

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

**İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTI
PC-3'TE OXALIPLATIN ve STAT3 İNHİBİTÖRÜ
PICEATANNOL KOMBİNASYONUNUN TGF- β
SİNYAL YOLAĞI ARACILI SİTOTOKSİK
ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşe Kardelen KURTDERE

Referans no: 10370835

EDİRNE - 2022

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

**İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTI
PC-3'TE OXALIPLATIN ve STAT3 İNHİBİTÖRÜ
PICEATANNOL KOMBİNASYONUNUN TGF- β
SİNYAL YOLAĞI ARACILI SİTOTOKSİK
ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayşe Kardelen KURTDERE

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2021/31

Tez No:

EDİRNE - 2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince her türlü konuda bana yardımcı olan ve tecrübeleriyle yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a, her sorduğum soruya sabırla cevap veren, beni araştırmaya ve üretmeye teşvik eden hocam Sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, bu süreçte ailemden daha çok gördüğüm, birlikte çalıştığım bölüm arkadaşım Tourkian CHASAN'a, tez çalışmamı proje olarak destekleyen TÜBAP'a ve burs aldığım TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve bana inanan, verdiğim kararlarda beni destekleyen, sevgilerini hep hissettiğim aileme; babam Yücel KURTDERE'ye, annem Arzu KURTDERE'ye, benim için hep küçük kalacak olan kardeşlerim Arda ve Yağmur KURTDERE'ye sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
PROSTAT BEZİ.....	3
PROSTAT KANSERİ.....	4
METASTAZ.....	13
TGF- β SİNYALİ.....	15
JAK/STAT SİNYAL YOLAĞI	17
STAT3 VE SMAD3 ÇAPRAZ ETKİLEŞİMİ	18
APOPTOZ.....	19
OXALIPLATIN.....	23
PICEATANNOL.....	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
BULGULAR.....	40
TARTIŞMA.....	61
SONUÇLAR.....	69
ÖZET	71
SUMMARY	73
KAYNAKLAR.....	75
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ.....	85
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGE VE KISALTMALAR

ADT	: Androgen Deprivation Therapy/ Androjen Yoksunluğu Tedavisi
AIDS	:Acquired Immune Deficiency Syndrome/ Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
AIF	: Apoptosis Inducing Factor/ Apoptoz İndükleyici Faktör
AKT	: Protein Kinaz B
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
AR	: Androjen Reseptörü
ATCC	: American Type Culture Collection
BAD	: BCL2 Associated Death Promoter/ BCL2 ilişkili ölüm promotörü
BAK	: BCL-2 Antagonist/Killer
BAX	: BCL-2 Associated X Protein/ BCL2 İlişkili X Proteini
BCL2	: B-Cell Lymphoma 2/ B Hücreli Lenfoma 2
BCL-xL	: B-Cell Lymphoma-Extra Large/ B Hücre Lenfoma ekstra büyük
BH3	: B Hücre Lenfoma 2 Homoloji Bölgesi 3
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
BPSA	: BPH ile ilişkili PSA
cDNA	: Complementary DNA/ Komplementer DNA
CREB	: Cyclic amp-Response Element Binding Protein
DACH	: Diaminosikloheksan
DD	: Death Domain/ Ölüm Alanı
DED	: Death Effector Domain/ Ölüm Efektör Alanı
DISC	:Death Inducing Signaling Complex/ Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi

DMEM/F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Trifosfat
DR3	: Death Receptor 3/ Ölüm Reseptörü 3
DR4/TRAIL-R1	: Death Receptor 4/ TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 4
DR5/TRAIL-R2	: Death Receptor 5/ TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 5
DR6	: Death Receptor 6
DRE	: Digital Rectal Examination
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetikasit
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
FADD	: Fas Associated Death Domain
Fas	: Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
fPSA	: Serbest PSA
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GLOBOCAN	: Global Cancer Observatory/ Küresel Kanser Gözlemevi
GR	: Glukokortikoid Reseptörü
IAP	: Inhibitor of Apoptosis
IC₅₀	: Half Maximal Inhibitory Concentration
IL6	: İnterlökin 6
IL6R	: İnterlökin 6 Reseptör
JAK	: Janus Kinaz
MOMP	: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
MTT	: 3-(4,5-dimetitiazol-2-yl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromid
NF-κB	: Nüklear Faktör Kappa B
Omi/HtrA2	: Omi/High Temperature Requirement Protein A2
p-JAK2	: fosforile-JAK2
p-STAT3	: fosforile-STAT3
P53	: Tümör Süpresör Protein 53

PBS	: Phosphate Buffered Saline
PC-3	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
PCR	: Polymerase Chain Reaction/ Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
qRT-PCR	: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
SELECT	: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial
Smac/Diablo	: Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/ Direct IAP-Binding Protein with Low PI
SMAD2	: SMAD Ailesi Üyesi 2
SMAD3	: SMAD Ailesi Üyesi 3
SMAD4	: SMAD Ailesi Üyesi 4
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
SH2	: Src Homoloji 2
SH3	: Src Homoloji 3
TGF-β	: Transforming Growth Factor β
TGFβR1	: Transforming Growth Factor β Receptor Type 1
TGFβR2	: Transforming Growth Factor β Receptor Type 2
TNFR1	: Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNFR2	: Tumor Necrosis Factor Receptor 2
TNFRSF	: Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family
TRUS	: Transrektal Ultrasonografi
Tyk2	: Tyrosine Kinase 2
XIAP	: X-Linked Inhibitor Of Apoptosis

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücre çoğalması ve hücre ölümü dengesinin bozulmasına yol açan gen ekspresyonlarındaki çoklu değişikliklerin sebep olduğu anormal bir hücre büyümesidir (1). Kanser insidansı ve kansere bağlı ölümler dünya çapında hızla artmaktadır. Prostat kanseri, akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen malignitedir (2). Erken evre prostat kanserinde aktif sürveyans, lokal radyoterapi veya prostatektomi gibi tedavi yöntemleriyle sağkalım süresi uzatılabilmektedir (3,4). İleri evre veya metastatik prostat kanserinde ise sıklıkla tedaviye direnç gelişmekte, kanser nüks etmektedir. Bu durumda çoğunlukla kemoterapiye başvurulmaktadır ancak kemoterapinin orta düzey etkinliği sebebiyle yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (4).

Oxaliplatin üçüncü nesil bir platin antitümör analogudur (5), DNA'da eklentiler oluşmasını sağlayarak replikasyonu inhibe etmekte, hücre döngüsünü durdurmakta ve apoptoza yol açmaktadır (6). Platin bazlı diğer kemoterapi ajanlarına göre daha yüksek etkinlik ve daha düşük toksisite göstermektedir (7). Oxaliplatin'in çeşitli kanser türlerindeki etkinliği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiş olmakla birlikte (5), son yıllarda da kastrasyona dirençli prostat kanserindeki etkileri araştırılmaktadır (4).

Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) sinyal yolağı, hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi ve embriyogenez dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır. Kanserde ise gelişim aşamasına ve tümör tipine bağlı olarak onkojen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir (8). Prostat kanserinde TGF- β sinyal yolağının bozulmasının metastazla ilişkili olduğu bildirilmiştir (9). *In vivo* çalışmalar, TGF- β 'nin prostatın tümör baskılayıcısı olarak işlev gördüğünü desteklemektedir (10).

Piceatannol, resveratrolün hidroksile analogu olan fenolik bir bileşiktir (11-13) ve antioksidan, antitümör ve antiinflamatuvar özellikleri nedeni ile dikkat çekmektedir (11). Piceatannol'ün hücre proliferasyonu, anjiyogenez gibi birçok onkolojik süreci kontrol eden Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (STAT) 3'ü inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12,14,15).

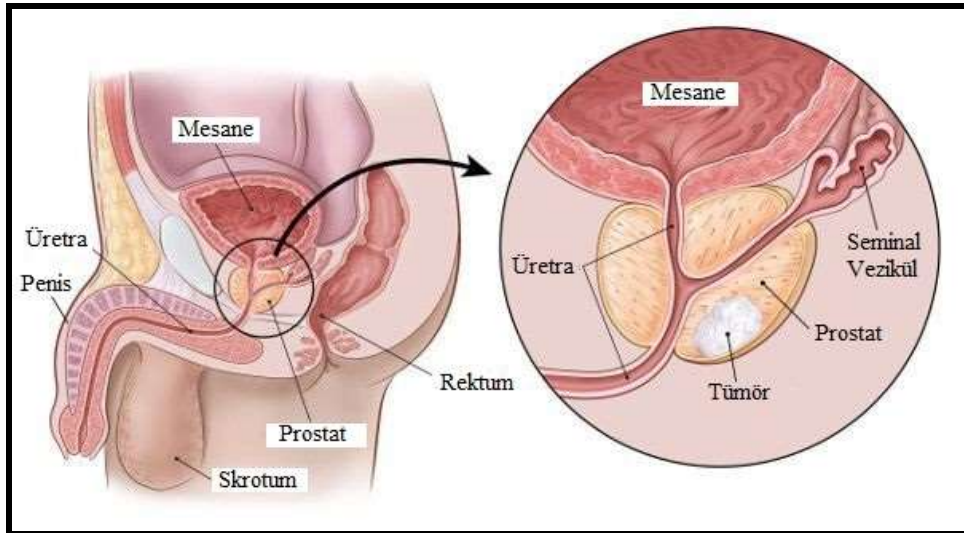
Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışmada, Oxaliplatin'in Piceatannol ile kombine uygulamasının insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında TGF- β sinyal yolağı aracılı sitotoksik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

PROSTAT BEZİ

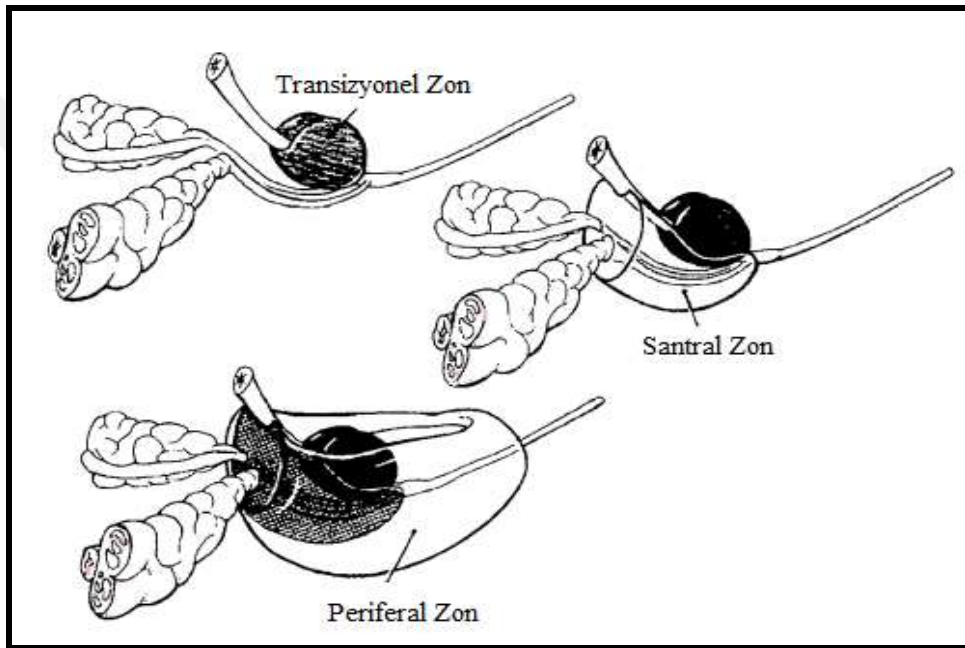
İnsan prostatı, en büyük erkek aksesuar bezidir (16). Prostatın birincil işlevi, ejakülatın bir kısmını oluşturan, spermin hareketliliğine ve beslenmesine yardımcı olan bir alkali sıvı salgılamaktır (17). Prostat bezi, pelvik diyafram ile periton boşluğu arasındaki subperitoneal bölgede bulunmakta; simfizis pubisin arkasında, rektumun önünde ve mesanenin altında yer almaktadır. Ceviz büyüklüğünde ve koni şeklinde olan prostat bezi mesaneden çıkarken proksimal üretrayı çevrelemektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Prostat bezinin anatomisi (18)

McNeal, güncel olarak da en çok kullanılan şekliyle prostatı farklı embriyolojik kökeni olan santral zon, periferal zon, transizyonel zon olmak üzere üç bölgeye ayırmıştır (Şekil 2) (16). Periferal zon, apekteki tüm prostatik glandüler dokuyu ve ayrıca kapsülün

arkasına yerleşmiş tüm dokuyu içermektedir. Bu bölgede karsinom, kronik prostatit ve postinflamatuar atrofi diğer bölgelere göre nispeten daha yaygındır (19), tüm prostat kanserlerinin %70'i periferal zon kaynaklıdır (16,20). Santral zon, prostat tabanının bir bölümünü oluşturmakta ve ejakülatör kanalları çevrelemektedir (19). Prostat kanserinin %1-5'i bu bölümden kaynaklanmaktadır (21). Transizyonel zon, bezin ortasında üretra lateralinde iki eşit glandüler doku parçasından oluşmaktadır. Prostatın bu kısmı çoğunlukla yaşa bağlı benign prostat hiperplazisinin geliştiği kısımdır (19). Tümörlerin yaklaşık %20'si bu bölümde oluşmaktadır (21).



Şekil 2. Prostat bezinin zonları (19)

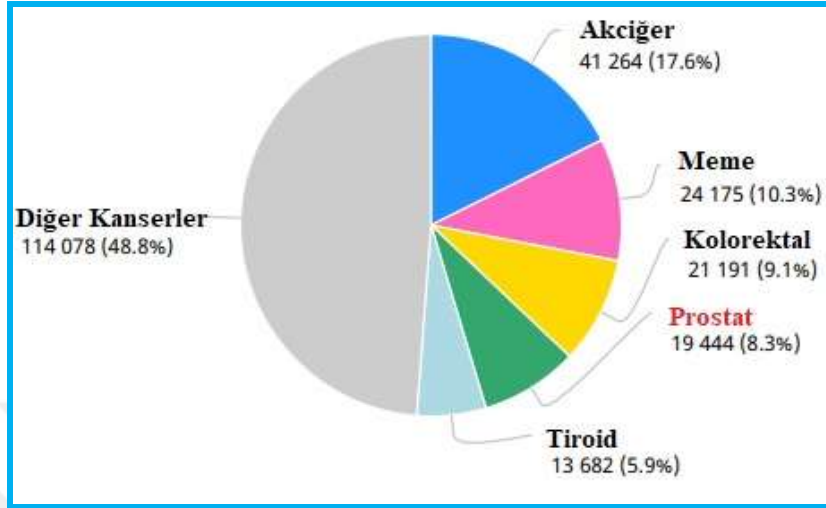
PROSTAT KANSERİ

Epidemiyoloji

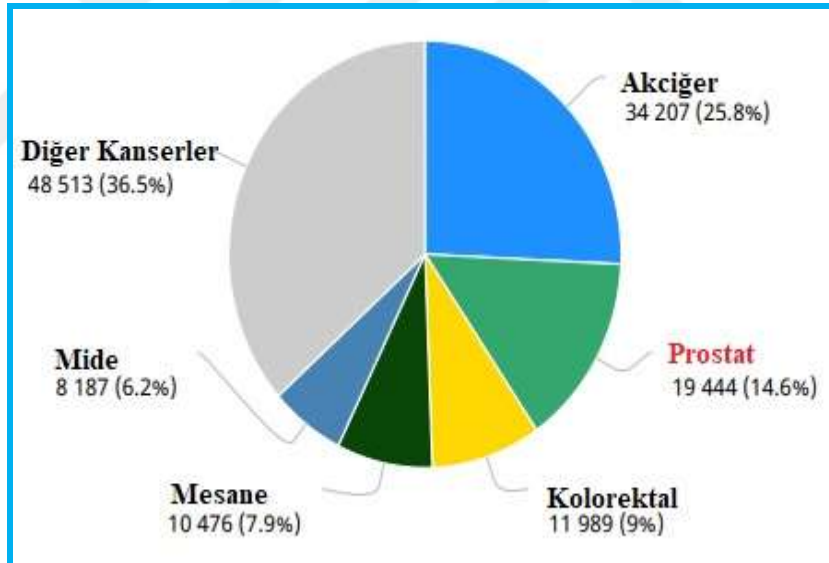
Prostat kanseri, Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN)'nin 2020 verilerine göre 1.414.259 vaka ile dünya çapında kanserlerde %7,3 oranla 4. sırada, erkeklerde %14,1 oranla 2. sırada yer almaktadır (22). Türkiye istatistiklerine bakıldığında ise 19.444 yeni vaka ile %8,3 oranla en sık görülen 4. kanser türü olurken (Şekil 3), erkeklerde %14,6 oranla akciğer kanserinden sonra 2. sırada bulunmaktadır (Şekil 4) (23). Prostat kanseri sebebiyle 2020 yılı içerisinde tüm dünyada 375.304 (22), Türkiye'de ise 5.464 kişi hayatını kaybetmiştir (23).

Prostat kanserinin görülme oranları bölgelere ve popülasyonlara göre değişmektedir. Yaşa göre normalleştirilmiş oranlara bakıldığında sırasıyla en fazla Okyanusya, Kuzey

Amerika ve Avrupa’da görülmektedir. Afrika ve Asya’da ise gelişmiş ülkelere oranla daha az sıklıktadır (24).



Şekil 3. GLOBOCAN 2020 Türkiye kanser verileri (23)



Şekil 4. GLOBOCAN 2020 Türkiye erkekler için kanser verileri (23)

Risk Faktörleri

Prostat kanserinin etiyojisi diğer yaygın kanserlerle karşılaştırıldığında büyük ölçüde bilinmemektedir. Belirlenen risk faktörleri ileri yaş, ırk ve aile öyküsüdür. Prostat kanseri ile ilişkili olduğu düşünülen diğer faktörler beslenme tarzı, obezite, fiziksel hareketsizlik, inflamasyon, hiperglisemi, enfeksiyonlar ve kimyasallara çevresel maruziyettir (24).

1-Yaş: Yaş ile prostat kanseri riski arasında güçlü bir ilişki vardır. 40 yaşın altındaki erkeklerde nadir görülmektedir (25). Prostat kanseri vakalarının yaklaşık %85'i 65 yaşından sonra teşhis edilmektedir. Otopsi çalışmalarına göre 30-39 yaş aralığındaki erkeklerin %30'unda, 50-59 yaş aralığındakilerin %50'sinde ve 85 yaş üzerindekiilerin %75'inden fazlasında prostat kanseri lezyonları bulunmuştur.

2-Irk: Prostat kanseri insidansı ırklar arasında büyük farklılıklar göstermektedir (26). Afrika kökenli Amerikalılar 100.000'de 275.3 ile dünyadaki en yüksek prostat kanseri oranına sahiptir (20). Amerika Birleşik Devletleri'nde, Avrupa kökenli beyaz erkeklerle karşılaştırıldığında, Afrika kökenli siyah erkekler %58 daha fazla prostat kanseri ve %144 daha fazla ölüm oranına sahipken, Hispanik erkekler %14 daha düşük insidansa ve %17 daha düşük ölüm oranına sahiptir (27).

3-Aile öyküsü: Prostat kanseriyle aile öyküsü arasındaki ilişki vaka-kontrol ve kohort çalışmalarıyla doğrulanmıştır (26). Babasında veya kardeşinde prostat kanseri olan kişilerde kanser riski iki katına çıkmaktadır (20,25), her ikisinde de olan kişilerde ise prostat kanseri riski neredeyse 9 kat yüksektir (25). Epidemiyolojik çalışmalar, pozitif aile öyküsü olan erkeklerde olmayanlara göre ortalama 6-7 yaş daha erken prostat kanseri teşhisi konulduğunu göstermektedir. Bu çalışmalara göre tüm prostat kanseri vakalarının %5-10'unun ve 55 yaşında meydana gelenlerin %40'ının kalıtsal bir temele sahip olabileceği tahmin edilmektedir (20).

4-Beslenme tarzı: Beslenme tarzı prostat kanseri gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Gelişmekte olan ülkelerden (düşük riskli) sanayileşmiş ülkelere (yüksek riskli) göç eden göçmenlerde batı tarzı beslenmeye geçilmesiyle birlikte prostat kanseri vakalarının arttığı belirlenmiştir. Aynı şekilde Afrika'dakilerle karşılaştırıldığında Afrikalı Amerikanlar arasında prostat kanseri görülme oranının 40 kat yüksek olduğu ve Amerika'da yaşayan Çinli erkeklerde Çin'dekilere kıyasla riskin 16 kat yüksek olduğu bulunmuştur. Tüm bu çalışmalar çevresel faktörlerin önemini göstermektedir (24).

Batı tarzı beslenmenin en belirgin özellikleri yüksek kalori ve yağ içermesidir. Çalışmalar, kişi başına düşen yağ tüketimi ile prostat kanseri ölüm oranı arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiştir (28). Doymuş hayvansal yağ alımı ile prostat kanseri riski arasında yer aldığı düşünülen birkaç biyolojik mekanizma vardır, bunlar: 1) androjen yoluyla

prostat kansinonezinin teşvik edilmesi 2) reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin artması ve lipid metabolizmasından kaynaklanan lökotrienler ile prostaglandin seviyelerinin artması 3) bazal metabolizmanın, insülin büyüme faktörünün ve tümör proliferasyonunun artması şeklinde bildirilmiştir.

Diyetle et alımı da prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Haftada beş porsiyon veya üzerinde işlenmiş et tüketen erkeklerin, haftada bir veya daha az tüketenlere göre daha yüksek prostat kanseri riski taşıdıkları gösterilmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş kırmızı et tüketenlerde prostat kanseri riski %20 artmıştır (24).

Prostat kanseri ile süt ürünleri arasında, total ve doymuş yağ alımına katkısından bağımsız olarak, pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur. Araştırmalar son zamanlarda kalsiyum alımına odaklanmıştır. Sağlık Uzmanları Takip Çalışması'na göre, takviyelere bağlı olarak daha fazla kalsiyum (>2000 mg/gün) alan erkeklerde düşük kalsiyum alanlara göre prostat kanseri riski 4,6 kat artmaktadır (24,28). Bunun sebebinin, yüksek kalsiyum alımının antikarsinogenik özellikler sergileyen D vitamini metaboliti 1,25-dihidroksi D vitamini baskılaması olabileceği rapor edilmiştir (28).

D vitamininin prostat kanserinde koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar, D vitamininin apoptozda artış, hücre döngüsünün inhibisyonu ve metastatik potansiyelde azalma yoluyla prostat kanseri hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (26).

Prostat kanserini önlemeye yönelik Selenyum ve E Vitamini Kanseri Önleme Denemesi (SELECT), en az 7 yıllık bir faz III, randomize, plasebo kontrollü, selenyum ve E vitamini takviye denemesidir. Denemeye yaklaşık %20'si beyaz olmayan 35.000'den fazla erkek katılmıştır. Ortalama 5.5 yıllık bir ara analize göre, 200 µg/gün l-selenometiyonin ve 400 IU/gün E vitamininin (tek başına veya kombinasyon) plaseboya kıyasla daha düşük prostat kanseri insidansı ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (26). Bazı çalışmalar ise selenyum tüketimi yüksek olanlarda düşük olanlara göre prostat kanseri gelişiminde %50-60 oranında bir azalma olduğunu göstermiştir. Bu farklılıkların, çalışmalarda farklı selenyum formları kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (24).

Domates bazlı ürünlerin sık tüketimi prostat kanseri riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir çünkü domates güçlü bir antioksidan ve karotenoid olan likopen içermektedir (29). Sağlık Uzmanı Takip Çalışması, haftada 2-4 porsiyon domates sosu ile prostat kanseri riskinin azaldığını göstermiştir (24). Serum veya plazmadaki likopeni değerlendiren çalışmalarda da daha yüksek likopen konsantrasyonlarının %25 daha düşük

prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur (25). Diğer taraftan ilerlemiş prostat kanserinde yapılan likopenin faz II çalışması, bu ajanın herhangi bir klinik yararını gösterememiştir. Epidemiyolojik birkaç çalışmada da benzer sonuçlar görülmüştür. Bu nedenle, domates ile prostat kanseri riski arasındaki ilişkinin daha fazla araştırılması gerekmektedir (24).

Asya'daki düşük prostat kanseri insidansının yüksek fitoöstrojen tüketimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Soya fasulyesi, prostat kanseri üzerinde profilaktik etkisi olan fitoöstrojenlerden zengindir. İnsan androjene duyarlı prostat kanseri hücrelerine sahip farelerde yapılan bir çalışmada, çavdar ekmeği ve soya proteinine dayalı bir diyetle tümör boyutu azalmış, apoptoz artmış ve prostat spesifik antijen (PSA) salgılanması azalmıştır (29).

5-Sigara ve alkol kullanımı: Sigaraya aktif veya pasif maruziyet birçok kanser türü için kanserojen olarak kabul edilmektedir. Epidemiyolojik çalışmaların çoğunda sigara ile prostat kanseri insidansı arasında bir ilişki bulunmadığı rapor edilmesine rağmen, bazı kohort çalışmaları günde 1 paket ve üzerinde sigara içenlerin içmeyenlere göre 2-3 kat daha fazla risk altında bulunduğunu göstermiştir. Sigara ile prostat kanseri ölümlerini inceleyen çoğu çalışma ise sigara içenlerin içmeyenlere kıyasla kanserden ölme riskinin 2 kat fazla olduğunu rapor etmiştir (24). Sigara ve prostat kanseri riski arasında doza bağımlı bir ilişki gösterilmemiş olmakla birlikte sigaranın içerisinde bulunan kadmiyumun oksidatif stresi artırması ve dolaşımdaki androjen seviyelerini yükseltmesi nedeni ile prostat kanserine neden olduğu bildirilmiştir.

Yine prospektif bir kohort çalışmasında, günde üçten fazla alkollü içecek tüketen erkeklerde prostat kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, yüksek alkol alımıyla prostat kanseri riskinde bir artış olmadığını ve haftada 1-3 kadeh şarabın koruyucu bir etkisinin olduğunu rapor eden çalışmalar da mevcuttur (26).

6-Obezite: Dünya çapında erkekler arasında aşırı kilo ve obezite prevalansı sırasıyla %39 ve %11'dir. Obezite, çeşitli hormonal yolların düzensizliğinde rol oynamakta ve daha yüksek seviyelerde insülin, estradiol ve enflamatuar sitokinlere; daha düşük seviyelerde adiponektin, testosteron ve seks hormonu bağlayıcı globülin salgılanmasına yol açmaktadır. Obezite, artmış prostat kanseri mortalitesi ve nüks etme riski ile ilişkilidir. Prostat kanseri teşhisinden sonra erkeklerde yapılan çalışmaların bir meta-analizinde, vücut kitle indeksinde

5 kg/m²lik bir artışta prostat kanserinden ölümlerin %20 oranında arttığı belirtilmiştir (25).

Obezite, özellikle fiziksel hareketsizlikle birleştiğinde insülin direncinin gelişmesine yol açmakta ve böylece kanda kronik olarak yüksek seviyelerde insülin bulunmasına neden olmaktadır. İnsülin, büyümeyi ve proliferasyonu destekleyen bir hormondur, bu nedenle prostat kanserinin başlamasını ve/veya ilerlemesini teşvik eden risk faktörlerine dahil edilebilmektedir. Ek olarak, adipoz hücreleri bir inflamasyon kaynağıdır (24).

Semptomlar

Prostat kanseri olan çoğu hasta, özellikle hastalığın erken evrelerinde asemptomatiktir. Tipik olarak Benign Prostat Hiperplazisi ile ilişkilendirilen idrar debisinde zayıflama, idrar akışının başlamasının zaman alması, sık idrara çıkma, noktüri, idrar tutmada zorlanma, idrar akışının aralıklı olması, mesanenin tam boşaltılamaması ve idrar kaçırma gibi alt idrar yolu semptomları prostat kanseri olan erkeklerde de gözlenebilmektedir. Hastalığı ilerlemiş olanlarda, metastazın veya açıklanamayan aneminin neden olduğu kalça, sırt ve pelviste kemik ağrısı da görülebilmektedir (17).

Tanı Yöntemleri

Prostat kanseri genellikle yavaş ilerlemektedir ve erken evrelerde asemptomatiktir; bu da hastalığın erken teşhisini zorlaştırmaktadır (30). Prostat kanseri tanı yöntemleri arasında dijital rektal muayene, prostat spesifik antijen (PSA) taraması, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve biyopsi bulunmaktadır.

1-Dijital rektal muayene: Dijital rektal muayene (DRE), prostat bezindeki herhangi bir şişlik veya sertleşmeyi tespit etmek için kullanılan rutin bir tarama testidir (30). Uzun yıllar boyunca, prostat kanseri için birincil tarama testi olmuştur. (31). DRE yararlı bir tarama aracıdır ancak spesifik olmaması, kesin sonuç vermemesi nedeniyle prostat kanserini tek başına teşhis edemez. Aynı zamanda muayeneyi yapıp yorumlayan hekimin becerilerine bağlıdır (30).

