123(4), 151709.
- Zhang, J., Chen, B., Gan, C., Sun, H., Zhang, J., & Feng, L. (2023). A comprehensive review of small interfering RNAs (siRNAs): mechanism, therapeutic targets, and delivery strategies for cancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 7605-7635.
- Zhang, J., Duan, D., Song, Z. L., Liu, T., Hou, Y., & Fang, J. (2021). Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 342–394.
- Zhao, M., Yang, H., Jiang, X., Zhou, W., Zhu, B., Zeng, Y., ... & Ren, C. (2008). Lipofectamine RNAiMAX: an efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. *Molecular biotechnology*, 40, 19-26.
- Zhao, H., Serre, C., & Steunou, N. (2025). Metal-Organic Frameworks for the Therapy of Inflammatory Diseases. *Advanced healthcare materials*, e2404334. Advance online publication.
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., & Paz-Ares, L. (2016). Current challenges in cancer treatment. *Clinical therapeutics*, 38(7), 1551-1566.
- Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., & Dontsova, O. A. (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)*, 75, 1563-1583.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ABL	: Abelson Proto-Onkogen
ADT	: Androjen deprivasyon tedavisi
Ago-2	: Dicer ve Argonaute-2
AKT	: Protein Kinaz B
ALT	: alternatif telomer uzatma
APC	: Adenomatöz Polipozis Kolon (geni)
AR	: Androjen Reseptörü
ARE	: Antioksidan Yanıt Elemanı
ARI	: Androjen Reseptör İnhibitörü
ASAP	: Atipik Küçük Asiner Proliferasyon
ATM	: Ataksi Telanjiektazi Mutant Proteini
B- NF-κB	: Nuclear Factor kappa
BCL-2	: B hücreli lenfoma 2
BCR	: Kırılma Noktası Kümesi Bölgesi
BRCA1	: Erken Başlangıçlı Meme Kanseri 1
BRCA2	: Erken Başlangıçlı Meme Kanseri 2
CAF	: Kansere İlişkili Fibroblastlar
CAT	: Katalaz
CD95	: ölüm sinyalleri FAS reseptörü
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDK4	: Siklin Bağımlı Kinaz 4
CDKN2	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü-2
cDNA	: Ters transkripsiyon ile sentezlenen DNA
CIN	: Kromozomal İnstabilite
CM-H₂DCFDA	: Klorometil-diklorodihidrofluorescein diasetat
c-Myc	: Hücresel Myelositomatozis Onkogen
CO₂	: Karbondioksit
COL5A1	: Kollajen Tip V Alfa 1 Zinciri
CR-ABL	: Kromozom translokasyonu sonucu oluşan ve Philadelphia kromozomu onkogeni
Cul3/Rbx1 kompleksi	: Cul3 ve Rbx1 proteinlerinden oluşan ubiquitin ligaz kompleksi
CYP	: Sitokrom P450
DES	: dietilstilbestrol
DHE	: Dihidroetidum
DISC	: adaptör moleküller ölüm indükleyen sinyalizasyon kompleksi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E2F	: E2F Transkripsiyon Faktörü