2-Prostat spesifik antijen (PSA) taraması: PSA, seminal sıvıya salınan bir serin proteazdır. PSA üretimi prostatik epitel ile sınırlıdır ve transkripsiyonu androjenler tarafından kontrol edilmektedir. Kandaki PSA seviyeleri tipik olarak düşüktür ancak kanser gibi malign

süreçlerle veya benign prostat hiperplazisi, iltihaplanma, enfeksiyon, travma gibi süreçlerle normal prostat yapısının bozulması sonucunda artabilmektedir (32).

Serum PSA için normal referans aralığı <4 ng/ml, tanısal gri bölge ise 4-10 ng/ml olarak belirlenmiştir. Benign epitelden PSA üretimi yaşla birlikte arttığı için, testin özgüllüğünü iyileştirecek yaşa özgü kesme noktaları geliştirilmiştir (Tablo 1). Yaşa özgü seviyeler, daha genç erkeklerde kanseri saptamak için PSA'nın duyarlılığını artırırken, yaşlı erkeklerde erken evre ve tedavi edilebilir hastalık için test duyarlılığını azaltmaktadır (33).

Kan dolaşımındaki PSA'nın %70-90'ı α 1-antichymotrypsin veya α 2- macroglobulin ile kompleks haldedir, kalanı serbest PSA (fPSA) olarak adlandırılmaktadır. fPSA'nın da farklı formlarda olduğu bilinmektedir, bunlardan biri benign prostat hiperplazisi (BPH) ile ilişkili PSA (BPSA)'dır. BPSA, özellikle BPH ve transizyonel zon ile ilişkilidir. PSA'nın bir öncü formu olan proPSA, kanserle daha çok ilişkilidir. proPSA 2-4 ng/ml aralığında ölçüldüğünde, kanser tespitinde fPSA veya toplam PSA'dan daha fazla uyarıcıdır. Tek başına toplam PSA için %23 olan test özgüllüğü, toplam PSA, fPSA ve proPSA kombinasyonu kullanıldığında %44'e yükselmektedir (33). 4-10 ng/mL arasında PSA konsantrasyonlarına ve palpe edilebilen benign bir prostat bezine sahip erkeklerde, hem %fPSA hem de yaşa özgü PSA kesim noktaları, kanser tespiti için toplam PSA'nın özgüllüğünü artırmıştır ancak %fPSA'nın önemli ölçüde daha yüksek duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Yaşa özgü PSA kesim noktaları, 60 yaşın üzerindeki erkeklerin %20-60'ında kanser tespitinde başarısız olmuştur (34).

Tablo 1. Yaşa özgü serum PSA konsantrasyonları (35)

Yaş Aralığı	Serum PSA Konsantrasyonu (ng/ml)
40-49	>2.5
50-59	>3.5
60-69	>4.5
70-79	>6.5

PSA, tek başına bir belirteç olmasa da prostat kanserinin tanı ve takibi için hala en çok kullanılan klinik belirteçtir. Serum PSA radikal prostatektomi, radyasyon tedavisi, yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason ve kriyoterapi sonrası azalmalı ve düşük seviyelerde kalmalıdır, art arda yükselmeler kanser nüksünün bir göstergesi olabilmektedir (30).

3-Transrektal ultrasonografi (TRUS) ve biyopsi: Prostat kanseri için yaygın kullanılan tanı yöntemlerinden biri TRUS'tur. TRUS, 2,5 cm çapında 7.5 mHz çift düzlemli bir rektal içi prob kullanarak prostat ve seminal veziküllerin görüntülenmesini sağlamaktadır. Prostatın ana hatlarını görüntüleyebilmekte, prostat içindeki kistleri, apseleri, kalsifikasyonları ve prostat hacmini belirlemek için kullanılabilir. Bununla birlikte erken evre prostat kanserinin saptanması için önerilmemektedir. Anormal DRE, yüksek veya artan PSA seviyeleri, prostatik epitelyal neoplazi ve atipik küçük asiner proliferasyon gösteren biyopsiler sonucunda TRUS biyopsisi yapılabilir (33).

Prostat Kanseri Evresinin Belirlenmesi

Prostat kanseri evrelemesi PSA değeri, DRE bulguları, prostat biyopsi sonuçları ve Gleason skoruna göre belirlenmektedir ve Amerikan Kanser Komitesi tarafından geliştirilen TNM evreleme sistemini baz almaktadır (17). Prostat Adenokarsinomu 2002 TNM evrelemesinde T (primer tümör), N (lenf nodu) ve M (metastaz) kategorileri bulunmaktadır. T kategorisi klinik muayene, görüntüleme, endoskopi, biyopsi ve biyokimyasal testlere; N kategorisi klinik muayene veya görüntülemeye; M kategorisi klinik muayene, görüntüleme, kemik sintigrafisi ve biyokimyasal testlere dayanmaktadır (33). Tümör yayılımı T1-T4 arasında değerlendirilmektedir ve daha yüksek T değerleri prostat ve çevresindeki yapıların daha fazla tutulduğunu göstermektedir. Lenf nodu kategorisi örnek değerlendirilemez (X), lenf nodu tutulumu yok (0), lenf nodu tutulumu var (1) şeklinde gösterilmektedir. Metastaz kategorisi ise metastaz değerlendirilemez (X), metastaz yok (0), metastaz var (1) olarak alt kategorilere ayrılmaktadır (17) (Tablo 2).

Tablo 2. TNM evreleme sistemi (33)

Primer Tümör	
<i>TX</i>	Primer tümör değerlendirilemez
<i>T0</i>	Primer tümör bulgusu yok
<i>T1</i>	Palpe edilemeyen ve görüntülenemeyen, klinik olarak belirsiz tümör
<i>T1a</i>	Rezeke edilen dokunun %5'inde rastlanan palpe edilemeyen tümör
<i>T1b</i>	Rezeke edilen dokunun > %5'inde rastlanan palpe edilemeyen tümör
<i>T1c</i>	İğne biyopsisi ile tespit edilen, palpe edilemeyen tümör, yüksek serum PSA

Tablo 2 Devam. TNM evreleme sistemi (33)

<i>T2</i>	Palpe edilebilen, görüntülenebilen veya radikal prostatektomi örneğinde gösterilebilen, prostat içinde sınırlı tümör (prostatik apeks, prostat kapsülü dahil)
<i>T2a</i>	Bir lobun yarısında veya daha azında bulunan tümör
<i>T2b</i>	Bir lobun yarısından fazlasını tutan ancak her iki lobda da olmayan tümör
<i>T2c</i>	Her iki lobta da bulunan tümör
<i>T3</i>	Prostat kapsülü boyunca uzanan tümör
<i>T3a</i>	Kapsül dışına yayılmış tümör
<i>T3b</i>	Seminal veziküllere yayılmış tümör
<i>T4</i>	Mesane, dış sfinkter, rektum, levator kaslar ve pelvik duvar gibi yakın yapılara yayılmış tümör
<i>Bölgesel Lenf Nodları</i>	
<i>NX</i>	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
<i>N0</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
<i>N1</i>	Bölgesel lenf nodu metastazı
<i>Metastaz</i>	
<i>MX</i>	Uzak metastazlar değerlendirilemez
<i>M0</i>	Uzak metastaz yok
<i>M1a</i>	Bölgesel olmayan lenf nodu metastazı
<i>M1b</i>	Kemik metastazı
<i>M1c</i>	Diğer bölümlere metastaz

Tedavi

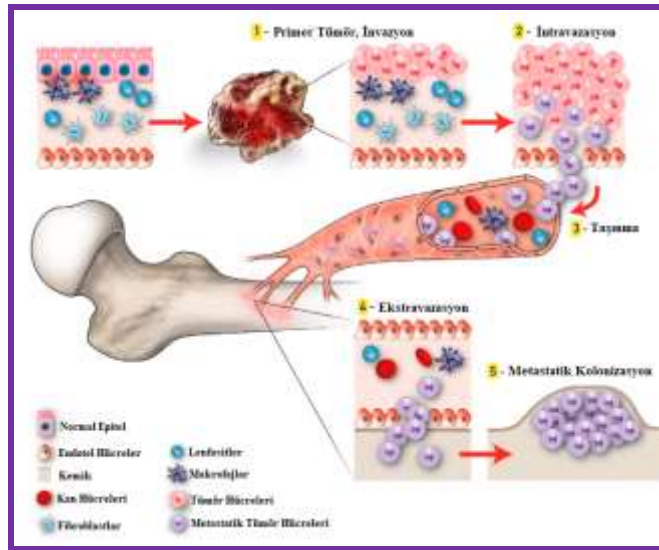
Tedavi seçenekleri, hastalığın derecesine ve tekrarlama riskine, ayrıca yaş, komorbidite ve kişisel tercihler gibi hasta özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Düşük riskli, lokalize kanser veya daha yaşlı ve/veya başka ciddi sağlık sorunları olan hastalar için acil tedavi yerine aktif sürveyans yaygın olarak önerilmektedir. İleri evreler için, androjen yoksunluğu tedavisi (ADT), kemoterapi, kemiğe yönelik tedavi (Zoledronik Asit veya Denosumab gibi), radyasyon veya bu tedavilerin bir kombinasyonu kullanılabilir. Abirateron ve Enzalutamid gibi daha yeni hormon tedavisi biçimleri, geleneksel hormon tedavisine yanıt vermeyen ilerlemiş prostat kanserini tedavi etmek için son yıllarda onaylanmıştır (36).

Prostat kanseri hücrelerinin androjen stimülasyonuna bağımlı olduğu ilk olarak

Huggins ve Hodges tarafından açıklanmıştır. Androjen, androjen reseptörüne (AR) bağlanarak çekirdeğe geçmektedir ve bu kompleksin androjene duyarlı elementlere bağlanması, androjenle düzenlenen genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir. Bunun sonucunda prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu uyarılmakta ve apoptoz inhibe edilmektedir. Bu nedenle, kimyasal ve cerrahi kastrasyon yoluyla uygulanan androjen yoksunluğu tedavisi, erken metastatik prostat kanseri tedavisinin temel dayanağı olmuştur. Bununla birlikte tüm hastalar bir noktada, tümörleri androjenden yoksun ortama uyum sağladığı için "kastrasyona dirençli" hale gelmektedir (37). Son yıllarda yapılan faz 3 çalışmalarına bakıldığında Doretaksel: Abirateron, Enzalutamid, Kabazitaksel, Radyum-223 ve Sipuleucel-T gibi tedavi seçenekleri umut vadeden sonuçlar vermektedir (38).

METASTAZ

Metastaz, en basit tanımıyla, malign hücrelerin primer tümörden uzak bölgelere yayılmasıdır (39). Kansere bağlı ölümlerin %90'ından sorumlu olan metastaz, kanser patogenezinin en az anlaşılan bileşeni olmaya devam etmektedir. Metastatik yayılım sırasında primer tümör kanser hücresi, birçok karmaşık adımı yerine getirmektedir: Lokal olarak çevreleyen dokuya invaze olur, lenf sistemi ve kan damarlarına girer (intravazasyon), hayatta kalır ve genellikle kan dolaşımı yoluyla uzak dokuların mikrodamarlarına geçer, kan dolaşımından çıkar (ekstravazasyon), uzak dokuların mikroçevresinde hayatta kalır ve sonunda hücre proliferasyonunu ve makroskopik sekonder tümör oluşumunu (kolonizasyon) kolaylaştıracak şekilde bu dokuların yabancı mikroçevresine uyum sağlar (40,41) (Şekil 5).



Şekil 5. Tümör ilerlemesi ve metastatik süreç (42)

Prostat Kanseri Kemik Metastazı

Katı malignitelerin çoğu gibi prostat kanseri de karaciğer, akciğerler ve beyin gibi uzak organlara metastaz yapabilmektedir ancak kemiğe metastaz yapma eğilimi alışılmadık derecede yüksektir. Lokalize prostat kanserli hastalarda 5 yıllık sağkalım %100'e yakınken, uzak metastaz gelişen hastalarda %31'e düşmektedir (37).

Erken evrelerde prostat kanseri hücreleri, ince bir kapsül içinde olan prostat beziyle sınırlıdır. Hastalık ilerledikçe bazı kanser hücreleri, genetik yatkınlık, çevresel etkileşim/uyarılma veya her ikisinin kombinasyonu sonucunda daha agresif hale gelmekte ve çevre yapıyı bozmaya başlamaktadır. Bu hücreler ya doğrudan çevre dokuyu istila etmekte ya da lenfatik ve hematojen yollarla yayılmaktadır. Doğrudan invazyon, kanser hücrelerinin prostatın yakınında bulunan erektil sinirlere, seminal veziküllere, mesaneye ve rektuma doğrudan yayılmasına neden olabilmektedir. Ancak lenfatik ve vasküler yollar sıklıkla kanser hücrelerinin kemikler, akciğerler ve karaciğer dahil olmak üzere uzak organlara sistemik yayılmasıyla sonuçlanmaktadır (43).

Stephen Paget, 1889'da yaptığı çalışmada, metastazın "tohumlar" (kanseri hücreleri) ve "toprak" (konakçı mikroçevresi) arasındaki etkileşime dayandığı görüşünü savunmuştur (44). James Ewing, metastazın primer tümörle ilişkili vasküler ve lenfatik kanalların anatomisi ile belirlendiğini öne sürerek Paget'in teorisine karşı çıkmıştır. Ewing'in görüşü daha sonra Isaiah Josh Fidler tarafından yapılan seminal çalışmalarla, tümör hücrelerinin tüm organların damar sistemine ulaşmasına rağmen, metastazların seçici olarak bazı organlarda geliştiğini kesin olarak gösterene kadar geçerliliğini korumuştur. Böylece metastatik "toprak" teorisi görüşü tekrar dikkate alınmaya başlanmış ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır (45-47). Elde edilen bulgular, uzak bölgelerde uygun mikroçevresel koşulların oluşumundan primer tümörlerin kendilerinin sorumlu olduğunu ve yeni koloninin kurulmasından önce kanser hücrelerinin hayatta kalmasının ve çoğalmasının sürdürülmesinde belirleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Günümüzde, bu özel mikroçevreye genellikle "pre-metastatik niş" denmektedir. Metastatik niş teorisi, uygun bir mikro ortamın (pre-metastatik niş), tümör hücrelerinin yerleşmesini (metastatik niş) ve sekonder bölgelerde (mikrodan makrometastatiğe geçiş) çoğalmasını desteklediğini öne sürmektedir. Pre-metastatik niş, endojen organ mikroçevresi ile primer tümörler tarafından salgılanan spesifik faktörler arasındaki sinerjik etkileşim sonucu oluşmaktadır. Kanseri progresyonu durumunda, kemik homeostazı genellikle değişmekte ve kanserin kökenine ve tipine bağlı olarak osteoblastik, osteolitik veya karışık metastatik lezyonlara yol açmaktadır. Prostat kanseri hastalarında yaygın olarak bulunan osteoblastik

metastazda; metastatik kemik, öncesinde kemik rezorpsiyonunun olmadığı, aşırı ve düzensiz kemik oluşumu ile sonuçlanan yeni doku birikimi ile karakterize edilmektedir (42).

TGF- β SİNYALİ

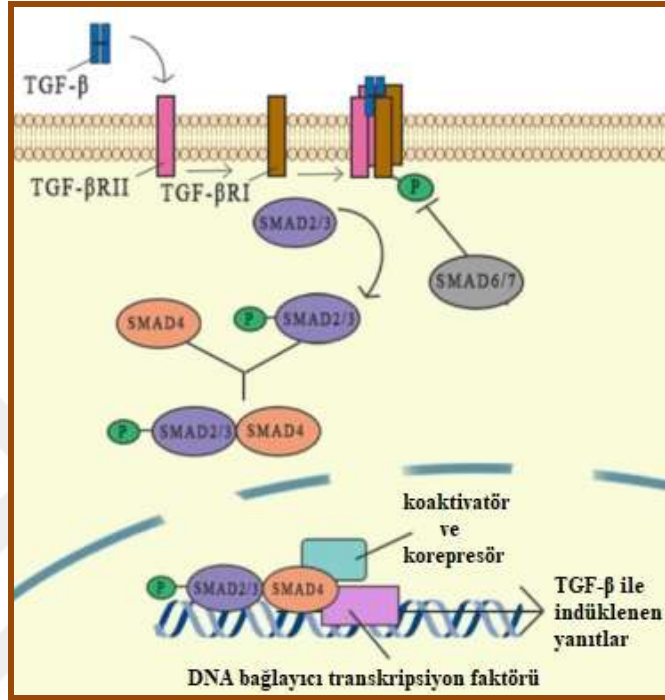
TGF- β ilk olarak, sıçan fibroblast hücre hatlarının büyümesini uyarma yeteneği ile keşfedilmiştir. Son otuz yılda, TGF- β 'nin hemen hemen tüm hücre tipleri tarafından üretildiği, kemirgenlerde ve insanlarda etkili olduğu bulunmuştur (48). TGF- β sinyalinin hücre farklılaşması, embriyogenez ve kemiğin yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (49). TGF- β , hücre yüzeyi serin-treonin kinaz reseptörleri (TGF β R1 ve TGF β R2) ve hücre içi sinyal dönüştürücüler SMAD2 ve SMAD3'ün heteromerik kompleks oluşturması aracılığıyla sinyal vermektedir. TGF- β ligandlarına yanıt olarak TGF β R2, TGF β R1'i transfosforile etmekte ve böylece SMAD2 ve SMAD3'ün fosforilasyonuna aracılık etmektedir (50). Aktive edilen SMAD2/3, reseptörden ayrılmakta ve SMAD4 ile heterotrimerik bir yapı oluşturarak çekirdeğe geçmektedir. Burada yüzlerce hedef geni aktive ederek veya baskılayarak DNA transkripsiyon faktörlerine ve kofaktörlerine bağlanmaktadır (48) (Şekil 6).

TGF- β , tümör mikroçevresinde duruma göre ikili rol üstlenebilmektedir (48,49) ve buna "TGF- β Paradoksu" denmektedir. Erken evre tümörlerde TGF- β yolağı apoptozu indüklemekte ve bir tümör baskılayıcı olarak karsinom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Buna karşılık ileri evrelerde, genomik kararsızlığı, epitelyal-mezenkimal geçişi, neo-anjiyogenezi, immün kaçınmayı, hücre hareketliliğini ve metastazı modüle eden tümör öncesi etkileri bulunmaktadır (48).

Normal, stressiz dokuda TGF- β 'nin sürekli bazal salınımı homeostazın korunması için yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte doku hasarı koşulları altında TGF- β , kontrolsüz rejeneratif hücre çoğalmasını ve iltihaplanmayı önlemek için kan trombositleri ve çeşitli stromal bileşenler tarafından bol miktarda salgılanmaktadır. Bu durum tümörlerde de görülmektedir. TGF- β , tümör mikroçevresinde, başlangıçta premalign ilerlemeyi önlemek için bir sinyal olarak ancak sonrasında malign hücrelerin kendi avantajları için kullanabileceği bir faktör olarak sıklıkla bulunmaktadır. TGF- β 'nin varlığı birçok tümör alt grubunda belgelenmiştir, bu da kanserle belirgin bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir (51).

TGF- β sinyalinin, tümör oluşumunun baskılanmasından başlatılmasına otonom geçişinden sorumlu olan birçok genetik ve epigenetik değişiklik tanımlanmıştır. TGF- β ekspresyonu, tümör ilerlemesi sırasında belirgin şekilde daha yüksek bir seviyede ortaya çıkmaktadır ve kötü prognoz ile ilişkilidir (48). Birçok çalışma, birçok tümör tipinde SMAD2,

SMAD3, SMAD4, TGF β R1 ve TGF β R2'nin genetik mutasyonlar veya delesyonlar ile inaktif olduğunu göstermektedir (52). Serumdaki yükselmiş TGF- β konsantrasyonu, TGF- β yolağında yer alan anahtar bileşenlerin fonksiyon kaybı mutasyonları ile tutarlıdır (48).



Şekil 6. TGF- β sinyal yolağı (48)

TGF- β sinyal yolağı, normal prostat epitelinin düzenlenmesinde de önemli bir role sahiptir. Prostat kanseri oluşumu sırasında, çoğu prostat kanseri hücresi, TGF- β 'nin homeostatik etkilerine karşı dirençli hale gelmektedir. TGF β R1 veya TGF β R2 ekspresyon kaybı, prostat kanserlerinin yaklaşık %30'unda belgelenmiş olmasına rağmen çoğu prostat kanseri, TGF β R1, TGF β R2, SMAD2-3-4'ün mutasyonu veya silinmesi olmaksızın TGF- β 'ye dirençli hale gelmektedir ve bu nedenle, direnç mekanizması tanımlanmayı beklemektedir (53). TGF- β sinyal araçları, özellikle SMAD 2, 3 ve 4, çoğu androjen reseptörü gibi dokuya özel bir şekilde eksprese edilen oldukça karmaşık bir sinyal molekülleri ağıyla seçici olarak birleşmekte ve çapraz etkileşime girmektedir. Androjen reseptörü yanıtının, TGF- β ile indüklenen hücre ölümünün baskılanmasıyla fonksiyonel olarak birleşmesi muhtemel olduğundan, karsinogenez sırasında TGF- β 'ya karşı bu tür bir direnç, androjen bağımlılığının kaybına katkıda bulunabilmektedir. Prostat epitel hücrelerinde TGF- β tarafından apoptoz indüksiyonunun moleküler temelini daha iyi anlaşılması, prostat kanseri terapötikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olacaktır (10).

JAK/STAT SİNYAL YOLAĞI

Janus Kinaz (JAK)/ Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (STAT) sinyal yolağı, evrensel bir hücre içi sinyal iletim yoludur; hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve immün regülasyon dahil olmak üzere birçok önemli süreçte yer almaktadır. JAK/STAT yolağının mekanizması basit olsa da diğer yolaklarla çapraz etkileşiminden dolayı sonuçları karmaşıktır (54).

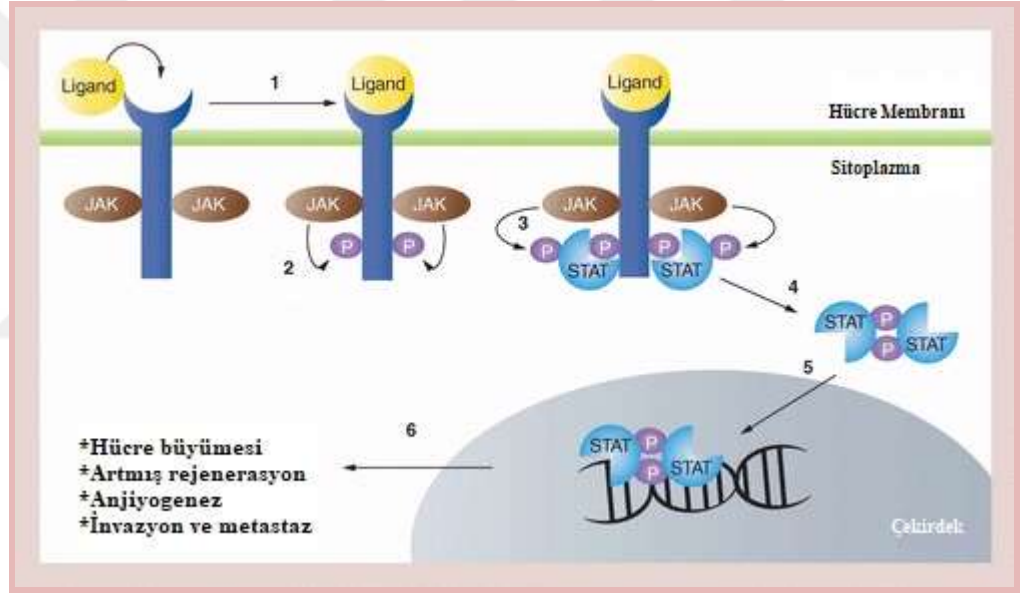
JAK/STAT yolu, ilgili transmembran reseptörlerine bağlanan interlökinler, interferonlar ve Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ailesi üyeleri gibi çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilebilmektedir. Bu reseptörlerin bazılarının sitoplazmik kuyrukları, reseptörlerin ligand ile indüklenen konformasyonel değişikliği üzerine aktive olan JAK'lar ile ilişkilidir. Aktive edilen JAK'lar daha sonra reseptörün sitoplazmik kuyruğundaki tirozin kalıntılarını fosforilleyerek STAT'lar için kenetlenme alanları yaratmaktadırlar. Reseptöre bağlandıktan sonra STAT'lar JAK'lar tarafından fosforillenerek aktifleşmekte ve dimerler oluşturmaktadırlar. Dimerleşen STAT'lar daha sonra hücre çekirdeğine yer değiştirmektedirler (Şekil 7) (55).

Tirozin kinazlar tarafından fosforile edilen reseptörler toplu olarak tirozin kinaz reseptörleri olarak bilinmektedirler ve JAK'lar, transmembran olmayan tirozin kinaz grubudur. JAK ailesi esas olarak dört üyeden oluşmaktadır: 1000'den fazla amino asit ve 120 ila 140 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip JAK1, JAK2, JAK3 ve Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz 2 (Tyk2). JAK1, JAK2 ve Tyk2 her yerde eksprese edilirken JAK3'ün esas olarak hematopoietik hücrelerde eksprese edildiği kabul edilmektedir.

Molekül ağırlıkları 79 ila 113 kDa arasında değişen STAT'lar, nöronal ve sitokin aracılı sinyal yollarında önemli rol oynamaktadırlar. İnsan STAT protein ailesi, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 olmak üzere yedi üyeden oluşmaktadır. STAT proteinlerinin yapısal olarak işlevsel bölümleri; N-terminali korunan alan, DNA-bağlama alanı, Src Homoloji 3 (SH3)-benzeri alan, Src Homoloji 2 (SH2) alanları ve C-terminal transkripsiyon alanıdır. Her biri benzersiz ve kritik bir işlevden sorumludur. N-terminal alanı korunmaktadır ve STAT fosforilasyonu ve dimer-dimer etkileşimleri için çok önemlidir. DNA bağlanma alanı genellikle 400 ve 500 amino asitleri arasında yer almakta ve bir DNA ve STAT protein kompleksi oluşturmaktadır. SH2 alanının diğer protein-protein etkileşimlerinde önemli olduğu bulunmuştur (54). Farklı STAT'ların SH2 alanlarındaki farklılıklar, çeşitli sitokin reseptörlerine STAT bağlanmasının seçiciliğini belirlemektedir (56). Yüksek oranda korunmuş fosforile edilmiş tirozin ve serin kalıntılarına sahip C-terminal transkripsiyon alanı, STAT'ların

aktivasyonu için gereklidir (54).

STAT3'ün, prostat kanseri de dahil olmak üzere, çeşitli kanserlerin ilerlemesinde vazgeçilmez bir rol oynadığı bilinmektedir. STAT3, tümör hücresi büyümesini destekleyen mikroçevreyi oluşturan bağışıklık hücrelerinin ve stromal hücrelerin farklılaşmasında, aktivasyonunda, migrasyonunda ve enflamatuar kapasitesinin belirlenmesinde önemlidir. STAT3'ün ana sinyal düğümü olarak görev aldığı prostat kanseri tümör hücrelerindeki sinyal yollarının çeşitliliği, onun sadece tümör proliferasyonu ve hayatta kalmasında değil, aynı zamanda hücre fenotipini, davranışını, stromal hücreler ve bağışıklık sistemi ile etkileşimini belirlemede de itici bir güç olduğu anlamına gelmektedir. Bu yüzden STAT3, özellikle kastrasyona dirençli prostat kanserinde terapötik bir hedef olarak araştırılmaktadır (57).



Şekil 7. JAK/STAT sinyal yolu (55)

STAT3 VE SMAD3 ÇAPRAZ ETKİLEŞİMİ

TGF- β sinyal yolu Hippo, Notch, Wnt ve JAK/STAT sinyal yolları ile çapraz etkileşim halindedir. Biyolojik süreçlerdeki rolleri karmaşık görünen TGF- β sinyal yolunun sonuçlarının doğru yorumlanabilmesi için diğer yollar da dikkate alınmalıdır (58).

STAT3 ve SMAD2/3 sinyal yolları hem benzer hem de farklı özelliklere sahiptir. İlk olarak her iki yolda da, ligandla uyarılan reseptör kompleksleri, fosforilasyon yoluyla gizli sitoplazmik transkripsiyon faktörlerini doğrudan aktive etmektedir. STAT3, esas olarak reseptörle ilişkili kinazlar tarafından tirozin fosforilasyonu ile aktive edilirken, SMAD2/3, tip I reseptörlerinin intrinsik kinaz aktivitesi yoluyla serin fosforilasyonu ile aktive edilmektedir.

İkincisi, aktive transkripsiyon faktörleri, kompleks oluşumundan sonra çekirdeğe yer değiştirmektedir. Tipik olarak, STAT3 homodimerize olurken, iki SMAD2 ve/veya SMAD3 molekülü, bir SMAD4 molekülü ile trimerik bir kompleks oluşturmaktadır. Çekirdekte, SMAD kompleksi, DNA ile başarılı etkileşim için diğer DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyarken, STAT3 kompleksi, bazen Cyclic amp-Response Element Binding Protein (CREB), Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB), c-Jun ve Glukokortikoid Reseptörü (GR) dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörleri ile işbirliği yapmasına rağmen, genellikle gerek duymamaktadır (59).

SMAD3 ve STAT3'ün karşılıklı inhibisyonuna, negatif düzenleyicilerin indüksiyonu, efektör moleküllerin veya yukarı akış aktivatör(ler)inin (JAK'lar) aşağı regülasyonu aracılık etmektedir (59). Ek olarak SMAD3 ve STAT3, doğrudan fiziksel etkileşim yoluyla da çapraz etkileşime girebilmektedir (60). Her ikisi de proteinlerin içsel işlevlerinde çok önemli roller oynayan SMAD3 MH2 alanı ve STAT3 DNA-bağlama alanı aracılığıyla birleşmektedirler, bu da fiziksel bir etkileşimin hem SMAD3 hem de STAT3 sinyal yollarını etkileyeceğini düşündürmektedir (60,61). Aktive edilmiş STAT3 hem fosforile edilmiş hem de edilmemiş SMAD3 ile etkileşime girebilmektedir (60).

TGF-β ve diğer sitokinler arasındaki çapraz etkileşimler, TGF-β'nın çeşitli fonksiyonlarında önemli bir rol oynayabilmektedir. TGF-β ve STAT3 sinyal yolları arasındaki çapraz etkileşimi bildiren çalışmalar bulunmaktadır. TGF-β, STAT3'ün fosforilasyonunu azaltmakta ve ardından aşağı akış genlerinin ekspresyonunu aşağı regüle etmektedir. STAT3 tükenmesinin hücreleri belirgin şekilde TGF-β aracılı apoptoza duyarlı hale getirdiği belirlenmiştir. STAT3, SMAD3-SMAD4 kompleks oluşumunu bozmakta ve SMAD3'ün kromatine bağlanmasını azaltmaktadır, böylece SMAD3 aracılı transkripsiyonel aktivasyon inhibe edilmektedir. STAT3'ün TGF-β sinyalini inhibe etmesi için SMAD3'e bağlanması gereklidir (50).

APOPTOZ

Hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişimi, doku homeostazı ve bütünlüğünde önemli bir süreçtir. Hücre proliferasyonu ve eliminasyonu, yetişkin organizmada fizyolojik bir homeostaz sürecini sürdürmek için gereklidir. Metamorfoz, embriyogenez, patogenez ve doku döngüsü sürecinde istenmeyen hücreler yok edilmektedir. Hücre ölümü tipik olarak iki mekanizma içermektedir: programlanmış hücre ölümü (apoptoz, otofaji, nekroptoz, apoptoz benzeri programlanmış hücre ölümü) ve nekroz. Belirli sinyallere yanıt olarak, genetik olarak programlanmış bir hücre intiharı sürecini içeren hücre ölümüne programlanmış hücre ölümü

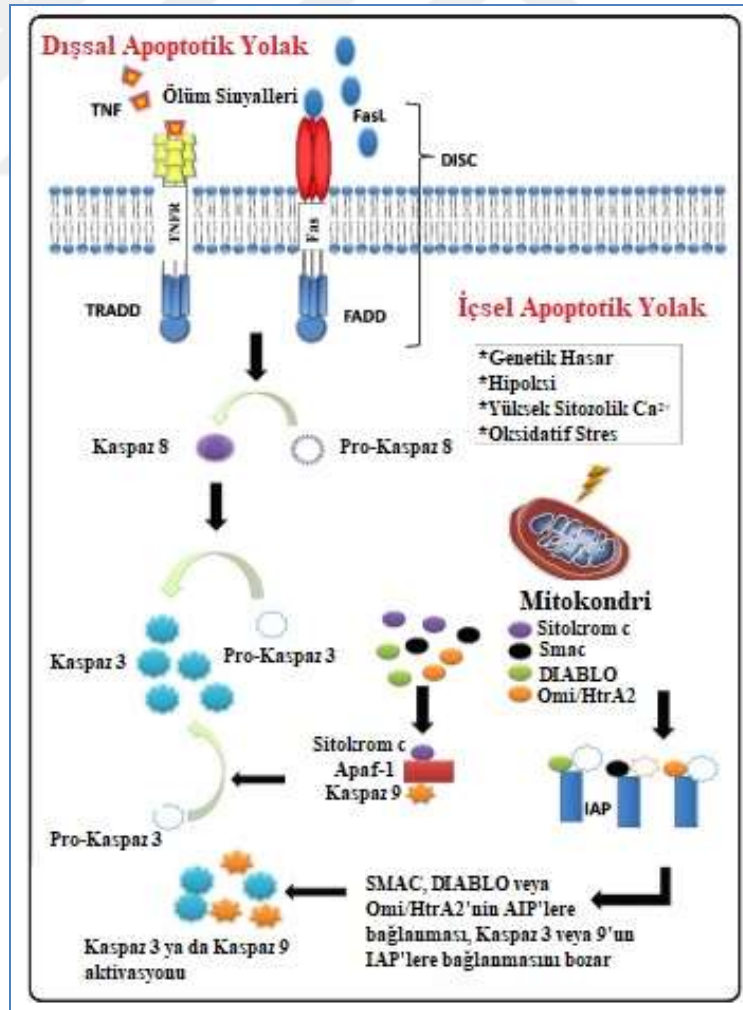
denmektedir. Programlanmış hücre ölümü, farklı morfolojik özelliklere sahip olması, doku homeostazını sürdürmesi ve istenmeyen hücreleri ortadan kaldırarak çok hücreli organizmalarda uygun hücre sayısını düzenlemesi nedeniyle hücre nekrozundan ayrılmaktadır (62). Programlı hücre ölümünde hücreler, çevre dokularda minimum hasar yaratarak temizlenirken, nekrozda hücre içeriği çevre dokulara dağılarak zarar vermektedir (63). Çeşitli araştırma grupları sıklıkla programlanmış hücre ölümünü apoptoz ile eşdeğer görse de son çalışmalar, apoptotik olmayan programlanmış hücre ölüm biçimlerinin de var olduğunu kanıtlamıştır (62).

Apoptoz, hücrenin büyümesinin ve bölünmesinin durduğu, hücrenin kontrollü ölümüyle sonuçlanan bir süreçtir (63). Gereksiz veya istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırıldığı, yüksek düzeyde düzenlenmiş bir işlemdir. Gelişimde ve homeostazda kritik bir rol oynadığı için özellikle uzun ömürlü memelilerde önemlidir. DNA hasarı veya kontrolsüz çoğalma dahil olmak üzere apoptotik yolun aktive olmasına neden olacak çok çeşitli koşullar vardır. Apoptotik yol, hem hücre içi hem de hücre dışı sinyaller tarafından aktive edilebilmektedir. Apoptoza yol açan iki farklı yol vardır: sinyal tipiyle ilişkili olan içsel yolak (mitokondriyal yolak) ve dışsal yolak (ölüm reseptörü yolağı) (64). İçsel yolak, hasara yanıt olarak hücrenin kendisi tarafından başlatılırken; dışsal yolak, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından uyarılan ölüm reseptörleri aracılığıyla başlatılmaktadır. Her iki yol da Kaspaz 3 aktive edildiğinde birleşmekte ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (63) (Şekil 8).

Fizyolojik koşullarda, apoptoz süreci pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki bir denge ile düzenlenmektedir. Bununla birlikte, apoptoz sürecindeki herhangi bir kusur veya düzensizlik patolojik sorunlara neden olmaktadır. Apoptotik yollardaki düzensizlik, Parkinson, Alzheimer, Huntington, otoimmün hastalık ve AIDS gibi apoptozun fazla olduğu çeşitli hastalıkların ayırt edici özelliği olarak kabul edilebilmektedir. Bunların aksine kanser ise apoptozun az olmasına en belirgin örnektir (65). Kanserün önlenmesi, apoptozun ana işlevlerinden biridir. Apoptotik kontrolün kaybı, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasına izin vermektedir. Böylece kanser hücreleri; tümör ilerlemesi sırasında invazivliği artırabilen, anjiyogenezi uyarabilen, hücre proliferasyonunu düzensizleştiren ve farklılaşmaya müdahale edebilen mutasyonların birikmesi için daha fazla zaman kazanmış olmaktadır (64). Klinik olarak kansere karşı en iyi terapötik strateji, kanser hücrelerinde apoptozun baskılanmasına neden olan kusurlu bileşenleri hedeflemektir (65).

İçsel Apoptotik Yolak (Mitokondriyal Yolak)

Adından da anlaşılacağı gibi, intrinsik yol hücre içinde başlatılmaktadır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar içsel mitokondriyal yolun başlatılması sağlayan bazı tetikleyicilerdir. Uyarılardan bağımsız olarak bu yol, artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitoplazmaya sitokrom-C gibi proapoptotik moleküllerin salınımının sonucudur (66). Tüm yolak, B Hücreli Lenfoma-2 (BCL2) protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (64). BCL2 proteinlerinin iki ana grubu vardır, bunlar: pro-apoptotik proteinler (BCL2 ilişkili X protein (BAX), BCL2 homolog antagonisti (BAK), BCL2 ilişkili ölüm promotörü (BAD) gibi) ve anti-apoptotik proteinlerdir (BCL2, B Hücre Lenfoma ekstra büyük (BCL-xL) gibi). Anti-apoptotik proteinler sitokrom-C'nin mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu salınımı indüklemektedir. Apoptozu başlatan asıl olay, pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulmasıdır (66).



Şekil 8. İçsel ve dışsal apoptotik yollar (66)

Çeşitli apoptotik uyarılar, daha sonra hem BAX hem de BAK'ı aktive eden BH3 proteinlerinin yukarı regülasyonu ile sonuçlanmaktadır. BAX, bir tümör baskılayıcı gen olan Tümör Süpresör Protein 53 (p53) tarafından düzenlenmektedir. Aktive edildiğinde, BAX ve BAK oligomerize olmakta, bu da mitokondriyal dış membran geçirgenliğine (MOMP) yol açmaktadır. MOMP, içsel apoptozun tanımlayıcı olayıdır ve geri dönüşü olmayan nokta olarak kabul edilmektedir (64). MOMP ile; sitokrom-C, Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF), İkincil Mitokondri Türevi Kaspaz Aktivatörü/ Düşük PI ile Doğrudan IAP Bağlayıcı Protein (Smac/Diablo) ve Omi/yüksek sıcaklık gereksinimli protein A2 (Omi/HtrA2) sitoplazmaya salınmaktadır (66). Sitokrom-C, apoptozom üretmek için Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile birleşmektedir. Apoptozom, Kaspaz-9'u aktive eden, yedi kollu halka şeklinde çok proteinli bir komplekstir (62). Aktive edilen Kaspaz-9 enzimleri, cellat olarak da adlandırılan Kaspaz 3 ve 7'yi aktifleştirmektedir. Cellat kaspazlar, hücre ölümüne yol açan proteinleri hızla parçalamaya başlamaktadır. Hücre ölümünü sağlayan içsel apoptoza ek adımlar vardır. Omi, kaspaz fonksiyonunun endojen bir inhibitörü olan Apoptoz Proteinlerinin X'e Bağlı Protein İnhibitörü (XIAP)'nü inhibe etmektedir. Smac/Diablo, Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörü (IAP)'nü inhibe etmek için apoptoz sırasında salınmaktadır, böylece apoptozom oluşturulduktan sonra apoptoz ilerlemektedir (64).

Dışsal Apoptotik Yolak (Ölüm Reseptörü Yolağı)

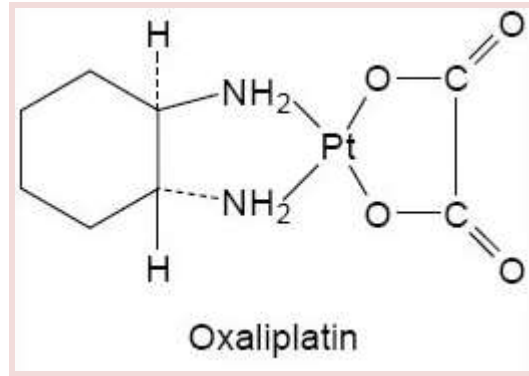
Hücrelerin çoğu sitoplazmik zarlarında ölüm reseptörlerine sahiptir. Bu reseptörler, Tümör Nekroz Faktörü Reseptör Süper Ailesi (TNFRSF)'ne aittir. Bu reseptörler ilgili ligandlar tarafından uyarıldığında kaspaz kaskadını aktive etmekte ve apoptozu indüklemektedir. Bu süper ailenin özelliği, hücre dışında zengin bir sistein alanının ve hücre içinde de ölüm alanının bulunmasıdır (65). Ölüm alanı yaklaşık 80 aminoasitten oluşmaktadır ve ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (67). En bilinen ölüm reseptörleri Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü (Fas), Tümör Nekroz Faktörü Reseptör Süper Ailesi 1 (TNFR1), Tümör Nekroz Faktörü Reseptör Süper Ailesi 2 (TNFR2), Ölüm Reseptörü 3 (DR3), Ölüm Reseptörü 4/TNF ile ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand Reseptörü 1 (DR4/TRAIL-R1), Ölüm Reseptörü 5/TNF ile ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand Reseptörü 2 (DR5/TRAIL-R2) ve Ölüm Reseptörü 6 (DR6)'dır (65).

Ölüm reseptörü kendi özel ligandları tarafından aktive edilmektedir. Böylece reseptör trimerizasyonu gerçekleşmekte ve reseptörün sitozolik bölgesinde ölüm kümesinin oluşmasına neden olan adaptör proteinler kullanılmaktadır ve buna bağlı olarak adaptör molekül, Fas ile İlişkili Ölüm Bölgesi (FADD), reseptöre bağlanabilmektedir. FADD'nin C-terminal ölüm alanı

(DD), DD-DD etkileşimleri yoluyla trimerize reseptöre bağlanmaktadır. FADD'nin N-terminal bölgesinde, Kaspaz 8 prodomaininde aynı bölgeye bağlanan ölüm efektör alanı (DED) bulunmaktadır. Bu protein kompleksi (ölüm reseptörü-ligand kompleksi, adaptör protein ve prokaspaz), Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi (DISC) olarak adlandırılmaktadır (65). Prokaspaz 8 ve 10, DISC tarafından aktifleştirilmektedir. Cellat kaspazlar 3, 6 ve 7 etkinleştirilince, proteinleri ve hücre iskeletini parçalamaya başlayarak hücre ölümüne neden olmaktadır (64).

OXALIPLATIN

Son 20 yılda, binlerce platin kompleksi sentezlenmiştir. Bunlar arasından çapraz direnç geliştirmeyen ve toksisitesi az olanlar seçilerek klinik deney sürecine geçilmiştir. Bir diaminosikloheksan (DACH) taşıyıcı ligand bazlı platin bileşiği olan Oxaliplatin (Şekil 9), bu özelliklerin her ikisine de sahiptir ve geniş bir antineoplastik aktivite spektrumu göstermektedir (68). Tam kimyasal adı, oxalato(trans-L-1,2-diaminosikloheksan) platin'dir; "ayrılan grup" oksalat ve DACH taşıyıcı ligandını ifade etmektedir. Sisplatinden farklı olarak plazmadaki Oxaliplatin, farmakokinetik profilini karmaşıklaştıran bir süreç olan oksalat grubunun yer değiştirmesi nedeniyle hızla enzimatik olmayan bir dönüşümle reaktif bileşiklere dönüşmektedir. Bileşiklerin çoğu farmakolojik olarak inaktif görünmektedir ancak dikloroplatin kompleksleri hücreye girerek sitotoksik özellik göstermektedirler (69).



Şekil 9. Oxaliplatin'in kimyasal yapısı (68)

Oxaliplatin'in kesin etki mekanizması belirsizliğini korusa da, platin bileşiklerinin sitotoksitesinin DNA sentezinin inhibisyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır. Başlıca sitotoksik lezyonlar, aktif platin türleri ile spesifik baz dizileri, özellikle iki bitişik guanin rezidüsü veya iki bitişik guanin-adenin bazı arasında, çapraz bağlanmayla oluşturulan iplik içi platin-DNA eklentileridir. Oxaliplatin tarafından oluşturulan eklentilerin tipi ve yeri, diğer platin

bileşikleri ile oluşturulanlarla aynı görünmektedir. Bununla birlikte, Cisplatin ve Carboplatin tarafından oluşturulan cis-diamin-platin eklentileri ile karşılaştırıldığında, Oxaliplatin'in DACH-platin eklentilerinin daha güçlü bir şekilde DNA sentezi inhibisyonu oluşturduğu ve sitotoksosite yarattığı belirlenmiştir. Oxaliplatin'in büyük DACH taşıyıcı ligandının, bu gelişmiş aktiviteye ve Oxaliplatin ve Cisplatin arasında çapraz direnç olmamasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. DACH ligandı, yanlış eşleşme onarım enzim kompleksi gibi spesifik hasar onarım proteinlerinin bağlanmasını önleyerek veya azaltarak DNA onarımını da engelleyebilmektedir, böylece platin-DNA eklentilerinin replikatif bypassını azaltabilmektedir (68).

Oxaliplatin, *in vitro* ve *in vivo* olarak çok çeşitli insan tümörlerinde geniş bir aktivite spektrumu göstermiştir. Oxaliplatin ayrıca güvenli bir toksisite profili sergilemekte ve çeşitli klinik durumlarda daha az toksik olması ve Cisplatin'e dirençli tümörlere karşı aktivitesini koruma özelliği ile Cisplatin'den üstündür (5).

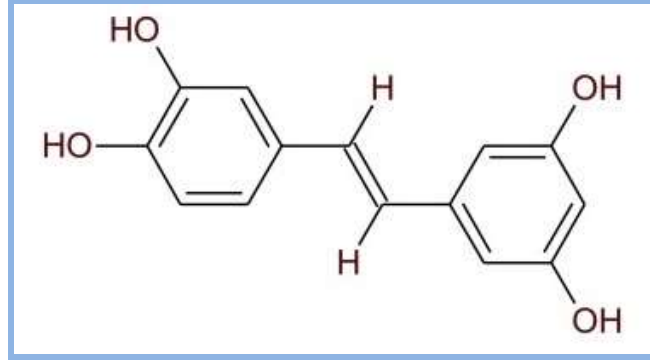
Droz ve ark. (70) tek başına veya 5-Florourasil ile kombinasyon halinde Oxaliplatin almak üzere randomize edilmiş, 54 kastrasyona dirençli prostat kanserli hastada bir faz II çalışması gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda Oxaliplatin'in kastrasyona dirençli prostat kanserinde aktif bir ajan olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür.

PICEATANNOL

Piceatannol (trans-3,3',4',5-tetrahidroksistilben) fenolik bir bileşiktir (stilbenoid) ve resveratrol'ün hidroksillenmiş bir analogudur (11) (Şekil 10). İlk olarak *Euphorbia lagascae*'den izole edilen Piceatannol'ün diğer kaynaklarından bazıları üzüm, çarkıfelek meyvesi (*Passiflora edulis*) ve beyaz çay ağacı (*Melaleuca leucadendron*)'dır (71). Üzüm ve şaraplardaki Piceatannol seviyesi resveratrol'den daha düşük olduğu için resveratrol ile karşılaştırıldığında çok daha az araştırmaya konu olmuştur (11).

Piceatannol; hücre döngüsü durdurma, antioksidan, pro-apoptotik, anti-inflamatuar, anti-anjiyojenik ve anti-metastatik etkileri sayesinde kanser önleyici özelliindedir (14). Yapılan çalışmalar Piceatannol'ün mesane, prostat, kolorektal ve melanom gibi çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılabilmesini göstermektedir (72). Pro-apoptotik proteinlerin seviyelerini yükselterek, anti-apoptotik proteinlerin seviyelerini düşürerek ve Protein Kinaz B/ Mammalian Target of Rapamycin (AKT/mTOR), NF-κB ve JAK-STAT3 sinyal yollarını düzenleyerek hem içsel hem dışsal apoptotik yollarla apoptozu indüklemektedir. Ayrıca, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) fosforilasyonunun veya EGFR ekspresyonunun baskılanmasıyla EGFR sinyal yolunun modülasyonu yoluyla antikanser potansiyelini göstermektedir. Bunun

yanında antidiyabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, anti-obeze ve anti-alerjik gibi hastalıkları önleyici ve sağlığı geliştirici işlevleri çalışılmaktadır (11).



Şekil 10. Piceatannol'ün kimyasal yapısı (11)

Piceatannol'ün antioksidan aktivitesi, stilben halkarındaki hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır. Lipid peroksil radikallerini etkili bir şekilde süpürmektedir. Antioksidan aktivitesi, B16 melanom hücrelerinde melanin üretimini baskılama yeteneği ile kanıtlanmıştır (73).

Biyolojik bileşiklerin çoğu, biyoyararlanımını azaltan zayıf absorpsiyon, dağılım, hızlı metabolizma ve atılıma sahiptir. Bir bileşiğin aktivitesini göstermesi için, fizyolojik olarak ilgili minimum konsantrasyonu gereklidir. Piceatannol'ün biyoyararlanımını anlamak için bugüne kadar herhangi bir klinik çalışma yapılmamış olsa da, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda biyoyararlanımının zayıf olması nedeni ile yapısını değiştirerek veya nanopartikül ve lipid kompleksleri sentezleyerek Piceatannol'ün farmakokinetiğini ve biyoyararlanımını geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır (11).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın deneyleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Deneyler sırasında kullanılan cihazlar Tablo 3'te ve kullanılan malzemeler Tablo 4'te verildi.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Malzeme	Marka	Ülke
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus	Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heal Force	Çin
Santrifüj	Centurion Scientific	İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon	Japonya
Otomatik Pipet Seti	RAININ	Almanya
Dijital Pipetör	Thermo Fisher Scientific	ABD
Serolojik Pipet Tabancası	RAININ	Almanya
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific	ABD
Mini Santrifüj	Daihan Scientific	Kore
Soğutmalı Santrifüj	Hettich	Almanya
Nanodrop	Optizen	Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems	ABD
Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	Applied Biosystems	ABD
Vorteks	WiseMix	Kore
Karıştırıcı Blok	Bioer	Çin
Çalkalayıcı	Wisemix	Kore

Tablo 3 Devam. Çalışmada kullanılan cihazlar

Malzeme	Marka	Ülke
Elektronik Tartı	A&D Company	Japonya
4°C Buzdolabı	Vestel	Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	Vestel	Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	Wisd	Kore
Distile-Ultra Saf Su Cihazı	TKA	ABD
Tissue Lyser LT	Qiagen	Almanya
Mini Jel Tankı	Invitrogen	ABD
Güç Kaynağı	Cleaver	İngiltere
Blotlama Cihazı iBlot2	Invitrogen	ABD
Micro ChemiDoc Jel Görüntüleme	Dnr Bioimaging Systems	İsrail

Tablo 4. Çalışmada kullanılan malzemeler

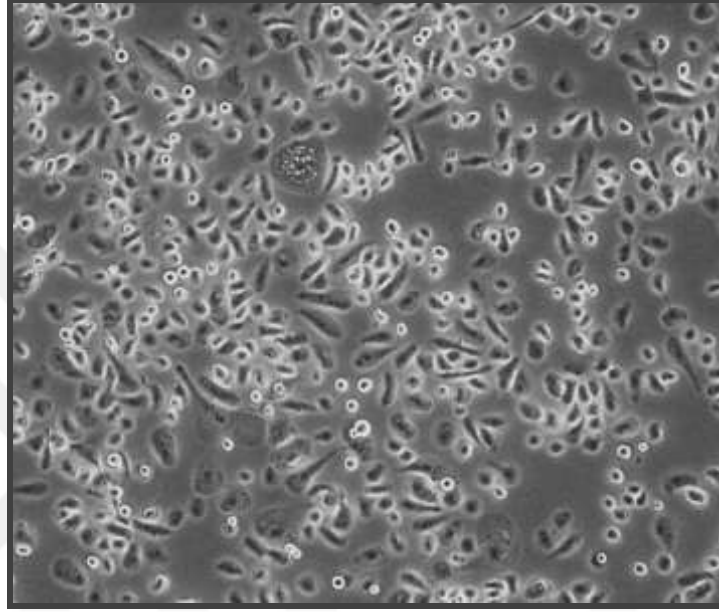
Malzeme	Marka	Ülke
Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)/F-12 50/50 MIX %0.25 Tripsin EDTA	Wisent Bioproducts	Kanada
Penisilin/Streptomisin	Gibco	ABD
Fetal Sığır Serumu	Gibco	ABD
Etanol	Merck	ABD
Dimetil Sülfoksit	Merck	ABD
MTT (3-(4,5-dimetitiazol-2-yl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromid)	Gold Biotechnology	ABD
DPBS	Diagnovum	Almanya
Dnaz/Rnaz İçermeyen Su	Invitrogen	ABD
Ploxal-S (Oxaliplatin)	Koçak Farma	Türkiye
Piceatannol	Acros Organics	ABD
25-75 cm ² 'lik Hücre Kültür Flaskı	Nest	ABD
96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakası	Nest	ABD
384 Kuyucuklu PCR Reaksiyon Plakası	Applied Biosystems	ABD
5-10 ml'lik Serolojik Pipet	Nest	ABD
Kriyojenik Vial	Corning	Meksika
0,2 ml'lik PCR Strip Tüpleri	Axygen	Meksika
15-50 ml'lik Falkon Tüpler	Nest	ABD
1.5 ve 2 ml'lik Tüpler	Eppendorf	Almanya

Tablo 4 Devam. Çalışmada kullanılan malzemeler

Malzeme	Marka	Ülke
RNA İzolasyon Kiti	Life Technologies	ABD
cDNA Revers Transkripsiyon Kiti	Applied Biosystems	ABD
BrightGreen 2X qPCR Master Mix-Low Rox	abm	Kanada
Western Blot Kiti	Life Technologies	ABD
WesternBreeze Chemiluminescent Kit	Invitrogen	ABD
iBlot2 NC Regular Stacks Kit	Invitrogen	ABD
20X MES Yürütme Tamponu	Life Technologies	ABD
Bolt 4-12 % Bis-Tris Plus Jel	Invitrogen	ABD
Seeblue Plus 2 Prestained	Invitrogen	ABD
MagicMark XP	Invitrogen	ABD
Bolt LDS Sample Buffer (4X)	Life Technologies	ABD
Bolt Sample Reducing Agent (10X)	Life Technologies	ABD
Anti-TGF beta1 Antibody (Y058105)	abm	Kanada
Anti-TGFβ RII Antibody (Y413545)	abm	Kanada
Anti-SMAD2 Antibody (Y400093)	abm	Kanada
Smad3 Antibody (NB100-56479)	Novus Biologicals	ABD
Phospho-SMAD2/3 (Thr8)	Elabscience	ABD
Polyclonal Antibody (E-AB-21040)		
Jak2 Antibody (53B7) (NBP2-59451)	Novus Biologicals	ABD
Jak2 [p Tyr1007, p Tyr1008] Antibody (SY24-03) (NBP2-67429)	Novus Biologicals	ABD
STAT3 Antibody (9D8) (NBP2-22471)	Novus Biologicals	ABD
STAT3 [p-Tyr705] Antibody (NBP2-24463)	Novus Biologicals	ABD
beta Actin Monoclonal Antibody (15G5A11/E2) (MA1-140)	Thermo Fisher Scientific	ABD
beta-Actin Antibody (nb600-503)	Novus Biologicals	ABD
Steril Eldiven	Dolphin	Türkiye
Cam Malzemeler	Lamtek	Türkiye
0.2 mm Çapında İnce Bilye	Next Advance	ABD

HÜCRE HATTI

Çalışmada Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'ndan temin edilen insan prostat kanseri hücre hattı PC-3 (ATCC® CRL-1435™) kullanıldı (Şekil 11). PC-3, 62 yaşındaki Kafkas bir erkeğin 4. derece prostat adenokarsinomunun kemik metastazından köken alan bir hücre hattıdır (74).



Şekil 11. PC-3 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X)

HÜCRELERİN KÜLTÜRE ALINMASI, PASAJLANMASI VE SAKLANMASI

Hücre Besiyerinin Hazırlanması

PC-3 hücreleri; %5 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren DMEM/F12 besiyerinde kültüre alındı. Hazırlanan besiyeri, kontaminasyonu önlemek için 50 ml hacimli falkon tüplere bölünerek 4°C buzdolabında saklandı.