EBK	: Endokrin Bozucu Kimyasallar
EBV	: herpesvirüs türü
ECM	: tümör hücrelerinin ekstraselüler matriksin
EGF-R	: epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitel-Mesenkimal Geçiş
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ENZ	: Enzalutamide
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERG	: ETS İlişkili Gen
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
ETV1	: ETS Varyant Transkripsiyon Faktörü 1
ETV6	: ETS Variant Transkripsiyon Faktörü 6
FADD	: adaptör moleküller reseptörler
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FMN	: Flavın Mononükleotid
FOXO	: FOXO transkripsiyon faktörleri
FOXO-1	: Forkhead kutusu O1
FTSJ3	: FtsJ RNA Metiltransferaz Homolog 3
GalNAcT1	: N-Asetilgalaktozamin Transferaz 1
GALNT	: Polipeptit N-Asetilgalaktozaminil Transferaz
GPX	: glutatyon peroksidazlar
GR	: Glutatyon Redüktaz
GST	: glutatyon S-transferanslar
GWAS	: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
H2O2	: Hidrojen Peroksit
HBV, HCV	: hepatit B ve C virüsleri
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HIF	: Hipoksiye Bağlı Faktör
Hif-1α	: Hipoksiye Duyarlı Faktör 1 alfa
HMOX1	: Hem oksijenaz-1
HNPCC	: kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser
HPH	: HIF prolil hidroksilaz
HPV	: insan papilloma virüsü
HR	: homolog rekombinasyon
HRE	: Hipoksi Yanıt Elemanı
hTERT	: İnsan Telomeraz Ters Transkriptazı
HTLV-1	: T hücreli lenfotropik virüs tip 1
I-131	: radyoaktif iyot-131
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC50	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
IGF-1R	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü
IKK	: I κ B kinaz kompleksi
IKK-α	: I κ B kinaz alfa alt birimi
IR	: İyonize radyasyon
IRE1	: İnositol Gerektiren Enzim 1

ISUP	: Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği
İκB	: Kappa B İnhibitörü
İκBα	: NF-κB inhibitörü alfa
Keap1	: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
KLL	: kronik lenfositik lösemi
K-RAS	: Kirsten Rat Sarkoma Virüsü Onkogen Homoloğu
KSHV/HHV-8	: Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü
LNCaP	: Prostat Lenf Nodu Karsinomu
LNCaP-HPR5M	: Lenf nodu kaynaklı prostat karsinomu – Hormon ve ilaç dirençli varyant
MAPK	: Mitojen-aktif Protein Kinaz
MCV	: Merkel hücreli polioma virüsü
MED12	: Mediator Kompleksi Alt Birimi 12
MET	: Mezenkimal-Epitel Geçiş
MGMT	: O ⁶ -Metilguanin-DNA Metiltransferaz
MHC I	: Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi sınıf I
MHC II	: Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi sınıf II
mKDPK	: kastrasyona duyarlı metastatik prostat kanseri
MLH1	: MutL homolog 1
mPK	: Metastatik Prostat Kanseri
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSH2	: MutS homolog 2
MYC	: Myelositomatozis Viral Onkogen Homologu
NADPH	: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAT	: N-asetiltransferanslar
NF- κB	: Aktive edilmiş B hücrelerinin kappa hafif zincirini artıran nükleer faktör
NFE2L2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile ilişkili Faktör 2
NF-κB p65 (RelA)	: Nükleer Faktör kappa B'nin p65 alt birimi
NF-κB1	: Nükleer Faktör Kappa B 1
NF-κB2	: Nükleer Faktör Kappa B 2
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
NLS	: Nükleus Lokalizasyon Sinyali
nM	: nanomolar
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NOX	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat oksidaz
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile ilişkili Faktör 2
NTRK3	: Nörotrofik Tropomiyozin Reseptör Kinaz 3
O2	: Oksijen molekülü
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OH	: hidroksil
OS	: genel sağkalım süreleri
OSCC	: Oral Yassı Hücreli Karsinom
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PD-L1	: Programlanmış Hücre Ölümü Ligandı 1
PFAS	: per-polifloroakril maddeler

PHD	: Prolil hidroksilaz enzimleri
PHD2	: Prolin hidroksilaz 2
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
PIN	: Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
PK	: Prostat kanseri
PRb	: Retinoblastoma Proteini
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PTC	: papiller tiroid kanseri
PTEN	: FOSFATAZ ve TENSİN homologu
RAS	: RAS Onkogenleri
RB	: Retinoblastoma
RET	: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen gen
RISC	: RNA Aracılı Susturma Kompleksi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi-siRNA	: RNA interferans
ROI	: Reaktif Oksijen Ara Ürünleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SASP	: Senesans İlişkili Salgı Fenotipi
siRNA	: Küçük girişimci RNA
siRNA-RelA	: RelA genini hedef alan küçük müdahaleci RNA
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STAT3	: Sinyal Transdüktör ve Transkripsiyon Aktivasyonu 3
TAM	: tümör ilişkili makrofajlar
TERC	: telomeraz RNA bileşeni
TERRA	: telomerik tekrarlar içeren RNA'lar
TERT	: telomeraz ters transkriptaz
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TME	: Tümör Mikroçevresi
TMPRSS2	: Transmembran Proteaz, Serin 2
TNF	: tümör nekroz faktörü
TNFα	: Tümör Nekroz Faktörü alfa
TNPO	: Transportin
TP53	: Tümör Protein 53
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand reseptörü
TSG	: Tümör baskılayıcı genler
Txnrd1	: Tiyoredoksin Redüktaz 1
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
UV	: Ultraviyole
UV-B	: Ultraviyole B
UVR	: Ultraviyole radyasyon
VEGF	: vasküler endotelyal büyüme faktörü
VHL	: von Hippel-Lindau proteini
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	: Suda çözünebilir tetrazolyum tuzu-1
XO	: Ksantin Oksidaz

8. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan, karşılaştığım her sorunda sabırla yol gösteren, bilimsel merakımı besleyen ve bana bilimi daha çok sevdiren, her koşulda destek olarak beni cesaretlendiren, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimini benimle cömertçe paylaşan, akademik yolculuğuma ışık tutarak bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Işıl Ezgi ERYILMAZ'a;

Yüksek lisans eğitimim süresince kendisinden çok şey öğrendiğim, bizlere bilimin önemini her zaman anlatan, her zaman bizleri destekleyen ve morallendiren ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bize her türlü imkanı tanıyarak araştırmalarımızı güvenle ve huzurla yapmamızı sağlayan BUÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Sn. Prof. Dr. Ünal EGELİ'ye;

Bildiklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen gerek deneysel gerek akademik süreçlerimde sorularımı sabırla cevaplayan ve bana destek olan ve kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Ceyda ÇOLAKOĞLU BERGEL'e;

Laboratuvar çalışmalarım süresince bildiklerini bana aktararak destek olan, moral ve motivasyon vererek bana destek olan Sn. Ayten HACIEFENDİ ve yine verdiği moral ve motivasyonla bana destek olan Sn. Hatice AKKUŞ'a;

Ayrıca, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle akademik gelişimime katkıda bulunan, bilimsel bakış açımı şekillendirmemde destek olan, değerli görüşleri ve yönlendirmeleriyle beni her zaman motive eden Bursa Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın kıymetli hocalarına;

Hayatım boyunca karşılıksız ve koşulsuz olarak sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim, ne yöne ilerlersem hep yanımda olan ve bu günlere gelmemi sağlayan kıymetli aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten dolayı, THIZ-2024-1876 ve TYL-2023-1617 numaralı projeler kapsamında Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne içten teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

■■■■ yılında ■■■■ doğmuştur. Lisans eğitimini 2020 yılında Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tamamlamıştır. 2022 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamış olup, tez çalışmasını “Oksidatif Stres Dirençli Metastatik Prostat Kanseri Hücrelerinde siRNA ile NF-κB İnhibisyonunun Cabazitaksel Duyarlılığına Etkisi” başlığıyla sürdürmektedir.

Yüksek lisans eğitimi süresince prostat kanseri, oksidatif stres, siRNA teknolojisi ve ilaç direnç mekanizmaları üzerine çeşitli TÜSEB ve BAP destekli projelerde aktif araştırmacı olarak görev almıştır. Ayrıca yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi farklı hastalık modelleri üzerine yürütülen epigenetik temelli projelerde de yer almıştır.

2024 yılında Avrupa Üroloji Derneği'nin düzenlediği EMUC24 (European Multidisciplinary Congress on Urological Cancers) kongresinde bilimsel poster sunumu gerçekleştirmiştir.

Akademik olarak özellikle redoks biyolojisi, hedefe yönelik tedavi yaklaşımları ve moleküler kanser biyolojisi konularına ilgi duymaktadır. Lisansüstü çalışmalarını takiben doktora eğitimi ve akademik kariyer hedefleyen Bilge Arıöz, araştırmalarına temel bilimler odaklı bir yaklaşımla devam etmeyi planlamaktadır.