Donmuş Hücrelerin Kültüre Alınması

Çalışma boyunca hücrelerle, hücre kültürü laboratuvarında bulunan laminar kabin içinde çalışıldı. Donmuş hücrelerin kültüre alınması için ilk olarak, -80°C derin dondurucuda bekleyen PC-3 hücreleri 37°C'de çözündürüldü. Hücreler, önceden etüvde bekletilerek sıcaklığı 37°C'ye getirilen 12 ml besiyerine eklendi. Tüp içerisinde bulunan hücreler, yavaşça alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra serolojik pipet yardımıyla 75 cm²'lik (T75) flasklara ekildi. Hücre ekimi yapılan flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren steril inkübatörde kültüre alındı.

Hücreler birkaç saat sonra flask tabanına tutunduğunda, dondurulma işleminde kullanılan Dimetil Sülfoksit (DMSO)'in ortamdan uzaklaştırılması için flasktaki besiyeri değiştirildi. Hücrelerin durumu belirli aralıklarla invert mikroskopta kontrol edildi.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler flask tabanını kapladığında, devamlılığın sağlanabilmesi için pasaj yapıldı. Flask kabin içine alındıktan sonra, içindeki besiyeri döküldü. Flask tabanı bir miktar fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Ardından flaska 37°C sıcaklıktaki Tripsin-EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit) eklendi. Hücreler, flask yüzeyinden kalkmaları için etüvde 5 dk inkübe edildi. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen kalkmasının ardından hücreler serolojik pipetle yavaş bir şekilde besiyerine eklendi. Hücre-besiyeri karışımı iyice karıştırıldıktan sonra yeni bir flaska ekildi. Hücreler, invert mikroskopta yoğunluğu kontrol edildikten sonra, 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin Dondurulması

Çalışmada kullanılan PC-3 hücre hattı, ihtiyaç duyulduğunda tekrar kullanabilmek amacı ile donduruldu. Dondurma işlemi yapılacak hücreler yeterli yoğunluğa ulaşıp T75 flaskın tabanını kapladığı zaman flasktaki besiyeri boşaltıldıktan sonra, tabana yapışık haldeki hücreler PBS ile yıkandı ve flaska 37°C sıcaklıktaki Tripsin-EDTA eklendi. Etüve kaldırılan flask, hücreler yüzeyden kalkana kadar 5 dk inkübe edildi. Tamamen yüzeyden kalkan hücreler 1250 rpm'de 1:30 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra elde edilen hücre pelletinin üzerine %5 DMSO içeren besiyeri eklendi ve homojen hale gelen hücreler kriyojenik tüplere eşit bir şekilde bölünerek -80°C'de saklanmak üzere derin dondurucuya kaldırıldı.

İLAÇ DOZLARININ BELİRLENMESİ

İlaç Stoklarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan, etken maddesi Oxaliptatin olan Ploxal-S (Koçak Farma, Türkiye) sıvı halde 50 mg/10 ml (12,58 mM) konsantrasyonda temin edildi, oda sıcaklığında saklandı.

Piceatannol (Acros Organics, ABD) toz halde temin edildi ve 4°C'de saklandı. Moleküler ağırlığı 244,24 g/mol olan Piceatannol'den 20 mM stok solüsyonu hazırlamak için

hassas terazide 24,42 mg tartıldı, üzerine çözücü olarak 5 ml DMSO eklendi. Vortekslenerek homojen hale getirilen ana stok, 1,5 ml hacimli tüplere porsiyonlanarak -20°C’de muhafaza edildi.

Hücrelere yapılacak uygulamalarda Oxaliplatin’i seyreltmek için %5 Etanol, Piceatannol’ü seyreltmek için %5 Etanol, %5 DMSO (pH:3) karışımı hazırlandı ve her ikisi de 4°C’de saklandı.

MTT Hücre Canlılık Testi

Çalışmada kullanılacak olan Oxaliplatin ve Piceatannol’ün PC-3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi MTT Hücre Canlılık Testi ile belirlendi.

Hücreler daha önce anlatıldığı gibi tripsin ile kaldırıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her bir kuyucuğunda ~10.000 hücre olacak şekilde çoklu dijital pipetle 90 µl ekim yapıldı. Hücreler, plakaya yapışması için gece boyu inkübasyona bırakıldı ve ertesi sabah ilaç uygulamaları yapıldı. 96 kuyucuklu plakanın dış tarafındaki kuyucuklar uygulama dışı bırakıldı. Her bir doz 6 kuyucuğa denk gelecek şekilde 10 µl ilaç uygulandı. Kontrol grubuna sadece ilaçların taşıt maddeleri uygulandı.

Oxaliplatin %5 Etanol ile, hücrelere uygulandığında her kuyucukta %0,5 Etanol olmasına dikkat edilerek, son konsantrasyonları 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM olacak şekilde hazırlandı.

Piceatannol, %100 DMSO ile hazırlanan 20 mM’lık ana stoktan %5 Etanol, %5 DMSO (pH:3) karışımı ile, hücrelere uygulandığında her kuyucukta %0,5 Etanol, %1 DMSO olmasına dikkat edilerek, son konsantrasyonları 120 µM, 100 µM, 80 µM, 60 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 1 µM olacak şekilde hazırlandı.

İlaç uygulamalarından 24, 48 ve 72 saat sonra 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi. Plakalar 4 saat inkübasyona bırakıldı ve sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 180 µl DMSO eklendi. Formazan kristallerinin DMSO’da çözünmesi için plakalar 1 saat etüvde inkübe edildi. Ardından, her bir kuyucuğun 492 nm dalga boyundaki absorbans değerleri mikropilaka okuyucu cihaz (Multiskan GO) ile belirlendi. Belirlenen absorbans değerlerine göre her grubun % canlılıkları ve hücrelerin %50’sinin canlı kaldığı doz (IC₅₀) değerleri SPSS 20 istatistik paket program ile probit analizi kullanılarak hesaplandı.

UYGULAMA GRUPLARI

Tez çalışmasında kullanılacak olan uygulama grupları MTT Hücre Canlılık Testi'ne göre belirlendi ve uygulama grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu. Bundan sonraki çalışmaların tümünde belirlenen IC₅₀ değerleri ile 48 saatlik uygulamalar yapıldı.

- 1. Grup:** Kontrol (%0,3 DMSO)
- 2. Grup:** 64 µM Oxaliplatin
- 3. Grup:** 57 µM Piceatannol
- 4. Grup:** 64 µM Oxaliplatin + 57 µM Piceatannol

RNA İZOLASYONU ve cDNA SENTEZİ

RNA İzolasyonu

Her uygulama grubu için birer T75 flaska PC-3 hücreleri ekildi ve hücreler inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah invert mikroskopta hücrelerin durumu ve yoğunluğu kontrol edildikten sonra ilaç uygulamaları yapıldı. Flastaki besiyeri ilaçlı besiyeri ile değiştirildi. Uygulama yapılan hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda hücrelerin durumu kontrol edildi ve RNA izolasyonu için toplandı. Flask kabin içine alındı ve ilaçlı besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve 2 ml'lik tüplere bölünerek ve 2.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti izolasyon yapılincaya kadar -80°C'de bekletildi ve donmuş hücre pelletlerinden RNA izolasyonu PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences, USA) ile kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki şekilde yapıldı.

Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen hücre pelleti üzerine 0.2 mm çapında ince bilye (Next Advance, USA) konuldu ve doku parçalayıcı ile 1 dk 50 rpm'de parçalama yapıldı. Parçalanmış hücrelerin üzerine 350 µl %1 (2)-merkaptoetanol içeren lizis tamponu eklendi ve doku parçalayıcı ile tekrar parçalandı. Ardından tüpler çalkalayıcı blokta 24°C, 400 rpm'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücre lizatının üzerine 350 µl %70 etanol eklendi ve vakit kaybetmeden vorteksledi. Elde edilen homojen karışım, kit içerisinde bulunan spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra yıkama aşamasına geçildi. Bu aşamada 700 µl birinci yıkama tamponu eklenen spin kolon, oda sıcaklığında 12.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve altta kalan sıvı boşaltıldı. 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenen kolon ve oda sıcaklığında 12.000g'de 30 saniye santrifüj

edildi, santrifüj sonrası atık boşaltıldı (bu adım 2 kez tekrarlandı). Kolon, kurutma aşaması için boş bir şekilde 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve 1,5 ml hacminde tüp içerisine yerleştirildi. Kolonun tam ortasına 50 µl DNaz-RNaz içermeyen su pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra, 24°C 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüp içerisinde bulunan RNA'ların miktarları ve saflıkları Optizen Nano Q (Mecasys, Korea) ile ng/µl cinsinden ölçüldü. RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

cDNA Sentezi

PC-3 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Sentez Kiti (Invitrogen; USA) ile kit protokolüne uygun olarak yapıldı. İzole edilen RNA'lar, DNA/RNA içermeyen ultra saf su ile her bir reaksiyona 1000 ng konulacak şekilde eşitlendi. Soğuk blok içerisine yerleştirilen 200 µl'lik PCR tüplerine eşitlenen örneklerden 10 µl pipetlendi ve her bir örneğin üzerine Tablo 5'te verilen cDNA karışımından 10 µl eklendi. Tüpler PCR cihazına (Applied Biosystems® ProFlex™ PCR System, ABD) yerleştirildi ve Tablo 6'da verilen koşullarda sentezleme işlemi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 5. cDNA sentezi için gereken malzemeler ve miktarları (1 reaksiyon için)

Malzeme	Miktar
10X Ters Transkripsiyon Tamponu	2 µl
25X dNTP karışımı (100mM)	0,8 µl
10X Ters Transkripsiyon Rastgele Primerleri	2 µl
Multi Scribe™ Ters Transkriptaz	1 µl
Nükleaz İçermeyen H ₂ O	4,2 µl
Toplam	10 µl

Tablo 6. cDNA sentezi PCR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
25 °C	10 dakika	1
37 °C	3 dakika	40
85 °C	5 dakika	1
4 °C	∞	

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR)

PC-3 hücre hattında Kontrol, Oxaliptatin, Piceatannol ve Oxaliptatin+Piceatannol gruplarında, araştırılan sinyal yollarına ait genlerin ekspresyon seviyeleri Tablo 7’de verilen primerler kullanılarak qRT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Tablo 7. qRT-PCR için kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer		Baz Dizisi (5' → 3')
Jak/STAT Sinyal Yolağı		
IL6	İnterlökin 6	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAG R: AGAGCCCTCAGGCTGGACTG
IL6R	İnterlökin 6 Reseptör	F: ATTGCCATTGTTCTGAGGT R: TAGTCTGTATTGCTGATGTC
JAK1	Janus Kinaz 1	F: ACAATTGGCATTTCATTTTCCTG R: CCTGGGCCCAAACCTTCCTA
JAK2	Janus Kinaz 2	F: CAGTGGTCAAGAGGGAAACA R: TGTCTGAGCGAACAGTTTCC
STAT3	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3	F: GGAGGAGTTGCAGCAAAAAG R: TGTGTTTGTGCCCAGAATGT
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü	F: GCCAAGGCACGAGTAACAAGC R: AGGGCAATGAGGACATAACC
TGF-β Sinyal Yolağı		
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta	F: GGCCAGATCCTGTCCAAGC R: GTGGGTTTCCACCATTAGCAC
TGFβ-R2	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü 2	F: GTAGCTCTGATGAGTGCAATGAC R: CAGATATGGCAACTCCCAGTG
SMAD2	SMAD Ailesi Üyesi 2	F: CGTCCATCTTGCCATTCACG R: CTCAAGCTCATCTAATCGTCCTG
SMAD3	SMAD Ailesi Üyesi 3	F: TGGACGCAGGTTCTCCAAAC R: CCGGCTCGCAGTAGGTAAC

Tablo 7 Devam. qRT-PCR için kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer		Baz Dizisi (5' → 3')
Apoptoz Sinyal Yolağı		
P53	Tümör Süpresör Protein 53	F: CACGAGCGCTGCTCAGATAGC R: ACAGGCACAAACACGCACAAA
BCL2	B Hücreli Lenfoma-2	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: ACAGTTCCACAAAGGCATCC
BAX	BCL2 ilişkili X protein	F: ATGGACGGGTCCGGGGAG R: TCAGCCCATCTTCTTCCA
Kaspaz 3	Apoptoz ilişkili sistein peptidaz 3	F: AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC R: GCTGCTTCTCTTTGCTGAA
Kaspaz 8	Apoptoz ilişkili sistein peptidaz 8	F: AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC R: GCTGCTTCTCTTTGCTGAA
Endojen Kontrol		
β-actin	Beta-Aktin	F: GTCCACCGCAAATGCTTCTA R: TGCTGTCACCTTCACCGTTC
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz	F: CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT R: AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC
18S	18S	F: CGCTTCCTTACCTGGTTGAT R: GAGCGACCAAAGGAACCATA

*F: Forward, R: Reverse

“RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi” bölümünde anlatıldığı şekilde elde edilen cDNA’lar BrightGreen 2X qPCR MasterMix-Low ROX (abm, Kanada) ile kit protokolüne uygun olarak, seçilen spesifik primerler ile çoğaltıldı. Her bir primer 2 µM forward ve 2 µM reverse primer içerecek şekilde nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı. Hazırlanan primer karışımından 384 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna dijital çoklu pipetle 6 µl pipetlendi. Her bir reaksiyon için 0,3 µl cDNA ve 5,7 µl master mix içeren karışım pcr tüplerinde hazırlandı ve dijital çoklu pipetle primerlerin üzerine 6 µl pipetlendi. Çoğaltma işlemi QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (384-Well Block) (Applied Biosystems, ABD) cihazında Tablo 8’de verilen PCR koşullarında gerçekleştirildi.

qRT-PCR sonucunda elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak, endojen kontrol ile normalize edilip kontrolle kıyaslanarak ifade edildi.

Tablo 8. qRT-PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Enzim Aktivasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	48
Primer Bağlanması ve Zincirin Uzaması	60 °C	1 dakika	
Erime Eğrisi	95 °C	15 saniye	1
	60 °C	1 dakika	
	95 °C	15 saniye	

WESTERN BLOT PROTEİN ANALİZLERİ

Protein İzolasyonu

Kontrol ve uygulama gruplarının her biri için birer T75 flaska hücreler ekildi ve hücreler flask tabanına yapıştıktan sonra ilaç uygulamaları yapıldı. Flastaki besiyeri dökülerek ilaçlı besiyeri ile değiştirildi. Uygulama yapılan hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kontrol edilen hücreler protein izolasyonu için toplandı. Flask kabin içine alındı ve ilaçlı besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile kaldırılarak 2.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti analizler yapılncaya kadar -80°C derin dondurucuda bekletildi. İzolasyon sırasında soğuk zinciri kırmamaya özen gösterildi.

Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen hücre pelletinden protein izolasyonu için ilk olarak lizis tamponu hazırlandı. Bunun için her 1 ml RIPA lizis tamponuna 10 µl Fenil Metil Sülfonil Florid (PMSF) Solüsyonu, 10 µl Sodyum Ortovanadat Solüsyonu, 10 µl Proteaz İnhibitörü eklendi ve izolasyonda kullanılana kadar 4°C’de saklandı. Doku parçalayıcı cihazın başlığı deneyden önce -20°C’de soğutuldu. -80°C’den çıkarılan hücre pelletlerine 0.2 mm çapında ince bilye (Next Advance, ABD) konuldu ve doku parçalayıcıda 1 dk 50 rpm’de parçalama yapıldı. Daha sonra tüplere 350 µl RIPA lizis tamponu eklendi ve hücreler doku parçalayıcıda 50 rpm’de 1 dakika parçalandı, bu adım 2 kez tekrar edildi. Bu aşamadan sonra tüpler çalkalayıcı blokta 4°C 350 rpm’de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyondan

sonra hücre lizatları 4°C 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni 1,5 ml hacminde tüplere alındı ve protein miktarları Optizen Nano Q (Mecasys, Korea) ile mg/ml cinsinden ölçüldü. İzole edilen proteinler kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Denatürasyon

İzole edilen proteinler nükleaz içermeyen su ile eşitlendi. PCR tüplerine eşitlenen protein örneklerinden 40 µl, LDS Sample Buffer (4X) Bolt™'tan 16 µl, Sample Reducing Agent (10X) Bolt™'tan 6,5 µl pipetlendi. İyice vortekslenen karışım PCR cihazında 80°C'de 12 dakika denatüre edildi. Örnekler denatürasyondan sonra soğutuldu ve diğer aşamaya geçildi.

Jele Yükleme ve Elektroforez

1X Yürütme Tamponu hazırlamak için 50 ml 20X MES Running Buffer, deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Elektroforez tankı hazırlanan yürütme tamponu ile dolduruldu. Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus jeller paketten çıkarıldı, tarakların kuyucuklara zarar vermeden jelden ayrılması sağlandı ve jeller arkalarındaki bantlar çıkarıldıktan sonra tanka yerleştirildi. Jellerin ilk kuyucuklarına 7 µl Magic Marker XP, 6. Kuyucuklarına 5 µl See Blue Plus 2, kalan kuyucuklara da sırasıyla 12 µl protein örneği yüklendi. Tank, güç kaynağına bağlandı ve örnekler 80 Volt'ta yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

Jelden Membrana Aktarma

Yürütme işlemi bitince jel kasetleri tanktan alındı ve spatula yardımı ile yanlarından dikkatlice açıldı. Kesilen jel, kurumaması için saf su bulunan kabın içine alındı ve yavaş hareketlerle kasetten ayrılarak iBlot® 2 NC Regular Bottom Stack üzerine konuldu. Bottom Stack cihaza yerleştirildi, jellerin üzerine ıslatılan filtre kağıdı konuldu ve rulo ile üzerinden geçerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Filtre kağıdının üzerine iBlot® 2 NC Regular Top Stack yerleştirildi, tekrar rulo ile geçildi ve üst kısmına iBlot® 2- Absorbent Pad yerleştirildikten sonra cihazın kapağı kapatılarak 20 Volt 7 dk programında aktarma işlemi gerçekleştirildi. Aktarma işlemi bittikten sonra membran belirlenen yerlerden kesildi ve kurumaması için hemen su dolu kaplara alındı.

Blotlama ve Birincil Antikor Bağlanması

Blocking Solution 28 ml ultra saf su, 8 ml Blocking Diluent Past A ve 4 ml Blocking Diluent Past B karıştırılarak hazırlandı. Membranların bulunduğu kaptaki su boşaltıldı ve membran yüzeyini kaplayacak şekilde 10 ml Blocking Solution eklendi. Membranlar 1 saat boyunca çalkalayıcıda 250 rpm'de çalkalanmaya bırakıldı ve sürenin sonunda Blocking Solution tüplere toplandı. Ultra saf su ile 5 dk yıkanan membranların üzerine birincil antikorlar eklendi. Çalışmada kullanılan TGF beta1, TGFβ RII, p-SMAD2/3, SMAD2, SMAD3 1:550; JAK2, fosforile-JAK2 (p-JAK2), STAT3, fosforile-STAT3 (p-STAT3) 1:600; β-aktin antikoruna ise 1:120000 oranlarında Blocking Solution ile seyreltilerek hazırlandı. Membranlar bir gece boyunca 4°C karanlık inkübatörde, çalkalayıcı üzerinde 250 rpm'de inkübe edildi. Ertesi sabah yıkama ve ikincil antikor bağlanması aşamasına geçildi.

Yıkama ve İkincil Antikor Bağlanması

Yıkama solüsyonu, 20 ml Antibody Wash Solution (16X) ile 300 ml ultra saf su karıştırılarak hazırlandı. Birincil antikorlar tüplere toplandı ve -20°C dondurucuda muhafaza edildi. Membranlar 3 kez yıkama solüsyonuyla 1 kez de ultra saf su ile 250 rpm'de 5'er dk yıkandı. Su boşaltıldıktan sonra membranların üzerine ikincil antikorlar eklendi ve membranlar 4°C karanlık inkübatörde 1 saat 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda ikincil antikorlar tüplere toplandı ve membranlar 3 kez yıkama solüsyonuyla 1 kez de ultra saf su ile yıkandı.

Kemilüminesans Bağlanması ve Görüntüleme

Protein ifadelerinin belirlenmesi için uygun antikorlar ile muamele edilen membranların her biri için 2,375 ml Chemiluminescen Substrat ve 0,125 ml Enhancers karışımı hazırlanarak karanlıkta 4°C'de bekletildi. Membran, karanlık ortamda görüntüleme cihazının tablasına yerleştirildi. Kemilüminesans solüsyonu membranın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde pipetle ve 4 dakika inkübe edildikten sonra Micro ChemiDoc jel görüntüleme cihazı ile görüntüleme gerçekleştirildi.

İSTATİKSEL ANALİZLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalar, Trakya Üniversitesi lisanslı SPSS 20 (IBM, ABD) programı ile analiz edildi. MTT Hücre Canlılık Testi sonucunda IC₅₀ değerleri "Probit" analizi ile; Western Blot analizinde yazılım ile elde edilen değerler, qRT-PCR'da 2^{-ΔΔCt} yöntemi ile

belirlenen gen ifadesi değerlerinin ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile; gruplar arasındaki farklılar “Bağımsız Gruplar t-Testi” ile belirlendi. Elde edilen veriler $p \leq 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



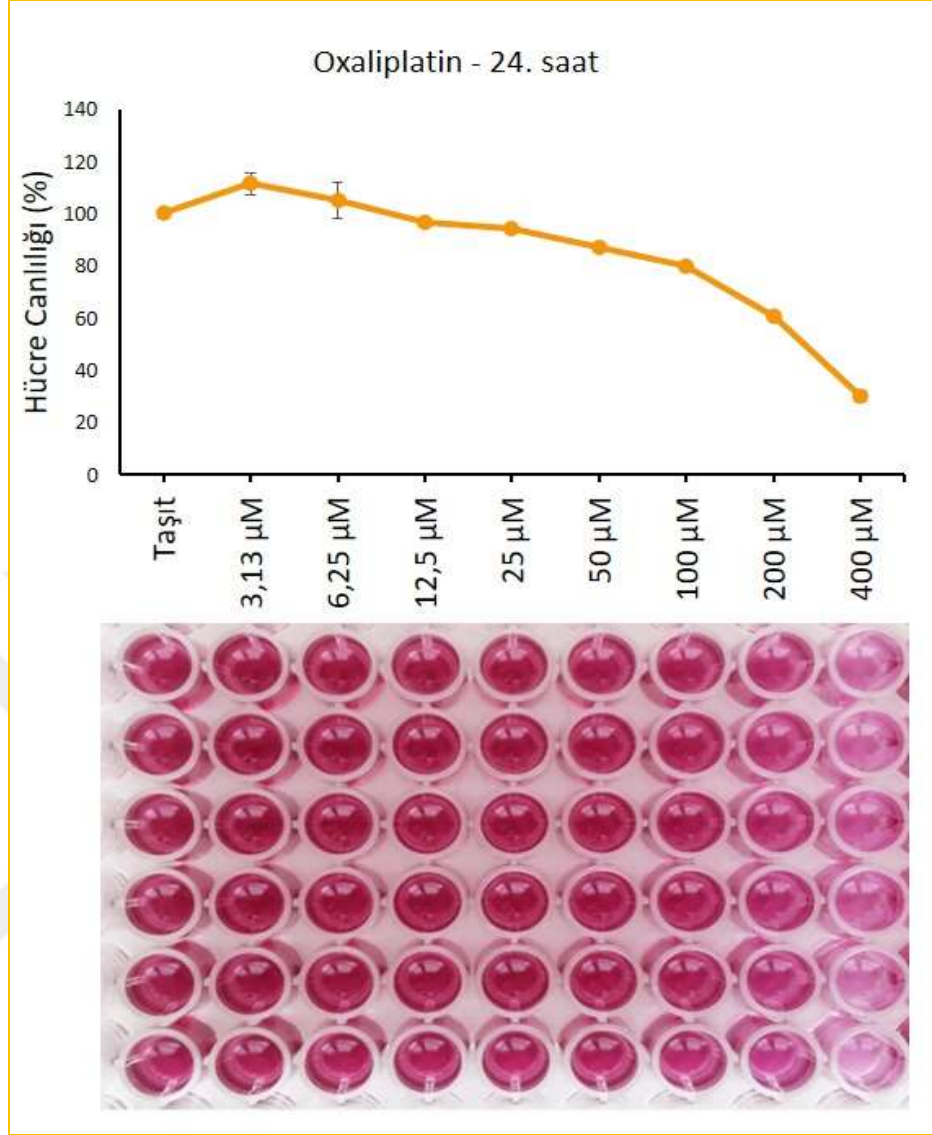
BULGULAR

MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ

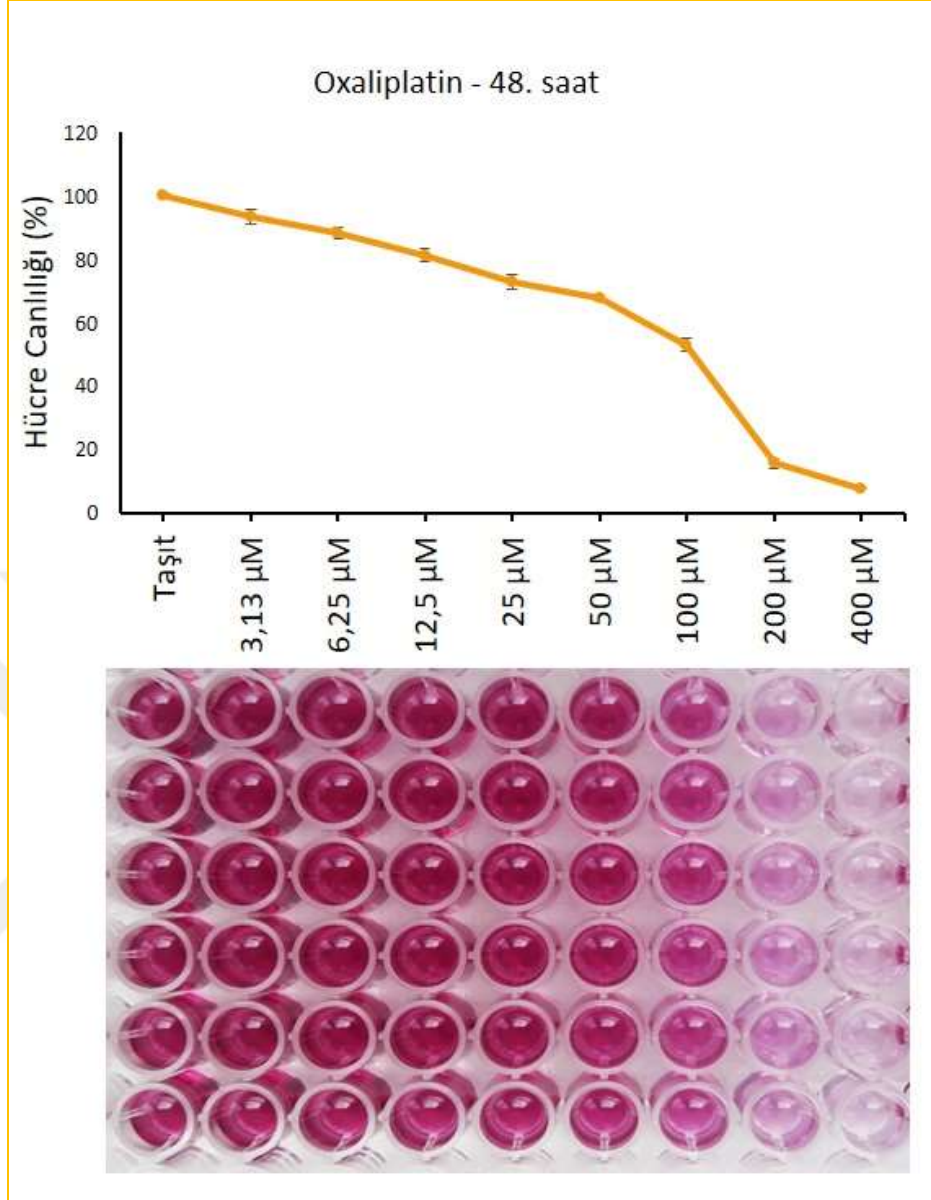
Oxaliplatin

Çalışmamızda insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında platin bazlı kemoterapötik bir ajan olan oxaliplatinin, doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi 24, 48 ve 72 saatlik MTT testleri ile belirlendi.

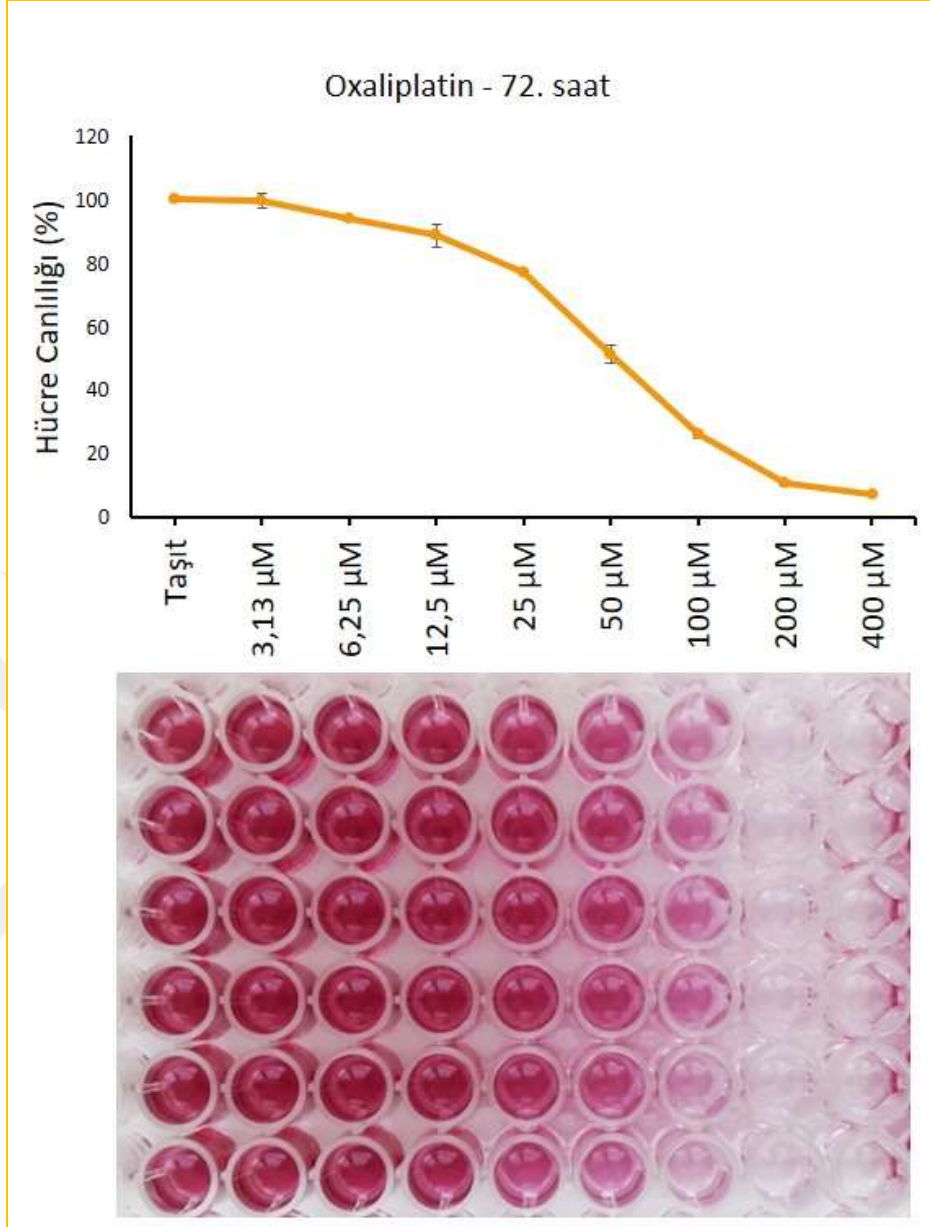
Oxaliplatin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaların tümünde hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmasına neden oldu ($p<0.001$). En yüksek uygulama dozu olan 400 μM konsantrasyonda hücre canlılığının 24 saat sonunda %30 (Şekil 12), 48 saat sonunda %8 (Şekil 13) ve 72 saat sonunda %7 (Şekil 14) olduğu saptandı. Probit analizi ile hesaplanan IC_{50} değerleri ise 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar için sırasıyla 250 μM , 64 μM ve 51 μM olarak belirlendi (Şekil 15).



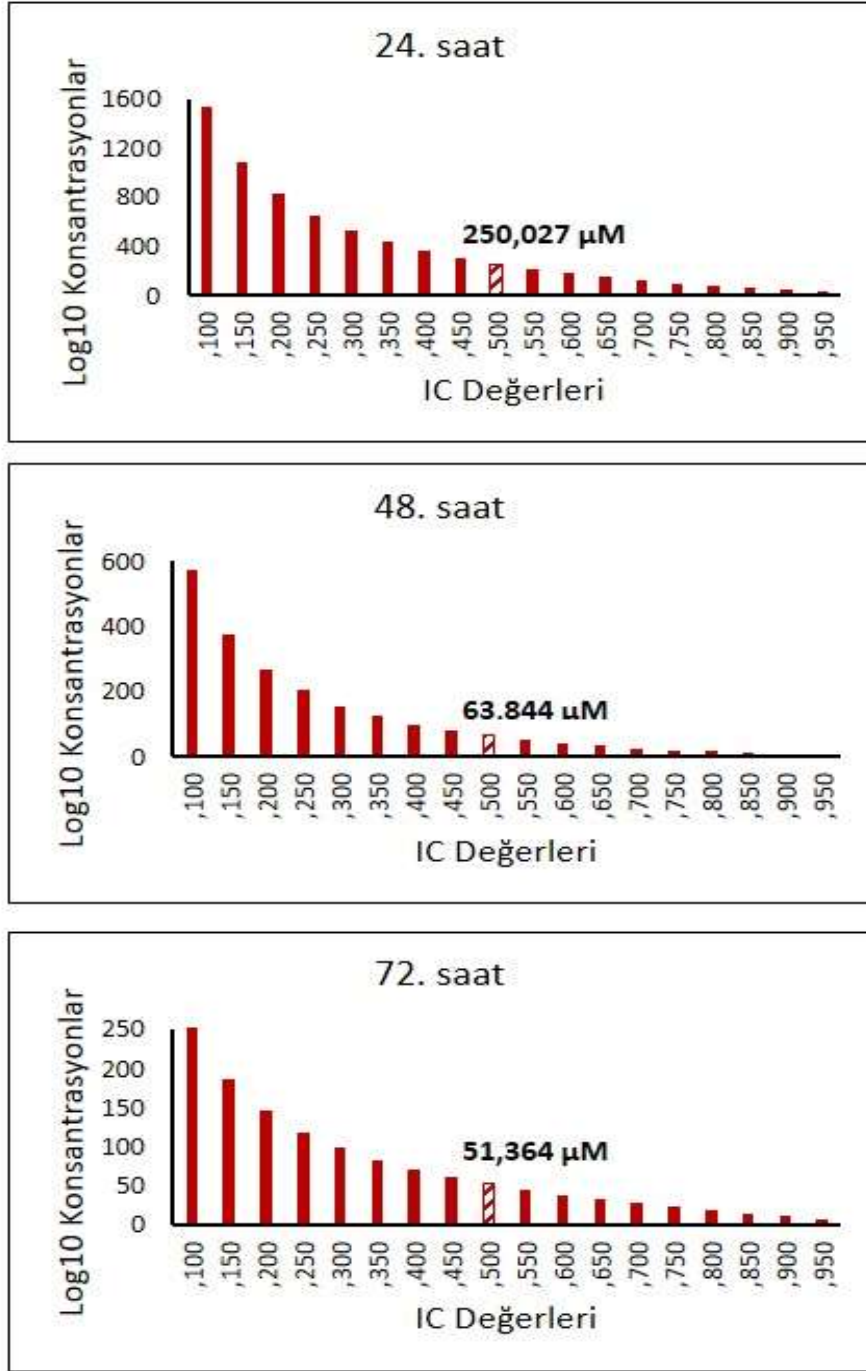
Şekil 12. PC-3 hücre hattında 3,125-400 µM doz aralıklarında 24 saat süreyle Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma



Şekil 13. PC-3 hücre hattında 3,125-400 µM doz aralıklarında 48 saat süreyle Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma



Şekil 14. PC-3 hücre hattında 3,125-400 µM doz aralıklarında 72 saat süreyle Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma



Şekil 15. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saatlik Oxaliplatin uygulamasının MTT testi verileriyle yapılan probit analizi ve IC_{50} değerleri

Farklı doz ve sürelerde Oxaliplatin uygulaması yapılan PC-3 hücrelerinde belirlenen % canlılık oranları Tablo 9'da verildi. Tablo 9 incelendiğinde 24 saatlik uygulamada en düşük iki dozun (3,125 μM ve 6,25 μM) hücre canlılığında bir artışa neden olduğu görüldü. En

yüksek canlılık oranının 24 saatlik uygulamada 3,125 μM dozunda, en düşük canlılık oranının ise 72 saatlik uygulamada 400 μM konsantrasyonda olduğu belirlendi. 48 saatlik uygulamada tüm uygulama dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı. 24 saatlik uygulamada hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olsa da en etkili sonucun 48 ve 72 saatlik uygulamalarda olduğu belirlendi. Oxaliplatin uygulama dozları ve uygulama süreleri arasındaki ilişki Pearson Korelasyonu ile analiz edildi (Tablo 10). Tablo 10'da verilen sonuçlar değerlendirildiğinde, uygulama dozları ve tüm uygulama süreleri arasında yüksek düzeyde, negatif ve anlamlı bir ilişki olduğu bulundu.

Veriler bir bütün olarak ele alındığında, Oxaliplatin uygulaması PC-3 hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir ölüme neden oldu. En etkili uygulama süresi 48 saat olarak belirlendi.

Tablo 9. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μM doz aralıklarında 24, 48, 72 saatlik Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Doz	n	% Canlı Hücre		
		24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	5	100,00 \pm 1,62 ^{ef}	100,00 \pm 0,64 ⁱ	100,00 \pm 0,90 ^g
3,125 μM	5	111,45 \pm 4,25 ^g	93,37 \pm 2,11 ^h	99,61 \pm 2,46 ^g
6,25 μM	5	105,06 \pm 6,76 ^f	88,18 \pm 1,96 ^g	94,00 \pm 0,63 ^f
12,5 μM	5	96,82 \pm 1,42 ^e	81,28 \pm 1,93 ^f	88,59 \pm 3,67 ^e
25 μM	5	94,27 \pm 1,29 ^e	72,91 \pm 2,18 ^e	77,17 \pm 0,59 ^d
50 μM	5	87,37 \pm 1,09 ^d	67,54 \pm 0,68 ^d	51,43 \pm 2,77 ^c
100 μM	5	79,91 \pm 1,02 ^c	52,95 \pm 2,12 ^c	26,12 \pm 1,31 ^b
200 μM	5	60,65 \pm 0,88 ^b	15,50 \pm 1,53 ^b	10,50 \pm 0,70 ^a
400 μM	5	29,88 \pm 2,10 ^a	7,71 \pm 0,17 ^a	6,89 \pm 0,20 ^a

Ortalama \pm standart sapma, ANOVA-Duncan Test, $p \leq 0.05$. Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır.

Tablo 10. Oxaliplatin doz-zaman ilişkisine ait Pearson korelasyon tablosu

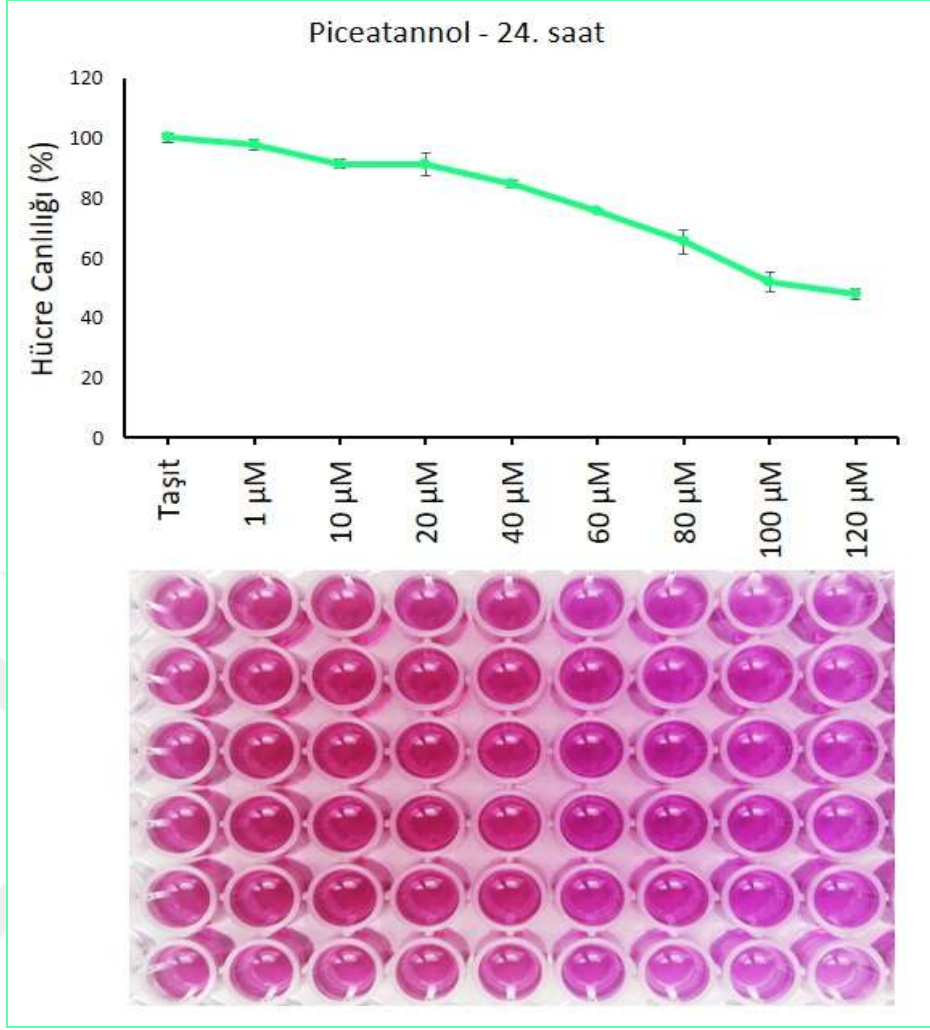
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Doz
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,946**	,897**	-,975**
	Sig. (2-tailed)		<0.0001	<0.0001	<0.0001
	N	45	45	45	45
48 Saat	Pearson Korelasyon	,946**	1	,957**	-,925**
	Sig. (2-tailed)	<0.0001		<0.0001	<0.0001
	N	45	45	45	45
72 Saat	Pearson Korelasyon	,897**	,957**	1	-,851**
	Sig. (2-tailed)	<0.0001	<0.0001		<0.0001
	N	45	45	45	45
Doz	Pearson Korelasyon	-,975**	-,925**	-,851**	1
	Sig. (2-tailed)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	N	45	45	45	45

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

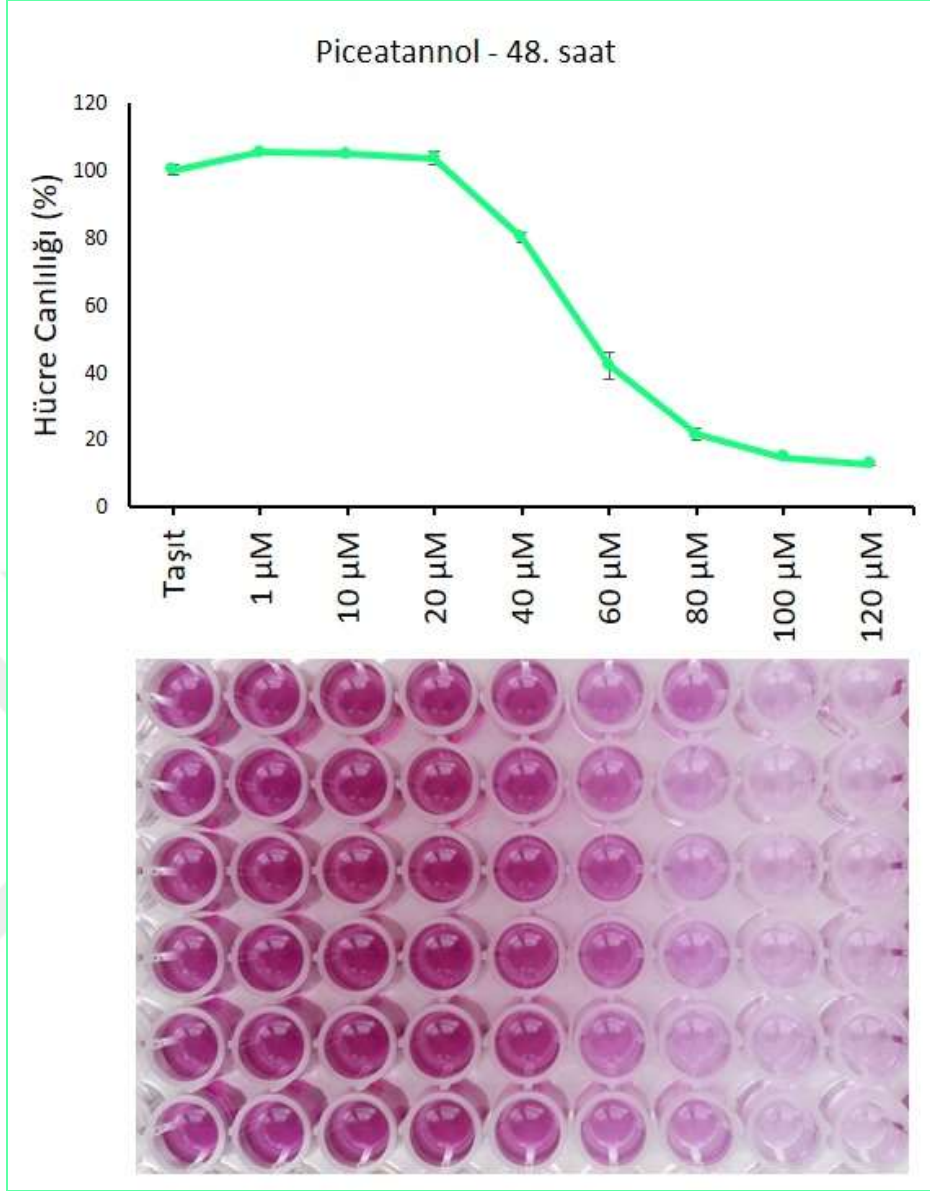
Piceatannol

Doğal fenolik bir bileşik olan Piceatannol'un insan prostat kanseri PC-3 hücre hattındaki sitotoksik etkisi incelendi. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücelere 1-120 µM aralığında 8 farklı dozda Piceatannol uygulandı ve 24, 48, 72 saatlik MTT testi ile hücre canlılığı belirlendi.

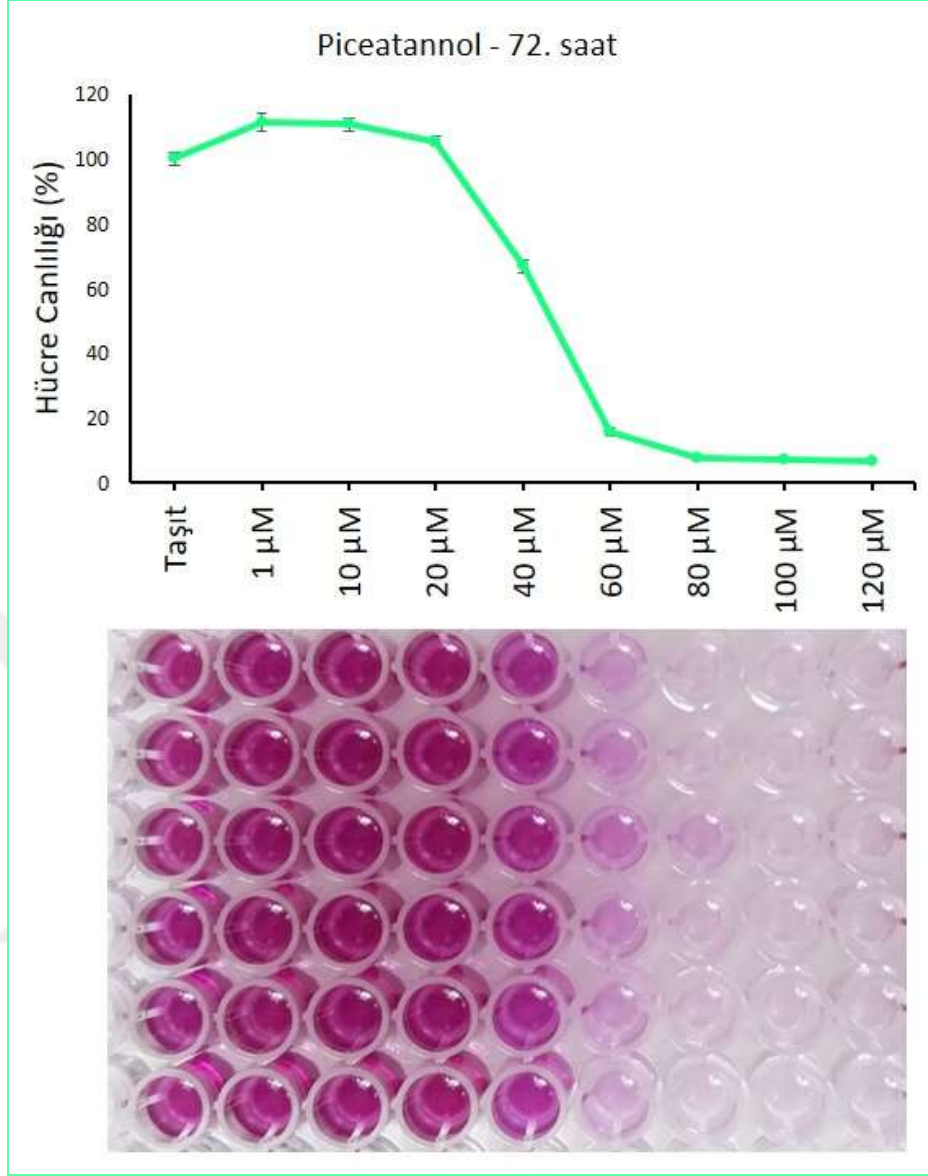
Piceatannol 24, 48 ve 72 saatlik sürelerin tümünde hücre canlılığında doza bağlı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden oldu ($p<0.001$). Hücre canlılığının 24. saatte %48 (Şekil 16), 48. saatte %13 (Şekil 17), 72. saatte %7 (Şekil 18) olduğu belirlendi. Kontrole kıyasla belirlenen hücre canlılık oranları kullanılarak yapılan probit analizinde IC_{50} değerleri 24 saat uygulama için 112 µM, 48 saat için 57 µM, 72 saat için 44 µM olarak saptandı (Şekil 19).



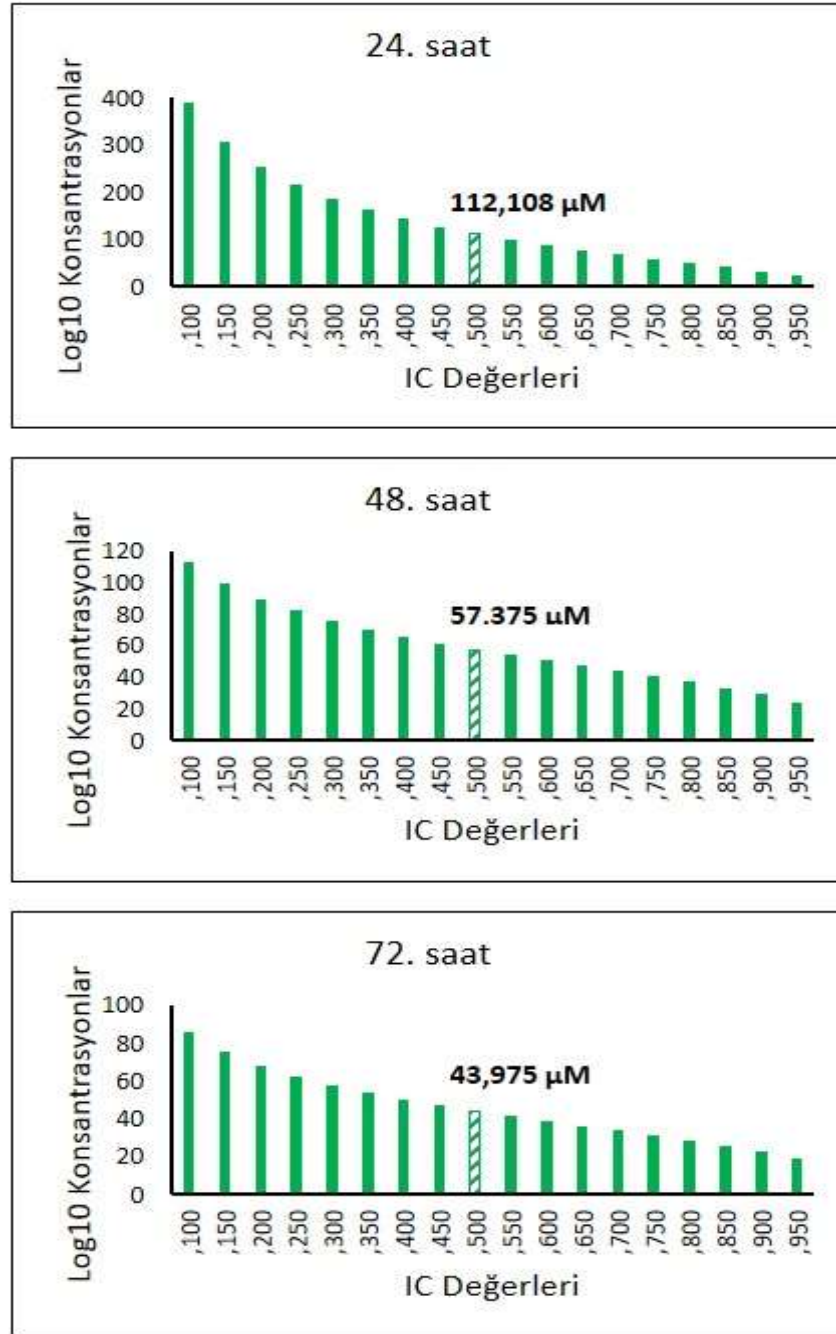
Şekil 16. PC-3 hücre hattında 1-120 µM doz aralıklarında 24 saat süreyle Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma



Şekil 17. PC-3 hücre hattında 1-120 µM doz aralıklarında 48 saat süreyle Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma



Şekil 18. PC-3 hücre hattında 1-120 µM doz aralıklarında 72 saat süreyle Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma



Şekil 19. PC-3 hücre hattında 1-120 μM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saatlik Piceatannol uygulamasının MTT testi verileriyle yapılan probit analizi ve IC₅₀ değerleri

Piceatannol'ün PC-3 hücrelerinde farklı doz ve sürelerdeki uygulamaları sonucu belirlenen % canlılık oranları Tablo 11'de gösterildi. Veriler incelendiğinde 48 ve 72 saatlik uygulamalarda 1 μM, 10 μM ve 20 μM dozlarının hücre canlılığını artırdığı görüldü. En yüksek canlılık oranı 72 saatlik uygulamada 1 μM dozunda belirlenirken, en düşük canlılık

oranı ise 72 saatlik uygulamada en yüksek doz olan 120 μM 'da saptandı. 24 saatlik Piceatannol uygulaması sonucunda hücre canlılığı anlamlı olarak azalsa da 48 ve 72 saatlik uygulamalar kadar etkili olamadığı görüldü. Piceatannol uygulamasındaki doz-süre ilişkisi Pearson Korelasyonu ile analiz edildi (Tablo 12). Analiz sonuçlarına göre Piceatannol uygulama dozları ile tüm uygulama süreleri arasında yüksek düzeyde, negatif ve anlamlı bir ilişki olduğu bulundu.

Elde edilen bu verilere göre Piceatannol uygulaması PC-3 hücre hattında doza ve zamana bağlı bir ölüme neden oldu. En etkili uygulama süresi 48 saat olarak belirlendi.

Tablo 11. PC-3 hücre hattında 1-120 μM doz aralıklarında 24, 48, 72 saatlik Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Doz	n	% Canlı Hücre		
		24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	5	100,00 \pm 1,36 ^f	100,00 \pm 1,62 ^e	100,00 \pm 2,11 ^d
1 μM	5	97,58 \pm 1,84 ^f	105,19 \pm 0,45 ^f	111,16 \pm 2,91 ^f
10 μM	5	91,26 \pm 1,43 ^e	104,64 \pm 0,57 ^f	110,48 \pm 2,13 ^f
20 μM	5	91,10 \pm 3,84 ^e	103,48 \pm 2,01 ^{ef}	105,44 \pm 1,67 ^e
40 μM	5	84,63 \pm 1,24 ^d	79,93 \pm 1,36 ^d	66,81 \pm 2,04 ^c
60 μM	5	75,59 \pm 0,99 ^c	41,94 \pm 4,05 ^c	15,56 \pm 1,25 ^b
80 μM	5	65,32 \pm 3,89 ^b	21,28 \pm 1,73 ^b	7,63 \pm 0,47 ^a
100 μM	5	51,88 \pm 3,40 ^a	14,48 \pm 0,38 ^a	7,28 \pm 0,23 ^a
120 μM	5	47,87 \pm 1,82 ^a	12,53 \pm 0,41 ^a	6,93 \pm 0,11 ^a

Ortalama \pm standart sapma, ANOVA-Duncan Test, $p \leq 0.05$. Aynı sütündeki farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak farklıdır.

Tablo 12. Piceatannol doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu

		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Doz
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,951**	,906**	-,985**
	Sig. (2-tailed)		<0.0001	<0.0001	<0.0001
	N	45	45	45	45
48 Saat	Pearson Korelasyon	,951**	1	,984**	-,967**
	Sig. (2-tailed)	<0.0001		<0.0001	<0.0001
	N	45	45	45	45
72 Saat	Pearson Korelasyon	,906**	,984**	1	-,936**
	Sig. (2-tailed)	<0.0001	<0.0001		<0.0001
	N	45	45	45	45
Doz	Pearson Korelasyon	-,985**	-,967**	-,936**	1
	Sig. (2-tailed)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	N	45	45	45	45

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

OXALIPLATIN VE PICEATANNOL UYGULAMALARININ GEN VE PROTEİN SEVİYELERİNE ETKİSİ

Çalışmamızda insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında kontrol ve uygulama gruplarında IL6, IL6R, JAK1, JAK2, STAT3, EGFR, TGF- β , TGF β -R2, SMAD2, SMAD3, p53, BCL2, BAX, Kaspaz 3, Kaspaz 8 gen ifadelerindeki değişimler qRT-PCR yöntemi ile; TGF- β , TGF β -R2, SMAD2, SMAD3, p-SMAD2/3, JAK2, STAT3, p-STAT3 protein seviyelerindeki değişimler Western Blot analizi ile belirlendi.

JAK/STAT Sinyal Yolağı

İnsan prostat kanseri PC-3 hücre hattında Oxaliplatin, Piceatannol ve kombine uygulamaları yapılan gruplarda IL6, IL6R, JAK1, JAK2, STAT3 ve EGFR gen ifadelerinde meydana gelen değişimler Tablo 13 ve Şekil 20’de; JAK2, STAT3, p-STAT3 protein seviyelerindeki değişimler ise Şekil 21’de verildi.

Yapılan çalışmada IL6 gen ifadesinin tüm uygulama gruplarında kontrole göre anlamlı artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.01$). En yüksek artış Oxaliplatin grubunda kontrole göre $9,58 \pm 0,22$ kat iken, bunu sırası ile Oxaliplatin+Piceatannol (kontrole göre $2,03 \pm 0,50$ kat) ve Piceatannol (kontrole göre $1,84 \pm 0,19$ kat) gruplarının takip ettiği saptandı. Oxaliplatin grubu, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterirken; Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Tablo 13. PC-3 hücre hattında 48 saat süreyle Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) uygulamaları sonucu, Kontrol grubuna (K) kıyasla belirlenen JAK/STAT sinyal yolağı relatif gen ekspresyon değerleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; ortalama \pm standart hata, tek yönlü ANOVA- Independent t-test, $P \leq 0.05$.

Gen Adı	K	O	P	P	P	O+P	P
IL6	0,99 \pm 0,02	9,58 \pm 0,22	▲ <0,0001	1,84 \pm 0,19	▲ 0,0025	2,03 \pm 0,50	▲ 0,0002
IL6R	1,00 \pm 0,06	6,41 \pm 0,32	▲ <0,0001	3,10 \pm 0,18	▲ 0,0102	8,72 \pm 0,77	▲ <0,0001
JAK1	0,99 \pm 0,03	1,78 \pm 0,09	▲ 0,0065	1,47 \pm 0,05	▶ 0,1951	3,15 \pm 0,28	▲ <0,0001
JAK2	1,15 \pm 0,32	3,65 \pm 0,16	▲ 0,0186	13,65 \pm 0,46	▲ <0,0001	11,76 \pm 0,91	▲ <0,0001
STAT3	0,97 \pm 0,05	0,66 \pm 0,02	▶ 0,1993	1,33 \pm 0,13	▶ 0,0984	1,53 \pm 0,13	▲ 0,0031
EGFR	0,99 \pm 0,04	1,69 \pm 0,09	▲ <0,0001	1,24 \pm 0,06	▶ 0,1916	1,15 \pm 0,10	▶ 0,633

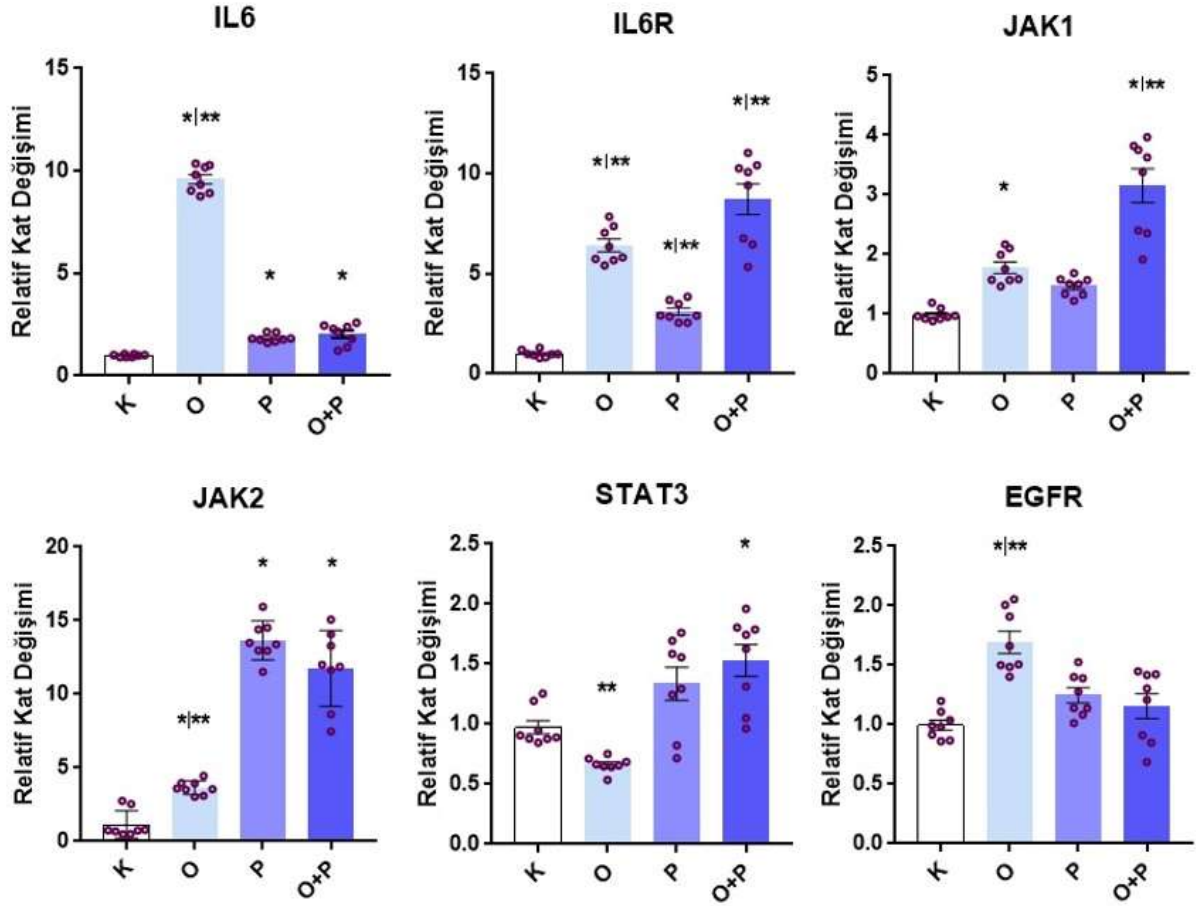
İSTATİKSEL OLARAK ▲ ARTAN, ▼ AZALAN, ▶ STABİL

Çalışmamızda IL6R gen ifadesinin tüm uygulama gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi ($P \leq 0.01$) (Şekil 20). Oxaliplatin+Piceatannol grubunda kontrole göre 8,72 \pm 0,77 katlık bir artış belirlenirken, Oxaliplatin grubunda 6,41 \pm 0,32 kat, Piceatannol grubunda 3,10 \pm 0,18 kat artış olduğu saptandı. IL6R gen ifadesinin tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlendi.

JAK1 gen ifadesi incelendiğinde Piceatannol uygulamasının, gen ifadesinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı, Oxaliplatin+Piceatannol ve Oxaliplatin gruplarında ise sırası ile kontrole göre 3,15 \pm 0,28 ve 1,78 \pm 0,09 kat artışlar meydana geldiği ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu saptandı ($P \leq 0.01$). Buna ilaveten uygulama grupları birbiri ile karşılaştırıldığında Oxaliplatin+Piceatannol grubunun diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu saptandı (Şekil 20).

JAK2 gen ifadesi tüm uygulama gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($P \leq 0.01$). Gen ifadesinin en yüksek değerinin kontrole göre 13,65 \pm 0,46 kat ile Piceatannol grubunda olduğu saptanırken bunu sırasıyla kontrole göre 11,76 \pm 0,91 kat artış ile Oxaliplatin+Piceatannol grubu ve kontrole göre 3,65 \pm 0,16 kat artış ile Oxaliplatin grubunun takip ettiği belirlendi. Oxaliplatin, uygulama grupları arasında en düşük gen seviyesine sahip olan grup olarak Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol'e göre istatistiksel olarak farklılık gösterirken, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarının birbiri ile aynı istatistiksel gruba girdiği saptandı (Şekil 20). JAK2 protein seviyeleri incelendiğinde, gen seviyelerindeki artışların aksine tüm uygulama gruplarında belirgin azalmalar görüldü. En düşük protein

seviyesi kontrole göre 0,58 kat azalma olan Oxaliplatin+Piceatannol grubunda, daha sonra sırasıyla 0,64 kat ile Oxaliplatin’de ve 0,74 kat ile Piceatannol grubunda gözlemlendi (Şekil 21).

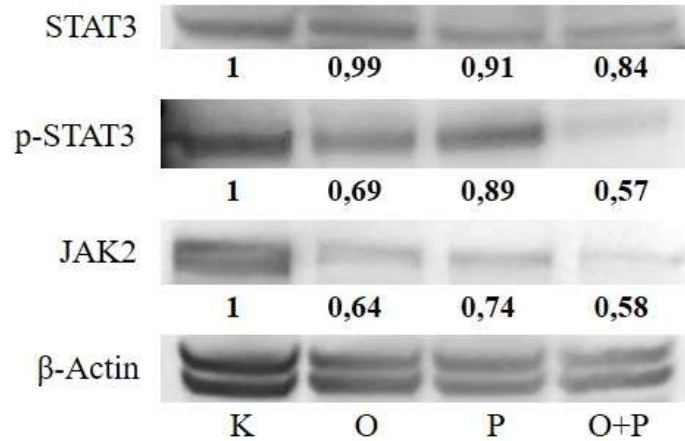


Şekil 20. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında qRT-PCR ile belirlenen IL6, IL6R, JAK1, JAK2, STAT3, EGFR gen ifadelerine ait relatif kat değişimleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi, ortalama \pm standart hata, * Kontrol ve uygulama grubu karşılaştırması, **Uygulama grupları karşılaştırması, veriler istatistiksel olarak farklıdır, Independent t-test, $P \leq 0.05$.

STAT3 gen ifadesinde Oxaliplatin ve Piceatannol gruplarında kontrole kıyasla anlamlı bir fark oluşmazken, Oxaliplatin+Piceatannol grubunda kontrole göre $1,53 \pm 0,13$ kat artış olduğu belirlendi ($P \leq 0.01$) (Şekil 20). Oxaliplatin uygulaması STAT3 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmasa da $0,66 \pm 0,02$ kat ile en düşük gen seviyesine sahip olan grup olarak Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarından

istatistiksel olarak farklı olduğu saptandı. Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarının STAT3 gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenemedi. STAT3 protein seviyesinin Oxaliplatin grubunda kontrol seviyesinde kaldığı, Piceatannol grubunda 0,91 kat, Oxaliplatin+Piceatannol grubunda ise 0,84 kat azaldığı saptandı. En düşük p-STAT3 protein seviyesi kontrole kıyasla 0,57 kat azalma ile Oxaliplatin+Piceatannol grubunda saptanırken, bunu sırasıyla 0,69 kat ile Oxaliplatin ve 0,89 kat ile Piceatannol gruplarının takip ettiği belirlendi (Şekil 21).

EGFR gen ifadesinde Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarında kontrole göre anlamlı bir farklılık oluşmazken, Oxaliplatin grubunda kontrole göre $1,69 \pm 0,09$ katlık anlamlı bir artış olduğu saptandı ($P \leq 0,01$). En yüksek seviyeye sahip grup olan Oxaliplatin, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarına göre de istatistiksel olarak farklılık gösterdi (Şekil 20).



Şekil 21. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında STAT3, p-STAT3, JAK2 ve β -Aktin protein bantlarının görüntüsü.

TGF- β Sinyal Yolağı

PC-3 hücre hattında Oxaliplatin, Piceatannol ve kombine uygulamaları yapılan gruplarda TGF- β , TGF β -R2, SMAD2 ve SMAD3 genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler Tablo 14 ve Şekil 22’de; TGF- β , TGF β -R2, SMAD2, SMAD3, p-SMAD2/3 protein seviyelerindeki değişimler Şekil 23’te verildi.

Çalışmamızda kontrol ve uygulama gruplarında belirlenen TGF- β gen ifadesi incelendiğinde Oxaliplatin+Piceatannol grubunda kontrole göre $1,42 \pm 0,10$ kat, Piceatannol

grubunda $1,29 \pm 0,07$ kat artış olduğu belirlendi ($P \leq 0,05$) (Şekil 22). Oxaliplatin grubunun kontrole göre $0,82 \pm 0,03$ kat azalma ile en düşük gen seviyesine sahip olduğu, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmasa da Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarından farklı olduğu belirlendi. Western Blot ile belirlenen protein seviyelerinin de gen ekspresyon seviyeleri ile paralel değişim gösterdiği saptandı. Oxaliplatin grubu TGF- β protein seviyesindeki $0,92$ kat düşüş ile kontrol seviyesinde kalırken, en yüksek protein seviyesinin kontrole göre $1,21$ kat artış ile Piceatannol grubunda olduğu ve Oxaliplatin+Piceatannol grubunda da $1,12$ kat artış olduğu saptandı (Şekil 23).

Tablo 14. PC-3 hücre hattında 48 saat süreyle Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) uygulamaları sonucu, Kontrol grubuna (K) kıyasla belirlenen TGF- β sinyal yolağı relatif gen ekspresyon değerleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; ortalama \pm standart hata, tek yönlü ANOVA- Independent t-test, $P \leq 0,05$.

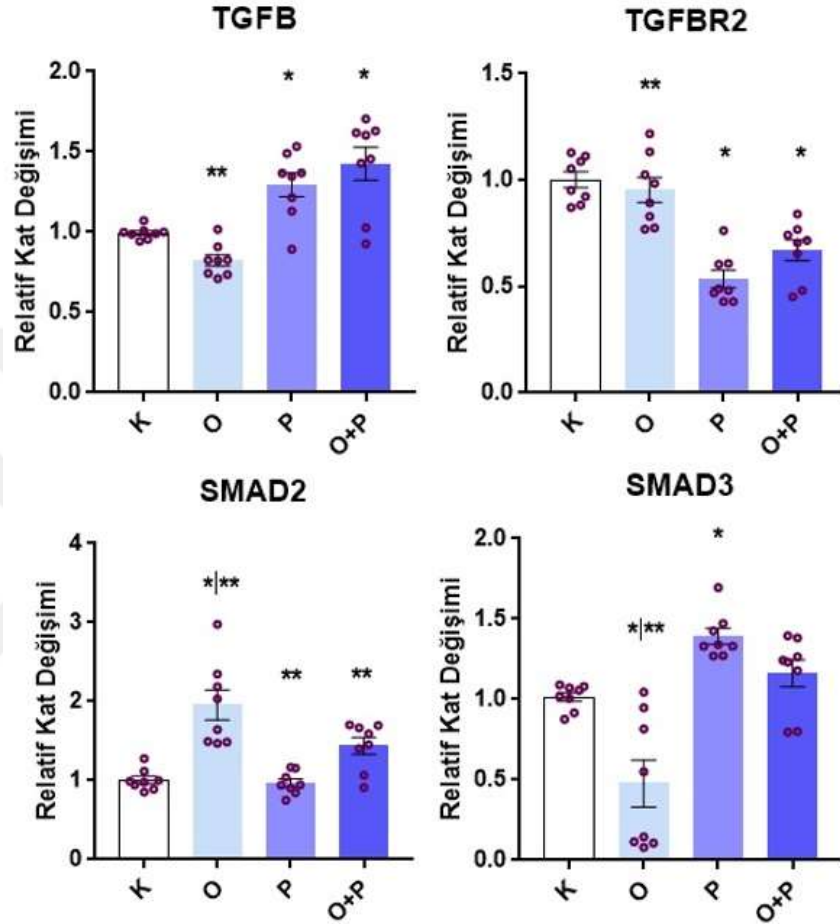
Gen Adı	K	O		P	P		P	O+P		P
TGF- β	$0,99 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,03$	▶	0,3856	$1,29 \pm 0,07$	▲	$1,29 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,10$	▲	0,0005
TGF β -R2	$1,00 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,05$	▶	0,886	$0,53 \pm 0,04$	▼	$0,53 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,04$	▼	<0,0001
SMAD2	$1,00 \pm 0,04$	$1,95 \pm 0,18$	▲	<0,0001	$0,96 \pm 0,05$	▶	$0,96 \pm 0,05$	$1,43 \pm 0,10$	▶	0,0744
SMAD3	$1,01 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,14$	▼	0,0012	$1,39 \pm 0,04$	▲	$1,39 \pm 0,04$	$1,16 \pm 0,08$	▶	0,8261

İSTATİKSEL OLARAK ▲ ARTAN, ▼ AZALAN, ▶ STABİL

Çalışma kapsamında TGF β -R2 gen ifadeleri incelendiğinde Piceatannol grubunda kontrole göre $0,53 \pm 0,04$ kat, Oxaliplatin+Piceatannol grubunda ise $0,67 \pm 0,04$ kat olmak üzere anlamlı azalmaların olduğu belirlendi ($P \leq 0,01$) (Şekil 22). Oxaliplatin grubunun $0,95 \pm 0,05$ kat ile kontrol seviyesinde kaldığı ve Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu saptandı. Protein seviyeleri ise gen ekspresyon sonuçlarının aksine Oxaliplatin grubunda kontrole göre $0,81$ kat azalırken; Piceatannol grubunda $1,16$ kat, Oxaliplatin+Piceatannol grubunda $1,08$ kat artış gösterdi (Şekil 23).

Kontrol ve uygulama yapılan PC-3 hücrelerinde SMAD2 gen ifadesi incelendiğinde en yüksek gen seviyesinin kontrole göre $1,95 \pm 0,18$ kat artış ile Oxaliplatin grubunda olduğu saptandı ($P \leq 0,01$) (Şekil 22). Bunu sırasıyla $1,43 \pm 0,10$ kat artış ile Oxaliplatin+Piceatannol grubu ve $0,96 \pm 0,05$ kat ile Piceatannol grubunun takip ettiği belirlendi. Tüm uygulama gruplarında belirlenen gen ifadelerinin birbirinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu saptandı. SMAD2 protein seviyelerinin tüm uygulama gruplarında belirgin bir şekilde

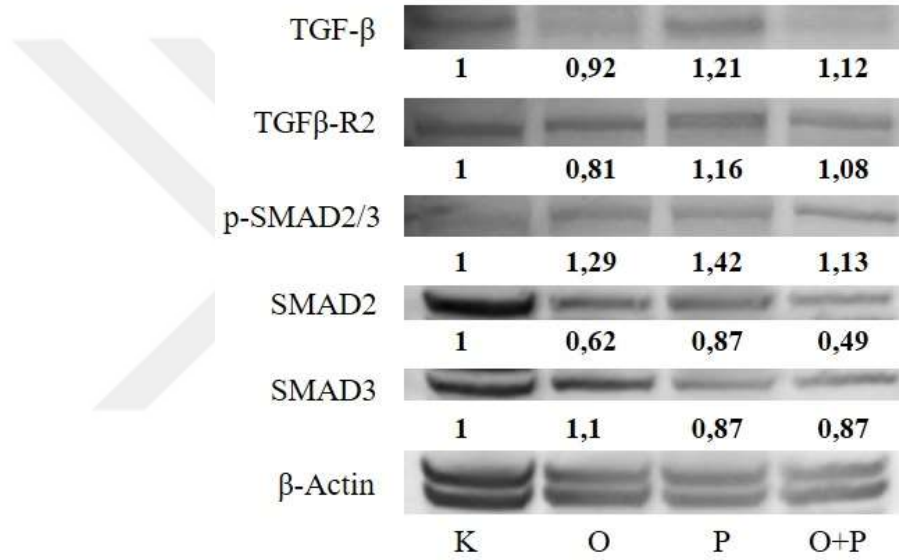
azaldığı ve en düşük protein seviyesinin kontrole göre 0,49 kat azalan Oxaliplatin+Piceatannol grubunda, daha sonra sırasıyla 0,62 kat azalma ile Oxaliplatin’de ve 0,87 kat azalma ile Piceatannol’de olduğu saptandı (Şekil 23).



Şekil 22. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında qRT-PCR ile belirlenen TGF- β , TGF β R2, SMAD2, SMAD3 gen ifadelerine ait relatif kat değişimleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi, ortalama \pm standart hata, * Kontrol ve uygulama grubu karşılaştırması, **Uygulama grupları karşılaştırması, veriler istatistiksel olarak farklıdır, Independent t-test, $P \leq 0.05$.

Çalışmamızda SMAD3 gen ifadesinde Oxaliplatin grubunda kontrole göre $0,47 \pm 0,14$ kat anlamlı bir azalma olurken, Piceatannol grubunda ise $1,39 \pm 0,04$ katlık anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($P \leq 0.05$) (Şekil 22). Oxaliplatin+Piceatannol grubunda kontrole göre 1,16 katlık bir artış olsa da bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Uygulama

grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, Oxaliplatin grubunun Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı olduğu saptandı. SMAD3 protein seviyesi Oxaliplatin grubunda kontrol seviyesinde kalırken, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarında 0,87 kat azalma olduğu belirlendi (Şekil 23). p-SMAD2/3 protein seviyeleri incelendiğinde tüm uygulama gruplarının kontrole kıyasla artış gösterdiği bulundu. En yüksek protein seviyesi kontrole göre 1,42 kat artış gösteren Piceatannol grubunda gözlenirken bunu sırasıyla 1,29 kat artış ile Oxaliplatin grubu ve 1,13 kat ile Oxaliplatin+Piceatannol grubunun takip ettiği belirlendi.



Şekil 23. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında TGF-β, TGFβ-R2, p-SMAD2/3, SMAD2, SMAD3 ve β-Aktin protein bantlarının görüntüsü.

Apoptoz Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında PC-3 hücre hattında Oxaliplatin, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulaması ile p53, BCL2, BAX, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 genlerinin ifadelerinde meydana gelen değişimler Tablo 15 ve Şekil 24'te verildi.

Çalışmamızda p53 gen ifadesinin Oxaliplatin grubunda kontrole kıyasla $33,85 \pm 3,60$ kat, Piceatannol grubunda ise kontrole göre $198,27 \pm 30,21$ kat artış gösterdiği ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Bununla birlikte p53 gen ifadesinin kontrole göre $981,37 \pm 120,69$ kat artış gösterdiği grup olan Oxaliplatin+Piceatannol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($P \leq 0.01$) (Şekil 24). Oxaliplatin+Piceatannol

grubu en yüksek gen seviyesine sahip grup olarak Oxaliplatin ve Piceatannol'e göre de istatistiksel olarak farklılık gösterdi.

Tablo 15. PC-3 hücre hattında 48 saat süreyle Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) uygulamaları sonucu, Kontrol grubuna (K) kıyasla belirlenen Apoptoz sinyal yolağı relatif gen ekspresyon değerleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; ortalama \pm standart hata, tek yönlü ANOVA- Independent t-test, $P \leq 0.05$.

Gen Adı	K	O	P	P	P	O+P	P
p53	0,98 \pm 0,24	33,85 \pm 3,60	▶ 0,9994	198,27 \pm 30,21	▶ 0,1828	981,37 \pm 120,69	▲ <0,0001
BCL2	1,03 \pm 0,04	0,24 \pm 0,01	▼ <0,0001	0,51 \pm 0,05	▼ <0,0001	0,29 \pm 0,05	▼ <0,0001
BAX	0,97 \pm 0,05	1,24 \pm 0,13	▶ 0,1915	0,93 \pm 0,05	▶ 0,9994	1,25 \pm 0,06	▶ 0,1589
Kaspaz 3	0,98 \pm 0,03	1,17 \pm 0,06	▶ 0,5963	1,57 \pm 0,07	▲ 0,0004	1,97 \pm 0,14	▲ <0,0001
Kaspaz 8	0,99 \pm 0,05	1,20 \pm 0,08	▶ 0,4502	1,41 \pm 0,05	▲ 0,0117	1,82 \pm 0,13	▲ <0,0001

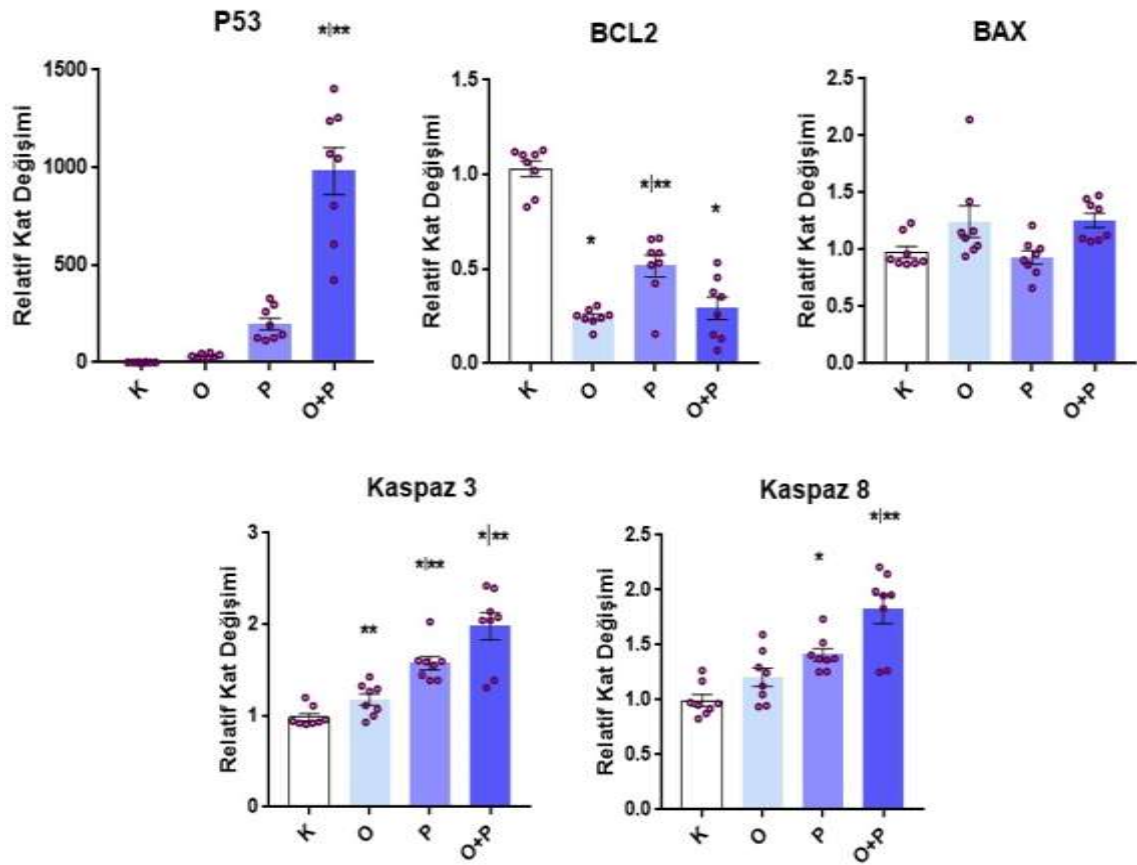
İSTATİKSEL OLARAK ▲ ARTAN, ▼ AZALAN, ▶ STABİL

BCL2 gen ifadesinin tüm uygulama gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulundu ($P \leq 0.01$) (Şekil 24). En belirgin azalma kontrole göre $0,24 \pm 0,01$ kat ile Oxaliplatin grubunda olurken bunu sırasıyla kontrole göre $0,29 \pm 0,05$ kat azalma ile Oxaliplatin+Piceatannol grubu ve kontrole göre $0,51 \pm 0,05$ kat azalma ile Piceatannol grubunun takip ettiği belirlendi. Uygulama grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında Piceatannol grubunun Oxaliplatin ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı olduğu saptandı.

Çalışma kapsamında BAX gen ifadesinin Oxaliplatin+Piceatannol grubunda kontrole göre $1,25 \pm 0,06$ kat, Oxaliplatin grubunda kontrole göre $1,24 \pm 0,13$ kat artış gösterdiği ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi. Piceatannol uygulaması yapılan hücrelerde BAX geninin kontrol seviyesinde kaldığı saptandı (Şekil 24).

Kontrol ve uygulama yapılan PC-3 hücrelerinde Kaspaz 3 gen ifadesi incelendiğinde kontrole göre $1,17 \pm 0,06$ kat artış gösteren Oxaliplatin grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir farklılık bulunamadı. En yüksek Kaspaz 3 gen seviyesi kontrole göre $1,97 \pm 0,14$ kat artan Oxaliplatin+Piceatannol grubunda belirlenirken bunu kontrole göre $1,57 \pm 0,07$ kat artan Piceatannol grubunun takip ettiği saptandı ($P \leq 0.01$) (Şekil 24). Buna ilaveten uygulama grupları birbiri ile karşılaştırıldığında Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarının diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi.

Çalışmamızda Kaspaz 8 gen ifadesi incelendiğinde en yüksek gen seviyesinin kontrole göre $1,82 \pm 0,13$ kat artan Oxaliplatin+Piceatannol grubunda olduğu saptandı ($P \leq 0.01$) (Şekil 24). Piceatannol grubunda kontrole göre $1,41 \pm 0,05$ kat anlamlı bir artış olduğu ancak kontrole göre $1,20 \pm 0,08$ kat artan Oxaliplatin grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir değişim olmadığı belirlendi. Uygulama grupları birbiri ile karşılaştırıldığında Oxaliplatin grubunun diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu saptandı.



Şekil 24. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında qRT-PCR ile belirlenen p53, BCL2, BAX, Kaspaz 3, Kaspaz 8 gen ifadelerine ait relatif kat değişimleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi, ortalama \pm standart hata, * Kontrol ve uygulama grubu karşılaştırması, **Uygulama grupları karşılaştırması, veriler istatistiksel olarak farklıdır, Independent t-test, $P \leq 0.05$.

TARTIŞMA

Prostat kanseri, erkekler arasında en sık teşhis edilen ikinci kanser türüdür ve kanser ölümlerine bakıldığında altıncı sırada yer almaktadır. Dünya çapındaki prostat kanseri yükünün, nüfusun büyümesi ve yaşlanmasıyla doğru orantılı olarak artması beklenmektedir (75). Prostat kanseri, şiddetine bağlı olarak lokalize olabilmekte veya metastaz yapabilmektedir. Lenfatik sistem yoluyla metastaz yapabilen prostat kanseri kemiğe yayılım göstermektedir (76). Lokalize hastalığı olan vakalarda klinik sonuçlar iyi olsa da, prognozu kötü olan metastatik prostat kanserli hastaların 5 yıllık sağkalım oranları %30'u geçmemektedir (77). Metastaz durumunda prostat bezlerini, ilişkili dokuları ve lenf düğümlerini çıkarmak için cerrahi operasyon tercih edilebilmektedir. Bunun dışında radyasyon tedavisi ve ADT gibi seçenekler bulunmaktadır (76). ADT genel olarak hastalığın ilerlemesini engelleyememektedir ve en sonunda hormona duyarlı prostat kanseri, düşük testosteron seviyelerinde bile direnç geliştirerek kastrasyona dirençli prostat kanserine dönüşmektedir (77). ADT'nin etkisiz kaldığı durumlarda kemoterapötik ajanlar tercih edilebilmektedir (76). Bununla birlikte kastrasyona dirençli prostat kanseri ölümcül bir tanı olmaya devam etmekte ve daha etkili terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (77).

Oxaliplatin, replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini bozabilen, hücre döngüsünü durduran ve apoptozu indükleyebilen üçüncü nesil platin bazlı bir kemoterapi ilacıdır. Temel olarak kliniklerde kolorektal kanser tedavisi için kullanılmaktadır ancak prostat kanseri de dahil olmak üzere farklı tümörlere karşı da etkili olduğu bulunmuştur (78). Oxaliplatin nefrotoksik değildir. Hafif hematotoksisite ve genellikle tedavinin kesilmesiyle geri döndürülebilir kümülatif nörosensoryel toksisite ile sınırlı iyi bir güvenlik profiline sahiptir (70). Dorff ve ark.'nın (79) yaptığı çalışmada daha önce bir taksan ile tedavi edilen metastatik

kastrasyona dirençli prostat kanseri olan hastalarda Pemetrexed ile kombine edilen Oxaliplatin'in etkili bir seçenek olabileceği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada Oxaliplatin'in prostat kanseri hücre hatlarında ve prelinik hayvan modellerinde immün kontrol noktası blokaj tedavisi (anti-PD-1) ile birlikte etkinliği araştırılmıştır. Bunun sonucunda Oxaliplatin'in prostat kanserinde anti-PD-1 tedavisini duyarlı hale getirdiği ve bu kombinasyonun kastrasyona dirençli hastalarda bir seçenek olabileceği bildirilmiştir (4).

Doğal ürünler, farmakolojik olarak aktif kemopreventif ajanların keşfinde önemli bir başlangıç noktasıdır. Doğal kaynaklardan elde edilen biyolojik olarak aktif ürünlerin tıbbi rolü, araştırmacıların bu alana yönelmesinde etkili olmuştur (80). Piceatannol, resveratrol analogu olan fenolik bir bileşiktir. Çalışmalarda Piceatannol'ün anti-inflamatuar ve immünosupresif özelliklere sahip, farklı tümör tiplerine karşı antikanser aktivite gösteren umut verici bir kemopreventif ajan olduğu bildirilmiştir (81). Piceatannol'ün prostat, mesane ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde büyümeyi inhibe ettiği ve proapoptotik etki gösterdiği rapor edilmiştir (73). Piceatannol doğal olarak oluşan bir protein tirozin kinaz inhibitörüdür, aynı zamanda STAT3 ve STAT5'i de inhibe etmektedir (82). Çok sayıda sitokin ve sitokin reseptörü, dört JAK ve yedi STAT olmasına rağmen, STAT3'ün IL6 aracılı aktivasyonunun, tümörjenezini indükleyen temel sinyal yolu olduğu görülmektedir (83). Barton ve ark.'nın (84) yaptığı çalışmada STAT3 inhibe edildiğinde prostat kanseri hücre hatlarında apoptozun indüklendiği bulunmuş, STAT3 inhibisyonunun prostat kanserinde etkili bir yaklaşım olabileceği bildirilmiştir.

TGF- β sinyalinin, meme kanseri, melanom, özellikle de prostat kanserinde kemik metastazı gelişiminde önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8,85-87). TGF- β sinyali olmayan fibroblastların bu kanser türlerinde ilerlemeyi artırdığı bildirilmiştir (88).

Wang ve ark.'nın (50) yaptığı çalışmada STAT3 ve SMAD3 arasında doğrudan bir etkileşim olduğu, STAT3'ün SMAD3 için SMAD4 ile bir çeşit rekabete girdiği bildirilmiştir. Bu rekabet sonucunda SMAD3-SMAD4 kompleksinin ve dolayısıyla da TGF- β sinyal yolağının bozulduğu bulunmuştur. Luwor ve ark. (89) aşırı eksprese edilmiş EGFR tarafından spesifik ve kalıcı olarak aktive edilen STAT3'ün, TGF- β duyarlılığının azalmasından sorumlu bir anahtar sinyal molekül olduğunu bildirmişlerdir.

Bu bilgiler doğrultusunda, prostat kanserinde JAK/STAT ve TGF- β sinyal yolağını hedeflemenin etkili bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünüldü. Yapılan literatür araştırmasında Oxaliplatin ve Piceatannol kombinasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya

rastlanmadı. Bu çalışmada Oxaliplatin ve Piceatannol kombinasyonu ile STAT3'ün baskılanması, bunun sonucunda TGF- β sinyal yolağı aracılığı ile insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında oluşacak sitotoksik etkinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda ilk olarak insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında Oxaliplatin ve Piceatannol'ün IC₅₀ değerleri MTT testi yapılarak belirlendi. Buna göre, PC-3 hücre hattında 24, 48, 72 saatin sonunda IC₅₀ değerleri sırasıyla Oxaliplatin için 250 μ M, 64 μ M ve 51 μ M (Şekil 15); Piceatannol için 112 μ M, 57 μ M, 44 μ M olarak bulundu (Şekil 19). Önceki çalışmalarda PC-3 hücrelerinde 48 saatlik Oxaliplatin uygulaması sonunda IC₅₀ değerleri 43 μ M (90,91), 72 saatlik uygulama sonunda 100 μ M (92) olarak rapor edilmiştir. Marzo ve ark.'nın (78) yaptığı çalışmada 200 μ M Oxaliplatin uygulanan PC-3 hücrelerinde 24 saat sonunda hücre canlılığının %40, 48 saat sonunda ise %52 azaldığı belirlenmiştir. Kido ve ark. (14), PC-3 hücrelerine 40 μ M Piceatannol uygulandığında 72 saat sonunda hücre canlılığının yaklaşık %50 olduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada, PC-3 hücrelerine 25 μ M Piceatannol uygulandığında, 72 saat sonunda canlılığın %50'nin üzerinde olduğu rapor edilmiştir (71). Dias ve ark. (93) ise PC-3 hücrelerine 6 günlük Piceatannol uygulaması yapıldığında IC₅₀ değerinin 34,6 μ M olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda belirlediğimiz IC₅₀ değerlerinin literatür verileri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Çalışmamızda MTT testi sonuçlarına göre her iki ajan için de en etkili uygulama süresinin 48 saat olduğu belirlendi ve bulunan IC₅₀ değerleri ile tekli ve kombine uygulamalar yapıldı. Çalışmanın bir sonraki aşamasında Oxaliplatin ve Piceatannol uygulamalarının PC-3 hücrelerinde JAK/STAT, TGF- β ve apoptoz sinyal yolakları üzerindeki etkileri qRT-PCR ve western blot analizleri ile belirlendi.

JAK/STAT sinyal yolağı hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması süreçlerinde merkezi bir rol oynamaktadır (94). Bu sinyal yolunun anormal aktivasyonu, tümör oluşumunu teşvik etmektedir (95). IL6, kendi reseptörü üzerinden JAK2/STAT3 sinyal yolunun ana aktivatörü olan çok işlevli bir sitokindir (96). IL6, lösemi, renal hücreli karsinomlar ve prostat dahil olmak üzere çeşitli malign tümör tiplerinde büyüme ve farklılaşmanın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. IL6 ve reseptörünün ekspresyonu, sadece insan prostat kanseri hücrelerinde değil, doğrudan hastalardan elde edilen insan prostat karsinoması ve iyi huylu prostat hiperplazisinde de gösterilmiştir. Ayrıca, metastatik prostat karsinomu olan hastaların serumlarında IL6 seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (97). IL6'ya yanıt olarak prostat kanseri hücrelerinde gözlemlenen proliferasyon hızındaki artışın, STAT3'ün aktivasyonu yoluyla olduğu gösterilmiştir (98). p-STAT3 ve IL6R ekspresyonunu

incelemek için kastrasyona dirençli prostat kanserinden ölen hastaların otopsilerinden alınan metastatik numuneler analiz edilmiştir. Kemik'in %98'inde, lenf düğümünün %84'ünde ve viseral metastazların %78'inde p-STAT3 ve IL6R arasında güçlü bir çapraz etkileşim olduğu belirlenmiştir (99). Abdulghani ve ark. (100) insan prostat kanseri DU145 hücre hattına STAT3 aktarımıyla akciğer metastazlarının kontrole kıyasla 33 kat arttığını ve STAT3'ün prostat kanseri hücrelerinde hücre göçünü desteklediğini bildirmiştir. p-STAT3, IL6'nın bloke edilmesi yoluyla ya da doğrudan kendisinin inhibe edilmesiyle bloke edildiğinde prostat kanseri hücrelerinde koloni oluşturma yeteneğini ve *in vivo* tümörijeniteyi önemli ölçüde bastırmıştır (101).

Kwon ve ark. (15) DU-145 insan prostat kanseri hücrelerinde Piceatannol'ün etkisini incelemiş ve Piceatannol'ün IL6 salgılanmasını azalttığını, STAT3 fosforilasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Farelere oral yolla Piceatannol verildiğinde tümör dokularında STAT3 fosforilasyonunun azaldığı ve meme tümörü büyümesinin baskılandığı belirlenmiştir (102). Oxaliplatin uygulanan HCT-116 insan kolon kanseri hücre hattında STAT3 protein seviyeleri kontrol ile aynı seviyede kalırken p-STAT3 seviyesi kontrole kıyasla azalmıştır (103). Roberts ve ark.'nın (104) yaptığı çalışmada KR158 ve GL261 mürin glioma hücrelerinde Oxaliplatin uygulamasının doza bağlı bir şekilde p-STAT3 protein seviyesini azalttığı bildirilmiştir. Bu verilerle uyumlu olarak, yaptığımız çalışmada Oxaliplatin, Piceatannol ve özellikle iki ajanın kombinasyonunun STAT3 proteininin fosforilasyonunu inhibe ettiği, p-STAT3 protein seviyesinin tüm uygulama gruplarında kontrole göre belirgin şekilde azaldığı belirlendi. Aynı zamanda JAK2 protein seviyesinin de tüm uygulama gruplarında kontrole göre azalma gösterdiği saptandı (Şekil 21). IL6, IL6R aracılığı ile JAK tirozin kinazları aktive etmekte, aktifleşen JAK'lar da STAT'ları fosforile etmektedir. Fosforile edilen STAT'lar dimerleşerek çekirdeğe geçmekte, burada spesifik DNA yanıt elemanlarına bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu indüklemektedirler (105-107). Yaptığımız uygulamalar sonucunda fosforilasyonu inhibe edilen STAT3'ün hedef gen ekspresyonlarını başlatamadığı düşünüldü. Azalan protein seviyelerinin aksine IL6, IL6R, JAK1, JAK2 ve STAT3 gen seviyelerinin tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış gösterdiği saptandı (Şekil 20). STAT3'ü kalıcı olarak aktive eden malign tümörler, hücre canlılığının devam edebilmesi için STAT3'e bağımlı olmaktadır (84). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda STAT3 fosforilasyonunun inhibe edilmesine bir tepki olarak gen seviyelerinin arttığı düşünüldü. EGFR gen seviyesi Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol gruplarında kontrole göre değişiklik göstermezken, Oxaliplatin grubunda artış gösterdi. Bu artışın Troiani ve ark.'nın

(108) yaptığı çalışma ile tutarlı olduğu, hücrelerin Oxaliplatin uygulaması sonucunda canlılığın devam edebilmesi için EGFR'yi artırdığı düşünüldü. Bu sonuçlara göre, Oxaliplatin, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamalarının tümünün beklendiği gibi JAK/STAT sinyal yolağını etkili bir şekilde baskıladığı belirlendi.

TGF- β hücre büyümesini ve ölümünü, farklılaşmayı, bağışıklık tepkisini, anjiyogenezi ve inflamasyonu düzenleyen çok sayıda biyolojik sinyali indüklemek için plazma zarındaki protein kinaz reseptörleri üzerinde etki eden bir sitokin süper ailesine aittir. Bu yolağın düzensizliği, kanser de dahil olmak üzere çok çeşitli patolojilere katkıda bulunmaktadır. TGF- β , epitel hücrelerinde proliferasyonu erken inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği için önemli bir tümör baskılayıcı faktördür. Bununla birlikte tümör hücreleri, TGF- β 'nın neden olduğu baskılayıcı etkilerin üstesinden gelmek için mekanizmalar geliştirebilmekte ve bu etkilere direnç geliştğinde tümörün ilerlemesine katkıda bulunan diğer faktörleri de indükleyebilmektedirler (109). Prostat kanseri hücrelerinde TGF- β 1 ekspresyon seviyelerinin prognoz ile ilişki olup olmadığını araştıran çalışmalarda TGF- β 1'in malign prostat dokusunda benign prostat hiperplazisi numunelerine göre daha az eksprese edildiği bildirilmiştir (110,111). İnsan prostat kanseri LNCaP hücre hattında TGF β R1 ve TGF β R2 fonksiyonları geri kazandırıldığında malignitenin azaldığı rapor edilmiştir (10). Bazı çalışmalar ise prostat kanseri hücrelerinde daha yüksek TGF- β ekspresyonu olduğunu ancak hücrelerin TGF- β 'nın büyümeyi inhibe edici etkilerinden kaçınmak için TGF β R1 ve TGF β R2 ekspresyonlarını veya fonksiyonlarını azaltabildiğini bildirmiştir (112,113). Reseptör duyarlılığı azalan TGF- β 'nın ekspresyonu indüklenebilmekte ve daha agresif fenotiplere yol açabilmektedir (112). TGF- β ekspresyonunun azalması prostat kanserinin başlaması ve ilerlemesiyle ilgili olduğu gibi artması da, daha agresif tümörlerde daha çok eksprese edildiği için, tümör ilerlemesi ile ilişkili olabilmektedir (110).

TGF- β ligandı TGF β R2'ye bağlandığında, TGF β R1 fosforilasyonunu katalizleyerek SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin fosforilasyonunu tetiklemektedir. SMAD4 ile heteromerik kompleksler oluşturan SMAD2 ve SMAD3 çekirdeğe geçerek hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedirler (114). Çalışmamızda PC-3 hücre hattında Oxaliplatin uygulaması sonucunda TGF- β ve TGF β R2 gen seviyeleri kontrol seviyesinde kalırken, SMAD2 seviyesinin arttığı SMAD3 seviyesinin ise azaldığı saptandı (Şekil 22). Western blot analizi ile belirlenen TGF- β ve SMAD3 protein seviyeleri kontrole göre değişiklik göstermezken TGF β R2 ve SMAD2'nin kontrole göre azaldığı, p-SMAD2/3 seviyesinin ise arttığı belirlendi (Şekil 23). Jiang ve ark.'nın (115) yaptığı çalışmada insan kolon kanseri

HCT116 ve SW620 hücrelerine Oxaliplatin uygulanmış ve TGF- β , TGF β 2, SMAD2, SMAD3 gen seviyelerinin ve TGF- β , TGF β 2, p-SMAD2/3 protein seviyelerinin kontrole göre anlamlı bir azalma gösterdiği, Oxaliplatin'in kolon kanseri hücrelerinde TGF- β sinyal yolağını inhibe ettiği bildirilmiştir. Farklı hücre hatları kullanılmış olsa da Oxaliplatin uygulamamızın sonuçlarının genel olarak bu çalışma ile uyumlu olduğu görüldü. SMAD'ların gen transkripsiyonunu indüklemeye veya inhibe etme yeteneği, TGF- β ile sınırlı değildir (116). Bu yüzden p-SMAD2/3 protein seviyesindeki artışın farklı sinyal yolları aracılığı ile indüklenmiş olabileceği, Oxaliplatin'in PC-3 hücrelerindeki etkisinin TGF- β sinyal yolağı üzerinden olmadığı düşünüldü. Oxaliplatin+Piceatannol ve özellikle de Piceatannol uygulamalarının PC-3 hücrelerinde TGF- β sinyal yolağını indüklediği belirlendi. Her iki uygulama sonrasında da TGF- β , TGF β 2, p-SMAD2/3 protein seviyelerinin kontrole göre belirgin bir şekilde arttığı, SMAD2 ve SMAD3 seviyelerinin ise azaldığı görüldü (Şekil 23). qRT-PCR ile belirlenen gen seviyeleri incelendiğinde, her iki uygulama sonrasında da TGF- β gen seviyelerinin kontrole göre artış gösterdiği, TGF β 2'nin azaldığı SMAD2'nin ise kontrol seviyesinde kaldığı saptandı. Piceatannol tekli uygulaması ile SMAD3 gen seviyesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken, kombine uygulama ile meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 22).

Tang ve ark. (60) aktive edilen STAT3'ün hem fosforile hem de fosforile olmayan SMAD3 ile etkileşime girebildiğini bildirmişlerdir. Bu bilgi doğrultusunda, çalışmamızda STAT3'ün fosforilasyonu inhibe edildiğinde p-SMAD2/3 protein seviyesinin arttığı görüldü (Şekil 23). SMAD2 ve SMAD3 protein seviyesindeki azalmaların p-SMAD2/3 kompleksinin oluşumundan dolayı olabileceği, bu sonuçların SMAD3 ile STAT3 arasındaki çapraz etkileşimi destekleyebileceği düşünüldü.

Otuz yılı aşkın bir süredir, klinik onkolojinin temel dayanağı ve hedefi, kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla etkin bir şekilde ortadan kaldırılmasını destekleyen tedavilerin geliştirilmesi olmuştur. Bu programlanmış hücre ölümü sürecine hücrel stres, DNA hasarı ve immün takip dahil olmak üzere birçok faktör tarafından tetiklenen içsel ve dışsal sinyal yolları aracılık etmektedir (117). Dışsal yolağa hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aracılık ederken, içsel yolak mitokondride başlatılmaktadır. Her iki yoldaki merkezi düzenleyici proteinler kaspazlardır (118). İçsel yolakta apoptozun aktivasyonu, stresli hücrelerden gelen hücre içi sinyallerle başlamakta ve mitokondriyal zarlar arası boşlukta sitokrom-C'nin sitoplazmik salınımına bağlı olarak meydana gelmektedir. BCL2 ailesi proteinleri mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin ana düzenleyicileri ve efektörleridir (119). Pro-

apoptotik (BAX) ve anti-apoptotik (BCL2) proteinlerin oranı hücre kaderini belirlemektedir. Pro-apoptotik proteinlerin inaktivasyonu karsinogenezin önemli bir özelliğidir (62). Dışsal yolak, ölüm reseptörleri olarak bilinen hücre zarı proteinleri tarafından başlatılmaktadır. Pro-apoptotik ölüm reseptörlerinin hücre içi alanları, ölüm alanı olarak adlandırılan korunmuş bir protein-protein etkileşim alanını içermektedir. Ligand bağlanması üzerine, ölüm reseptörleri hücre zarı içinde trimerize olmaktadır. Daha sonra adaptör proteinler, Kaspaz 8 ve Kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların alınmasıyla apoptoz indüklenmektedir (117).

Androjene bağımlı LNCaP-Pro5 ve LNCaP-LN3, apoptoza dirençli androjenden bağımsız PC-3 ve insan prostat epitel hücreleri PrEC'de Oxaliplatin'in apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kantitatif DNA fragmentasyon çalışması ile, Oxaliplatin'in her üç prostat kanseri hücre hattında da apoptozu indüklediği ve kanser hücrelerinin aksine sağlıklı hücrenin Oxaliplatin'in apoptotik etkilerine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (5). Oxaliplatin uygulamasının dört farklı kolorektal kanser hücresinde (HCT116, RKO, RW2982 ve SW403), BAX'ın mitokondriye alınması, sitokrom-C'nin sitozole salınması ve Kaspaz 3 aktivasyonu ile sonuçlandığı, böylece içsel apoptotik yolağın indüklendiği gösterilmiştir. Aynı zamanda Oxaliplatin uygulamasından sonra p53 protein seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (120). HCT116 hücrelerinde Oxaliplatin'in, apoptotik sürecin pozitif bir göstergesi olan BAX/BCL2 oranını önemli ölçüde artırdığı (121), insan mide kanseri AGS hücre hattında BAX ekspresyonunun artmasına BCL2'nin ise azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir (122). Piceatannol'un DU-145 hücrelerinde mitokondriden sitozole sitokrom-C salınımını artırdığı, BAX seviyesinin yükselmesine sebep olduğu, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 ekspresyonunu artırarak hem içsel hem de dışsal apoptotik yolları indüklediği bildirilmiştir (12). HCT116, HT29 (123), U937 (124), WM266-4 ve A2058 (125) hücre hatlarında Piceatannol uygulaması sonrasında BCL2 protein seviyesinin kontrole göre azalma gösterdiği, BAX seviyesinin arttığı ve aynı zamanda Kaspaz 3 aktivasyonunun gerçekleştiği bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 3, p53, BAX gen ekspresyonlarının kontrole göre artış gösterirken BCL2'nin ise azaldığı bildirilmiştir (126). Literatür verilerini destekler şekilde çalışmamızda tüm uygulama gruplarında BAX/BCL2 oranında belirgin bir artış olduğu saptandı. Oxaliplatin+Piceatannol uygulaması sonrasında PC-3 hücrelerinde p53 geninin kontrole göre 981 kat artış gösterdiği aynı zamanda Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 gen seviyelerinin de arttığı belirlendi. Piceatannol tekli uygulaması ile de Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 gen seviyelerinin kontrole göre artış gösterdiği saptandı (Şekil 24). Bu sonuçlara göre Oxaliplatin uygulamasının içsel yolak, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamalarının hem içsel hem de dışsal yolak aracılığı ile PC-3

hücrelerinde apoptotik yanıt oluşturduğu düşünöldü. En yüksek apoptotik yanıtın kombine uygulama ile oluşturduğu belirlendi.



SONUÇLAR

Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan Oxaliplatin ve fenolik bir bileşik olan Piceatannol'un tekli ve kombine uygulamalarının insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında hücre canlılığına, TGF- β , JAK/STAT ve apoptoz sinyal yollarına olan etkisinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda;

1. Oxaliplatin ve Piceatannol uygulamaları sonucunda PC-3 hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir ölüm meydana geldiği, en etkili uygulama süresi olan 48 saat için IC₅₀ dozlarının sırasıyla 64 μ M ve 57 μ M olduğu belirlendi.

2. Oxaliplatin, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamalarının tümünün JAK/STAT sinyal yolağını etkili bir şekilde inhibe ettiği belirlendi. Protein seviyelerine göre JAK/STAT sinyal yolağı üzerinde en etkili olan uygulamanın Oxaliplatin+Piceatannol kombinasyonu olduğu, bunu sırasıyla Oxaliplatin ve Piceatannol'un takip ettiği saptandı.

3. Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamalarının PC-3 hücre hattında beklendiği şekilde TGF- β sinyal yolağını indüklediği ancak Oxaliplatin'in etkisinin bu yolak üzerinden olmadığı tespit edildi.

4. Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamaları ile PC-3 hücrelerinde STAT3'un inhibe edilmesiyle birlikte TGF- β sinyal yolağı indüklendi. Bu sonucun STAT3-SMAD3 çapraz etkileşimini desteklediği düşünüldü.

5. PC-3 hücrelerinde tüm uygulama gruplarında BAX/BCL2 oranının arttığı ve hücrelerde mitokondriyal apoptotik yanıtın oluştuğu saptandı. Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamaları ile Kaspaz 8 gen seviyesinin de arttığı ve içsel apoptotik yolakla birlikte dışsal yolağın da indüklendiği belirlendi.

6. Sonuç olarak Oxaliplatin, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamalarının

tümü PC-3 hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe etti ve apoptozu indükledi. TGF- β sinyal yolağını en fazla indükleyen ajan Piceatannol olurken, Oxaliplatin+Piceatannol kombinasyonun JAK/STAT sinyal yolağının bastırılmasında en etkili uygulama olduğu belirlendi. En güçlü apoptotik yanıtın Oxaliplatin+Piceatannol ile olduğu saptandı.



ÖZET

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür. Lokalize durumda olan kanser vakalarında sağkalım oranları yüksek olsa da metastatik hastalarda oldukça düşmektedir. İleri evre prostat kanserinde kemoterapiye başvurulmaktadır ancak kemoterapi orta düzey etkinlik gösterdiği için yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Prostat kanseri metastazından sorumlu olan faktörlerden biri Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) sinyal yolağının bozulmasıdır. Bu yüzden prostat kanserinde TGF- β sinyal yolağı fonksiyonlarının düzenlenmesinin etkili bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

Platin bazlı bir kemoterapötik ajan olan Oxaliplatin, diğer ajanlara göre hem daha etkili hem de daha az toksiktir. Kastrasyona dirençli prostat kanserinde başarılı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Piceatannol, antitümör özelliği olduğu bilinen resveratrolün analogudur. Son yıllarda yapılan çalışmalar Piceatannol'un de antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümör özellik gösterdiğini bildirmektedir. STAT3 inhibitörü olduğu bilinen Piceatannol'un, SMAD3-STAT3 çapraz etkileşimi aracılığıyla TGF- β sinyal yolağı üzerindeki inhibisyonu ortadan kaldırabileceği düşünülmekte ve tümör baskılayıcı bir etki göstermesi beklenmektedir.

Bu çalışmada, Oxaliplatin+Piceatannol kombinasyonunun insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında TGF- β , JAK/STAT sinyal yolları ve apoptoz üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla Oxaliplatin, Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol kombinasyonunun PC-3 hücrelerindeki hücre canlılığına olan etkisi MTT testi ile belirlendi. Bu uygulamaların TGF- β , JAK/STAT ve apoptoz sinyal yollarındaki etkileri qRT-PCR ve western blot analizi ile araştırıldı. Oxaliplatin ve Piceatannol uygulamaları ile PC-3 hücre canlılığı doza ve zamana bağlı bir şekilde azaldı. JAK/STAT sinyal yolağı tüm uygulamalarda inhibe edilirken en etkili olan uygulamanın Oxaliplatin+Piceatannol olduğu belirlendi.

Beklendiği Şekilde Piceatannol ve Oxaliplatin+Piceatannol uygulamalarında TGF- β sinyal yolağının indüklediği bulundu. Tekli ve kombine uygulamaların tümü hücrelerde mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptotik yanıt oluŐturdu.

Bu sonuçlara göre Oxaliplatin ve Piceatannol kombinasyonunun prostat kanseri tedavisinde etkili bir yaklaşım olabileceği düşünölmektedir. Ancak bu sonucun desteklenmesi için *in-vitro* ve *in-vivo* olarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, PC-3, Oxaliplatin, Piceatannol, TGF- β , JAK/STAT sinyal yolağı



CYTOTOXIC EFFECT OF OXALIPLATIN AND STAT3 INHIBITOR PICEATANNOL COMBINATION IN HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE PC-3 VIA TGF- β SIGNALLING PATHWAY

SUMMARY

Prostate cancer is the second most common cancer in men. Although survival rates are high in localized cancer cases, metastatic patients have lower survival rates. Chemotherapy is a common treatment in advanced prostate cancer, however due to its moderate efficacy alternative treatments are required. Disruption of the Transforming Growth Factor β (TGF- β) signaling pathway is one of the factors responsible for prostate cancer metastasis. Therefore, regulation of TGF- β signaling pathway functions in prostate cancer is thought to be an effective treatment.

Oxaliplatin, a platinum-based chemotherapeutic agent, is more effective and less toxic than other agents. There are studies indicated that it is also efficient in castration-resistant prostate cancer. Piceatannol is a compound that is an analogue of Resveratrol, which has anticancer properties. Recent studies have reported that Piceatannol also has antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. Piceatannol, which is known to be a STAT3 inhibitor, is thought to abolish the inhibition on the TGF- β signaling pathway through SMAD3-STAT3 cross-talk, and thus is expected to have a tumor suppressive effect.

In this study, we aimed to determine the effectiveness of Oxaliplatin+Piceatannol combination on TGF- β , JAK/STAT signaling pathways and apoptosis in human prostate cancer PC-3 cell line. For this purpose, the efficacy of Oxaliplatin, Piceatannol and Oxaliplatin+Piceatannol combination on cell viability in PC-3 cells was determined by MTT

assay. The effects of these treatments on TGF- β , JAK/STAT and apoptosis signaling pathways were investigated by qRT-PCR and Western Blot analysis. PC-3 cell viability decreased in a dose and time dependent manner with Oxaliplatin and Piceatannol treatments. All treatments inhibited the JAK/STAT signaling pathway and it was determined that the most efficient treatment was Oxaliplatin+Piceatannol. As we expected, Piceatannol and Oxaliplatin+Piceatannol treatments induced TGF- β signaling pathway. All single and combined treatments induced an apoptotic response in cells via the mitochondrial pathway.

These results suggest that the combination of Oxaliplatin and Piceatannol may be an effective approach in the treatment of prostate cancer. However, to support our results *in-vitro* and *in-vivo* studies should be further investigated.

Keywords: Prostate cancer, PC-3, Oxaliplatin, Piceatannol, TGF- β , JAK/STAT signaling pathway

KAYNAKLAR

1. Ruddon RW. Cancer biology: Oxford University Press, 2007:4.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
3. Nevedomskaya E, Baumgart SJ, Haendler B. Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1359.
4. Zhou J, Yang T, Liu L, Lu B. Chemotherapy oxaliplatin sensitizes prostate cancer to immune checkpoint blockade therapies via stimulating tumor immunogenicity. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):2868-74.
5. Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(2):225-37.
6. Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(11):1914-27.
7. Shad PM, Karizi SZ, Javan RS, Mirzaie A, Noorbazargan H, Akbarzadeh I, et al. Folate conjugated hyaluronic acid coated alginate nanogels encapsulated oxaliplatin enhance antitumor and apoptosis efficacy on colorectal cancer cells (HT29 cell line). *Toxicol In Vitro.* 2020;65:104756.
8. Wa Q, Li L, Lin H, Peng X, Ren D, Huang Y, et al. Downregulation of miR19a3p promotes invasion, migration and bone metastasis via activating TGFbeta signaling in prostate cancer. *Oncol Rep.* 2018;39(1):81-90.
9. Tu WH, Thomas TZ, Masumori N, Bhowmick NA, Gorska AE, Shyr Y, et al. The loss of TGF-beta signaling promotes prostate cancer metastasis. *Neoplasia.* 2003;5(3):267-77.

10. Danielpour D. Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate. *Eur J Cancer*. 2005;41(6):846-57.
11. Banik K, Ranaware AM, Harsha C, Nitesh T, Girisa S, Deshpande V, et al. Piceatannol: A natural stilbene for the prevention and treatment of cancer. *Pharmacol Res*. 2020;153:104635.
12. Kim EJ, Park H, Park SY, Jun JG, Park JH. The grape component piceatannol induces apoptosis in DU145 human prostate cancer cells via the activation of extrinsic and intrinsic pathways. *J Med Food*. 2009;12(5):943-51.
13. Lee YM, Lim DY, Cho HJ, Seon MR, Kim JK, Lee BY, et al. Piceatannol, a natural stilbene from grapes, induces G1 cell cycle arrest in androgen-insensitive DU145 human prostate cancer cells via the inhibition of CDK activity. *Cancer Lett*. 2009;285(2):166-73.
14. Kido LA, Hahm ER, Kim SH, Baseggio AM, Cagnon VHA, Singh SV, et al. Prevention of Prostate Cancer in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Mice by Yellow Passion Fruit Extract and Antiproliferative Effects of Its Bioactive Compound Piceatannol. *J Cancer Prev*. 2020;25(2):87-99.
15. Kwon GT, Jung JI, Song HR, Woo EY, Jun JG, Kim JK, et al. Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased interleukin-6 signaling. *J Nutr Biochem*. 2012;23(3):228-38.
16. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(3):565-75, viii-ix.
17. Dunn MW, Kazer MW, editors. Prostate cancer overview. *Seminars in oncology nursing*; 2011: Elsevier.
18. What Is Prostate Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html>. Erişim Tarihi: 14.07.2021.
19. Hammerich KH, Ayala GE, Wheeler TM. Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. Cambridge University, Cambridge. 2009:1-10.
20. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003;62(6 Suppl 1):3-12.
21. Kirby R, Montorsi F, Smith JA, Gontero P. Radical prostatectomy: From open to robotic: CRC Press; 2007.
22. 2020 Kanser İstatistikleri. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. Erişim Tarihi: 14.07.2021.
23. 2020 Türkiye Kanser İstatistikleri. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>. Erişim tarihi:

14.07.2021.

24. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019;10(2):63-89.
25. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12):a030361.
26. Patel AR, Klein EA. Risk factors for prostate cancer. *Nature Clinical Practice Urology.* 2009;6(2):87-95.
27. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, et al. Prevention and early detection of prostate cancer. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):e484-92.
28. Gann PH. Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol.* 2002;4 Suppl 5(Suppl 5):S3-S10.
29. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* 2003;361(9360):859-64.
30. Sharma S, Zapatero-Rodriguez J, O'Kennedy R. Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnol Adv.* 2017;35(2):135-49.
31. Hoffman RM. Screening for prostate cancer. *New England Journal of Medicine.* 2011;365(21):2013-9.
32. Tabayoyong W, Abouassaly R. Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. *Surg Clin North Am.* 2015;95(5):1023-39.
33. Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl.* 2009;11(1):74-80.
34. Catalona WJ, Southwick PC, Slawin KM, Partin AW, Brawer MK, Flanigan RC, et al. Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology.* 2000;56(2):255-60.
35. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA.* 1993;270(7):860-4.
36. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(5):363-85.
37. Jin JK, Dayyani F, Gallick GE. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *International Journal of Cancer.* 2011;128(11):2545-61.
38. Nuhn P, De Bono JS, Fizazi K, Freedland SJ, Grilli M, Kantoff PW, et al. Update on

Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology. *Eur Urol.* 2019;75(1):88-99.

39. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796(2):293-308.

40. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011;331(6024):1559-64.

41. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(6):449-58.

42. Laranga R, Duchi S, Ibrahim T, Guerrieri AN, Donati DM, Lucarelli E. Trends in Bone Metastasis Modeling. *Cancers (Basel).* 2020;12(8):2315.

43. Ye L, Kynaston HG, Jiang WG. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms (Review). *Int J Mol Med.* 2007;20(1):103-11.

44. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet.* 1889;133(3421):571-3.

45. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):285-93.

46. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis Results from Preexisting Variant Cells within a Malignant-Tumor. *Science.* 1977;197(4306):893-5.

47. Hart IR, Fidler IJ. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res.* 1980;40(7):2281-7.

48. Zhao H, Wei J, Sun J. Roles of TGF-beta signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy. *Int Immunopharmacol.* 2020;89(Pt B):107101.

49. Huang S, Wa Q, Pan J, Peng X, Ren D, Li Q, et al. Transcriptional downregulation of miR-133b by REST promotes prostate cancer metastasis to bone via activating TGF-beta signaling. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):779.

50. Wang G, Yu Y, Sun C, Liu T, Liang T, Zhan L, et al. STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF- β . *Oncogene.* 2016;35(33):4388-98.

51. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008;134(2):215-30.

52. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3-4):553-68.

53. Turley RS, Finger EC, Hempel N, How T, Fields TA, Blobe GC. The type III transforming growth factor- β receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(3):1090-8.
54. Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106210.
55. Hin Tang JJ, Hao Thng DK, Lim JJ, Toh TB. JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma. *Hepat Oncol*. 2020;7(1):HEP18.
56. Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*. 2000;37(1-2):1-11.
57. Bishop JL, Thaper D, Zoubeidi A. The Multifaceted Roles of STAT3 Signaling in the Progression of Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2014;6(2):829-59.
58. Luo K. Signaling cross talk between TGF- β /Smad and other signaling pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(1):a022137.
59. Itoh Y, Saitoh M, Miyazawa K. Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018;50(1):82-90.
60. Tang LY, Heller M, Meng Z, Yu LR, Tang Y, Zhou M, et al. Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway. *J Biol Chem*. 2017;292(10):4302-12.
61. Yoon J-H, Sudo K, Kuroda M, Kato M, Lee I-K, Han JS, et al. Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH 17 differentiation. *Nature communications*. 2015;6(1):1-14.
62. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):205-18.
63. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
64. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):448.
65. Fathi N, Rashidi G, Khodadadi A, Shahi S, Sharifi S. STAT3 and apoptosis challenges in cancer. *Int J Biol Macromol*. 2018;117:993-1001.
66. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):87.
67. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

68. Culy CR, Clemett D, Wiseman LR. Oxaliplatin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs*. 2000;60(4):895-924.
69. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*. 2011;18(1):18-25.
70. Droz JP, Muracciole X, Mottet N, Ould Kaci M, Vannetzel JM, Albin N, et al. Phase II study of oxaliplatin versus oxaliplatin combined with infusional 5-fluorouracil in hormone refractory metastatic prostate cancer patients. *Ann Oncol*. 2003;14(8):1291-8.
71. Hsieh T-C, Lin C-Y, Lin H-Y, Wu JM. AKT/mTOR as novel targets of polyphenol piceatannol possibly contributing to inhibition of proliferation of cultured prostate cancer cells. *International Scholarly Research Notices*. 2012;2012.
72. Seyed MA, Jantan I, Bukhari SN, Vijayaraghavan K. A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. *J Agric Food Chem*. 2016;64(4):725-37.
73. Kukreja A, Wadhwa N, Tiwari A. Therapeutic role of resveratrol and piceatannol in disease prevention. *J Blood Disord Transfus*. 2014;5(240):9.
74. ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-1435#detailed-product-information>. Erişim Tarihi: 11.09.2021.
75. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol*. 2020;77(1):38-52.
76. Barani M, Sabir F, Rahdar A, Arshad R, Kyzas GZ. Nanotreatment and Nanodiagnosis of Prostate Cancer: Recent Updates. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(9):1696.
77. Powers E, Karachaliou GS, Kao C, Harrison MR, Hoimes CJ, George DJ, et al. Novel therapies are changing treatment paradigms in metastatic prostate cancer. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):144.
78. Marzo T, Ferraro G, Cucci LM, Pratesi A, Hansson O, Satriano C, et al. Oxaliplatin inhibits angiogenic proliferative and cell migration effects in prostate cancer cells. *J Inorg Biochem*. 2022;226:111657.
79. Dorff TB, Tsao-Wei DD, Groshen S, Boswell W, Goldkorn A, Xiong S, et al. Efficacy of oxaliplatin plus pemetrexed in chemotherapy pretreated metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2013;11(4):416-22.
80. Nayyab S, Naureen H, Maryam A, Attar R, Sabitaliyevich UY, Konysbayevna KK, et al. Piceatannol mediated regulation of deregulated signaling pathways in different cancers: Tumbling of the ninepins of molecular oncology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*.

2020;66(6):157-63.

81. Zheng M, Wu Y. Piceatannol suppresses proliferation and induces apoptosis by regulation of the microRNA21/phosphatase and tensin homolog/protein kinase B signaling pathway in osteosarcoma cells. *Mol Med Rep.* 2020;22(5):3985-93.
82. Su L, David M. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J Biol Chem.* 2000;275(17):12661-6.
83. Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol.* 2012;30(9):1005-14.
84. Barton BE, Karras JG, Murphy TF, Barton A, Huang HF. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(1):11-20.
85. Hu Z, Gupta J, Zhang Z, Gerseny H, Berg A, Chen YJ, et al. Systemic delivery of oncolytic adenoviruses targeting transforming growth factor-beta inhibits established bone metastasis in a prostate cancer mouse model. *Hum Gene Ther.* 2012;23(8):871-82.
86. Javelaud D, Mohammad KS, McKenna CR, Fournier P, Luciani F, Niewolna M, et al. Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res.* 2007;67(5):2317-24.
87. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, et al. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest.* 1999;103(2):197-206.
88. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(11):788-99.
89. Luwor RB, Baradaran B, Taylor LE, Iaria J, Nheu TV, Amiry N, et al. Targeting Stat3 and Smad7 to restore TGF-beta cytosstatic regulation of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2013;32(19):2433-41.
90. Ma J, Wang Q, Yang X, Hao W, Huang Z, Zhang J, et al. Glycosylated platinum(iv) prodrugs demonstrated significant therapeutic efficacy in cancer cells and minimized side-effects. *Dalton Trans.* 2016;45(29):11830-8.
91. Ma J, Yang XD, Hao WP, Huang ZL, Wang X, Wang PG. Mono-functionalized glycosylated platinum(IV) complexes possessed both pH and redox dual-responsive properties: Exhibited enhanced safety and preferentially accumulated in cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017;128:45-55.
92. Barbanente A, Iacobazzi RM, Azzariti A, Hoeschele JD, Denora N, Papadia P, et al.

New Oxaliplatin-Pyrophosphato Analogs with Improved In Vitro Cytotoxicity. *Molecules*. 2021;26(11):3417.

93. Dias SJ, Li K, Rimando AM, Dhar S, Mizuno CS, Penman AD, et al. Trimethoxy- Resveratrol and Piceatannol Administered Orally Suppress and Inhibit Tumor Formation and Growth in Prostate Cancer Xenografts. *The Prostate*. 2013;73(11):1135-46.

94. Luo N, Balko JM. Role of JAK-STAT pathway in cancer signaling. Predictive biomarkers in oncology. 2019:311-9.

95. Bose S, Banerjee S, Mondal A, Chakraborty U, Pumarol J, Croley CR, et al. Targeting the JAK/STAT Signaling Pathway Using Phytocompounds for Cancer Prevention and Therapy. *Cells*. 2020;9(6):1451.

96. Culig Z, Pühr M. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;360(1-2):52-8.

97. Lou W, Ni Z, Dyer K, Tweardy DJ, Gao AC. Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway. *Prostate*. 2000;42(3):239-42.

98. Tam L, McGlynn LM, Traynor P, Mukherjee R, Bartlett JM, Edwards J. Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer*. 2007;97(3):378-83.

99. Don-Doncow N, Marginean F, Coleman I, Nelson PS, Ehrnstrom R, Krzyzanowska A, et al. Expression of STAT3 in Prostate Cancer Metastases. *Eur Urol*. 2017;71(3):313-6.

100. Abdulghani J, Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, et al. Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. *Am J Pathol*. 2008;172(6):1717-28.

101. Kroon P, Berry PA, Stower MJ, Rodrigues G, Mann VM, Simms M, et al. JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells. *Cancer Res*. 2013;73(16):5288-98.

102. Song H, Jung JI, Cho HJ, Her S, Kwon SH, Yu R, et al. Inhibition of tumor progression by oral piceatannol in mouse 4T1 mammary cancer is associated with decreased angiogenesis and macrophage infiltration. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;26(11):1368-78.

103. Cross-Knorr S, Lu SL, Perez K, Guevara S, Brilliant K, Pisano C, et al. RKIP phosphorylation and STAT3 activation is inhibited by oxaliplatin and camptothecin and are associated with poor prognosis in stage II colon cancer patients. *Bmc Cancer*. 2013;13(1):1-13.

104. Roberts NB, Alqazzaz A, Hwang JR, Qi X, Keegan AD, Kim AJ, et al. Oxaliplatin

disrupts pathological features of glioma cells and associated macrophages independent of apoptosis induction. *J Neurooncol.* 2018;140(3):497-507.

105. Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2000;60(5):1225-8.

106. Alas S, Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):316-26.

107. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999;10(1):105-15.

108. Troiani T, Lockerbie O, Morrow M, Ciardiello F, Eckhardt SG. Sequence-dependent inhibition of human colon cancer cell growth and of prosurvival pathways by oxaliplatin in combination with ZD6474 (Zactima), an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(7):1883-94.

109. Fabregat I, Fernando J, Mainez J, Sancho P. TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2014;20(17):2934-47.

110. Reis STd, Pontes-Júnior J, Antunes AA, Sousa-Canavez JMd, Abe DK, Cruz JASd, et al. Tgf- β 1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer. *Clinics.* 2011;66:1143-7.

111. Soultzis N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol.* 2006;29(2):305-14.

112. Barrack ER. TGF β in prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. *The Prostate.* 1997;31(1):61-70.

113. Jones E, Pu H, Kyprianou N. Targeting TGF-beta in prostate cancer: therapeutic possibilities during tumor progression. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(2):227-34.

114. Xia Q, Li C, Bian P, Wang J, Dong S. Targeting SMAD3 for inhibiting prostate cancer metastasis. *Tumour Biol.* 2014;35(9):8537-41.

115. Jiang Z, Cao Q, Dai G, Wang J, Liu C, Lv L, et al. Celastrol inhibits colorectal cancer through TGF- β 1/Smad signaling. *OncoTargets and therapy.* 2019;12:509.

116. Wrana JL. Regulation of Smad activity. *Cell.* 2000;100(2):189-92.

117. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395-417.

118. Khan KH, Blanco-Codecido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;90(3):200-19.
119. Kakarla R, Hur J, Kim YJ, Kim J, Chwae YJ. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Exp Mol Med*. 2020;52(1):1-6.
120. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Aranes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2004;91(11):1931-46.
121. Therachiyil L, Haroon J, Sahir F, Siveen KS, Uddin S, Kulinski M, et al. Dysregulated Phosphorylation of p53, Autophagy and Stemness Attributes the Mutant p53 Harboring Colon Cancer Cells Impaired Sensitivity to Oxaliplatin. *Front Oncol*. 2020;10:1744.
122. Florou D, Patsis C, Ardavanis A, Scorilas A. Effect of doxorubicin, oxaliplatin, and methotrexate administration on the transcriptional activity of BCL-2 family gene members in stomach cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(7):587-96.
123. Zhang H, Jia R, Wang C, Hu T, Wang F. Piceatannol promotes apoptosis via up-regulation of microRNA-129 expression in colorectal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):775-81.
124. Kim YH, Park C, Lee JO, Kim GY, Lee WH, Choi YH, et al. Induction of apoptosis by piceatannol in human leukemic U937 cells through down-regulation of Bcl-2 and activation of caspases. *Oncology Reports*. 2008;19(4):961-7.
125. Du MT, Zhang Z, Gao T. Piceatannol induced apoptosis through up-regulation of microRNA-181a in melanoma cells. *Biological Research*. 2017;50.
126. Algandaby MM, Al-Sawahli MM. Augmentation of anti-proliferative, pro-apoptotic and oxidant profiles induced by piceatannol in human breast carcinoma MCF-7 cells using zein nanostructures. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;138:111409.

ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Prostat bezinin anatomisi	3
Şekil 2. Prostat bezinin zonları	4
Şekil 3. GLOBOCAN 2020 Türkiye kanser verileri.....	5
Şekil 4. GLOBOCAN 2020 Türkiye erkekler için kanser verileri.....	5
Şekil 5. Tümör ilerlemesi ve metastatik süreç	13
Şekil 6. TGF- β sinyal yolağı	16
Şekil 7. JAK/STAT sinyal yolu	18
Şekil 8. İçsel ve dışsal apoptotik yollar	21
Şekil 9. Oxaliplatin'in kimyasal yapısı	23
Şekil 10. Piceatannol'ün kimyasal yapısı	25
Şekil 11. PC-3 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).....	29
Şekil 12. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μ M doz aralıklarında 24 saat süreyle Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	41
Şekil 13. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μ M doz aralıklarında 48 saat süreyle Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	42

Şekil 14. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μ M doz aralıklarında 72 saat süreyle Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	43
Şekil 15. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μ M doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saatlik Oxaliplatin uygulamasının MTT testi verileriyle yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değerleri	44
Şekil 16. PC-3 hücre hattında 1-120 μ M doz aralıklarında 24 saat süreyle Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	47
Şekil 17. PC-3 hücre hattında 1-120 μ M doz aralıklarında 48 saat süreyle Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	48
Şekil 18. PC-3 hücre hattında 1-120 μ M doz aralıklarında 72 saat süreyle Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi ve MTT plakası, n=5, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	49
Şekil 19. PC-3 hücre hattında 1-120 μ M doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saatlik Piceatannol uygulamasının MTT testi verileriyle yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değerleri	50
Şekil 20. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında qRT-PCR ile belirlenen IL6, IL6R, JAK1, JAK2, STAT3, EGFR gen ifadelerine ait relatif kat değişimleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi, ortalama \pm standart hata, * Kontrol ve uygulama grubu karşılaştırması, **Uygulama grupları karşılaştırması, veriler istatistiksel olarak farklıdır, Independent t-test, $P \leq 0.05$	54
Şekil 21. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında STAT3, p-STAT3, JAK2 ve β -Aktin protein bantlarının görüntüsü.....	55
Şekil 22. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında qRT-PCR ile belirlenen TGF- β , TGF β R2, SMAD2, SMAD3 gen ifadelerine ait relatif kat değişimleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi, ortalama \pm standart hata, * Kontrol ve uygulama grubu karşılaştırması, **Uygulama grupları karşılaştırması, veriler istatistiksel olarak farklıdır, Independent t-test, $P \leq 0.05$	57
Şekil 23. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında TGF- β , TGF β -R2, p-SMAD2/3, SMAD2, SMAD3 ve β -Aktin protein bantlarının görüntüsü.....	58

Şekil 24. PC-3 hücre hattında Kontrol (K), Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) gruplarında qRT-PCR ile belirlenen p53, BCL2, BAX, Kaspaz 3, Kaspaz 8 gen ifadelerine ait relatif kat değişimleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi, ortalama \pm standart hata, * Kontrol ve uygulama grubu karşılaştırması, **Uygulama grupları karşılaştırması, veriler istatistiksel olarak farklıdır, Independent t-test, $P \leq 0.05$ 60

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Yaşa özgü serum PSA konsantrasyonları (35)	10
Tablo 2. TNM evreleme sistemi (33).....	11
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan malzemeler.....	27
Tablo 5. cDNA sentezi için gereken malzemeler ve miktarları (1 reaksiyon için).....	33
Tablo 6. cDNA sentezi PCR koşulları	33
Tablo 7. qRT-PCR için kullanılan primerler ve baz dizileri.....	34
Tablo 8. qRT-PCR koşulları	36
Tablo 9. PC-3 hücre hattında 3,125-400 μ M doz aralıklarında 24, 48, 72 saatlik Oxaliplatin uygulamasının hücre canlılığına etkisi	45
Tablo 10. Oxaliplatin doz-zaman ilişkisine ait Pearson korelasyon tablosu	46
Tablo 11. PC-3 hücre hattında 1-120 μ M doz aralıklarında 24, 48, 72 saatlik Piceatannol uygulamasının hücre canlılığına etkisi	51
Tablo 12. Piceatannol doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.....	52
Tablo 13. PC-3 hücre hattında 48 saat süreyle Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) uygulamaları sonucu, Kontrol grubuna (K) kıyasla belirlenen JAK/STAT sinyal yolağı relatif gen ekspresyon değerleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; ortalama \pm standart hata, tek yönlü ANOVA- Independent t-test, $P \leq 0.05$	53
Tablo 14. PC-3 hücre hattında 48 saat süreyle Oxaliplatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliplatin+Piceatannol (O+P) uygulamaları sonucu, Kontrol grubuna (K) kıyasla belirlenen TGF- β sinyal yolağı relatif gen ekspresyon değerleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; ortalama \pm standart hata, tek yönlü ANOVA- Independent t-test, $P \leq 0.05$	56

Tablo 15. PC-3 hücre hattında 48 saat süreyle Oxaliptatin (O), Piceatannol (P) ve Oxaliptatin+Piceatannol (O+P) uygulamaları sonucu, Kontrol grubuna (K) kıyasla belirlenen Apoptoz sinyal yolağı relatif gen ekspresyon değerleri. Veriler GAPDH, β -Aktin ve 18S ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; ortalama \pm standart hata, tek yönlü ANOVA- Independent t-test, $P \leq 0.05$59



ÖZGEÇMİŞ

2014 yılında Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi'nden mezun oldum. Aynı sene Ege Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik bölümünde başladığım lisans eğitimimi 2018 yılında tamamladım. 2020 Ocak ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Eğitimim sırasında 1,5 sene süre ile Prof. Dr. Ahmet Bayram'ın yürütücülüğünü yaptığı "Subletal Pestisit Dozlarının Telenomus Busseolae (Hymenoptera: Scelionidae) Erginlerinin Biyolojik Özellikleri, Konukçu Bulma ve Terk Etme Davranışlarına Etkileri ve Parazitoitin Geliştirdiği Hormetik Mekanizmanın Biyokimyasal ve Moleküler Temelleri" başlıklı 1190432 nolu TÜBİTAK projesinde proje bursiyeri olarak çalıştım.

Ulusal ve Uluslararası Yayınlar

- 1) Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Chasan, T., & Kurtdere, A. K. (2021). Prolonged sub-lethal exposure to galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) promotes the metastatic potential of glioblastoma tumor spheroids. *NeuroToxicology*, 87, 219-230.
- 2) Doğanlar, Z. B., Doğanlar, O., Kurtdere, K., Güçlü, H., Chasan, T., & Turgut, E. (2021). Melatonin prevents blood-retinal barrier breakdown and mitochondrial dysfunction in high glucose and hypoxia-induced in vitro diabetic macular edema model. *Toxicology in Vitro*, 75, 105191.
- 3) Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Kurtdere, A. K., Chasan, T., & Ok, E. S. (2020). Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced

multidrug resistance against chemotherapy agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110940.

4) Tourkian CHASAN, Ayşe Kardelen KURTDERE, Zeynep Banu DOĞANLAR, Oğuzhan DOĞANLAR. Uzun Süreli Kronik Pestisit Kontaminasyonu Nöroblastoma Hücrelerinde Kemoterapi Ajanlarına Karşı Çoklu İlaç Direncini İndükler. 6. Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırmaları Kongresi (UTSAK). 10-11 Nisan 2021 Ankara/Türkiye Online. Tam metin bildiri.

Görev Aldığım Projeler

- 1) Sentetik Muskuların 3 Boyutlu Beyin Tümör Modelinde Hipoksi ile İndüklenen Anjiyogenez Üzerine Etkisi, Araştırmacı, TÜBAP 2020/19.
- 2) Etilenoksi Naringenin Grubuna Benzil Piperazin Türevlerinin Bağlanmasıyla Oluşan Bileşiklerin Sentezi ve Beyin Tümör Küreciklerinde Anti-Anjiyogenik Özelliklerinin Belirlenmesi, Araştırmacı, TÜBAP 2020/104.

Sertifikalar

- 1) Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi, A Kategorisi 1. grup, 2019.